

MODELADO MOLECULAR DE LA FITASA GCEP-84 DE *Klebsiella* sp.

Modelado molecular de la Fitasa de *Klebsiella pneumoniae*: diseño racional de variantes
termoestables y tolerantes a pH ácidos

María José Ramírez Arrieta

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Directora

Leidy Rocío Pico Martínez

Magíster en Biología

Codirector

Jorge Hernández Torres

Doctor en Biología Molecular

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

A Alaska,

por acompañarme con su ternura incondicional en cada momento de este camino,

por ser consuelo en los días difíciles y alegría constante en mi vida.

Esta tesis también es para ti.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi directora de trabajo de grado, Leidy Rocío Pico Martínez, y a mi codirector, Jorge Hernández Torres, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de este proyecto. Gracias por su orientación generosa, por compartir su conocimiento con paciencia y por confiar en mi capacidad para desarrollarme como investigadora. Trabajar a su lado fue un privilegio que marcó mi crecimiento académico y personal.

A mi compañero de vida, Anderson Murillo Carreño, gracias por caminar conmigo en cada paso de este proceso. Por tus palabras de aliento cuando más las necesité, por tu amor constante y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Este logro también es tuyo.

A mis padres, Rosalinda Arrieta y Ricardo Ramírez, gracias por su amor inmenso y su ejemplo inquebrantable. Por enseñarme con su vida que la disciplina, la honestidad y la ternura son fuerzas poderosas. Todo lo que soy les pertenece, porque ustedes han sido mi raíz y mi impulso.

A mi compañero de carrera, Fabián Sierra, gracias por compartir este camino académico con generosidad y compañerismo. Tu apoyo, tus palabras y tu amistad fueron un refugio en los momentos de mayor presión y una alegría constante en este recorrido.

Y a mis fieles compañeros Aron y Alaska, gracias por acompañarme con su lealtad silenciosa y su cariño sin condiciones. En sus miradas encontré paz, en su compañía encontré consuelo. Esta tesis también lleva su huella.

Tabla de Contenidos

	Pág.
Introducción	1
1. Objetivos	4
1.1 Objetivo General	4
1.2 Objetivos Específicos	4
2. Competencias	4
3. Metodología	5
3.1 Revisión bibliográfica y búsqueda de proteínas homólogas	5
3.2 Modelado Estructural y Preparación de Variantes Proteicas	5
3.3 Análisis Comparativo de Secuencias y Estructuras	6
3.4 Dinámica molecular	7
3.5 Docking molecular	8
4. Resultados	9
4.1 Revisión Bibliográfica y Selección de Homólogos Estructurales	9
4.2 Modelado Estructural y Validación	10
4.2.1 Generación de Modelos 3D	10
4.2.2 Validación Estructural	10
4.3 Análisis Comparativo de Secuencias y Estructuras	13
4.3.1 Alineamientos y Mutaciones	13
4.3.2 Superposición Estructural	15
4.3.3 Distribución Electroestática	20
4.4 Evaluación de la estabilidad estructural mediante dinámica molecular	23

MODELADO MOLECULAR DE LA FITASA GCEP-84 DE *Klebsiella* sp.

4.5 Interacción proteína-ligando mediante acoplamiento molecular	26
5. Discusión	30
5.1 Selección bibliográfica y modelado estructural	30
5.2 Validación estructural	31
5.3 Análisis comparativo de secuencias y estructuras	32
5.4 Estabilidad estructural mediante dinámica molecular	34
5.5 Interacción proteína-ligando mediante acoplamiento molecular	36
6. Conclusiones	37
Referencias Bibliográficas	38
Apéndices	49

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Resultados de la validación estructural mediante MolProbity para las proteínas GCEP-84, FireProt, 2WNI y Δ 2WNI.	12
Tabla 2. Identidad, similaridad y métricas de alineamiento par-a-par entre GCEP-84 y sus variantes	15
Tabla 3. Afinidad de unión y RMSD del modo mejor clasificado para cada variante	27

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Alineamiento múltiple de las variantes GCEP-84, FireProt, 2WNI y Δ 2WNI.	14
Figura 2. Superposición estructural de GCEP-84 (Amarillo) y FireProt (Cian) con las mutaciones resaltadas.	16
Figura 3 Superposición comparativa de la proteína de referencia GCEP-84 (amarillo) con sus variantes mutadas	17
Figura 4. Distribución superficial de las mutaciones en las variantes de fitasa respecto a GCEP-84.	19
Figura 5. Distribución del potencial electrostático en la superficie posterior de diferentes variantes de fitasa	21
Figura 6. Distribución del potencial electrostático en la superficie frontal de las cuatro variantes de fitasa	22
Figura 7. Análisis de RMSD a pH 2.0 y 5.0	24
Figura 8. Análisis de RMSD a temperaturas de 50 °C, 65 °C y 80 °C.	25
Figura 9. Interacciones del sitio activo de las variantes de fitasa con el sustrato.	29

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Interacciones proteína–ligando en la variante Δ 2WNI	49
Apéndice B. Interacciones proteína–ligando en la variante GCEP-84	50
Apéndice C. Interacciones proteína–ligando en la variante 2WNI	51
Apéndice D. Interacciones proteína–ligando en la variante FireProt	52

Resume

El presente estudio se centra en la ingeniería *in silico* de la fitasa GCEP-84 de *Klebsiella pneumoniae* con el propósito de desarrollar variantes con mayor termoestabilidad y tolerancia a pH ácido, características clave para su aplicación en procesos industriales. A partir de un modelo inicial obtenido mediante I-TASSER y la estructura cristalográfica homóloga 2WNI, se diseñaron cuatro variantes: la proteína nativa (GCEP-84), la variante 2WNI (H25A), su reversión Δ 2WNI (A25H) y un diseño multipunto generado por FireProt. La validación estructural se realizó con MolProbity, asegurando una geometría adecuada antes de los análisis. Posteriormente, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular con GROMACS a 50 °C, 65 °C y 80 °C, evaluando tanto la estabilidad estructural como los cambios conformacionales en estados de protonación correspondientes a pH 2 y pH 5. Adicionalmente, se efectuó acoplamiento molecular con AutoDock Vina para estimar la afinidad de cada variante hacia el fitato, su sustrato natural. Los resultados mostraron que la variante Δ 2WNI logró un equilibrio óptimo entre resistencia térmica y tolerancia a pH ácido sin pérdida significativa de afinidad, mientras que FireProt presentó una destacada estabilidad a 80 °C pero con una reducción en la afinidad de unión. Estos hallazgos contribuyen al diseño racional de fitasas optimizadas para condiciones extremas en la industria de alimentos y piensos.

Título: Modelado molecular de la Fitasa de *Klebsiella pneumoniae*: diseño racional de variantes termoestables y tolerantes a pH ácidos^{1*}

Autor: María José Ramírez Arrieta, Leidy Rocío Pico Martínez y Jorge Hernández Torres ^{2*3*}

Palabras Clave: *Klebsiella pneumoniae*, fitasa, termoestabilidad, tolerancia a pH ácido, modelado molecular, dinámica molecular, acoplamiento molecular.

Descripción:

^{1*} Trabajo de Grado

^{2**} Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Leidy Rocío Pico Martínez. Magister en Biología. Codirector: Jorge Hernández Torres. Doctor en Biología Molecular

Abstract

This study focuses on the *in silico* engineering of the GCEP-84 phytase from *Klebsiella pneumoniae* with the aim of developing variants with enhanced thermostability and tolerance to acidic pH, key features for industrial applications. Based on an initial model generated using I-TASSER and the homologous crystal structure 2WNI, four variants were designed: the native protein (GCEP-84), the 2WNI variant (H25A), its reversion Δ 2WNI (A25H), and a multipoint design generated with FireProt. Structural validation was performed with MolProbity to ensure proper geometry before further analysis. Subsequently, molecular dynamics simulations were carried out using GROMACS at 50 °C, 65 °C, and 80 °C, evaluating both structural stability and conformational changes under protonation states corresponding to pH 2 and pH 5. Additionally, molecular docking with AutoDock Vina was conducted to estimate each variant's affinity toward phytate, its natural substrate. Results showed that the Δ 2WNI variant achieved an optimal balance between thermal resistance and acidic pH tolerance without significant loss of binding affinity, whereas the FireProt design displayed remarkable stability at 80 °C but with a reduced substrate affinity. These findings contribute to the rational design of phytases optimized for extreme conditions, supporting their potential use in the food and feed industry.

Title: Molecular Modeling of *Klebsiella pneumoniae* Phytase: Rational Design of Thermostable and Acid-Tolerant Variants ^{4*}

Author(s): María José Ramírez Arrieta, Leidy Rocío Pico Martínez y Jorge Hernández Torres ⁵

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, phytase, thermostability, acid pH tolerance, molecular modeling, molecular dynamics, molecular docking.

Description:

^{4*} Degree Work

⁵Faculty of Sciences. School of Biology. Biology. Advisor: Leidy Rocío Pico Martínez, M.Sc. in Biology. Co-advisor: Jorge Hernández Torres, Ph.D. in Molecular Biology.

Introducción

El fitato, también conocido como ácido fítico o hexafosfato de inositol (IP6), es un compuesto natural que se encuentra en los cereales integrales, las legumbres y las nueces (Chen et al., 2015). Su función principal en las plantas es actuar como reservorio de fósforo y minerales, almacenándose predominantemente en la capa de aleurona y el embrión de las semillas (Ushasree et al., 2016). Se estima que entre el 60% y 70% del fósforo total en estos alimentos está presente en forma de fitato. Durante la germinación, este compuesto se hidroliza, liberando fósforo inorgánico necesario para el desarrollo inicial de la planta (Turner et al., 2002).

En contraste con su papel fisiológico en las plantas, el fitato presenta desventajas nutricionales importantes para los animales monogástricos, como aves y cerdos (Romano & Kumar, 2018). Estos animales carecen de la enzima fitasa, una fosfatasa especializada que cataliza la liberación de ortofosfato a partir del fitato, impidiendo así su digestión eficiente (Elkhalil et al., 2007). Esta deficiencia reduce la disponibilidad de fósforo inorgánico, esencial para funciones biológicas como la mineralización ósea, la integridad de membranas celulares y el metabolismo energético (Romano & Kumar, 2018).

Además del impacto nutricional, el fitato tiene una fuerte capacidad quelante que hace que se una fuertemente a cationes metálicos como Ca^{2+} , Fe^{2+} , K^{+1} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , haciéndolos insolubles y reduciendo su disponibilidad nutricional tanto en animales como en humanos (Bohn et al., 2008; Lei et al., 2007; Chen et al., 2015; Reddy et al., 2017). La formación de complejos insolubles con estos elementos disminuye su biodisponibilidad, lo que puede derivar en deficiencias minerales con consecuencias metabólicas significativas, especialmente durante etapas de crecimiento, gestación o producción (Driver et al., 2006; Elkhalil et al., 2007). La

deficiencia de zinc, por ejemplo, afecta la actividad de enzimas oxidoreductasas, mientras que la de calcio compromete la formación ósea y la contracción muscular (Lönnerdal 2000).

Desde una perspectiva ambiental, el fósforo no digerido presente en material excretado de animales representa una fuente importante de contaminación. Este fósforo puede ser arrastrado por escorrentía hasta cuerpos de agua superficiales, donde, tras su liberación por acción microbiana, se convierte en una fuente de nutrientes que favorece el crecimiento descontrolado de algas (Correll, 1998; Turner et al., 2002). Este fenómeno, conocido como eutrofización, altera el equilibrio ecológico de los ecosistemas acuáticos, reduciendo el oxígeno disuelto y provocando la muerte de especies acuáticas, además de deteriorar la calidad del agua con consecuencias económicas para las comunidades locales (Smith et al., 1999).

Para enfrentar este problema, una estrategia adoptada en la industria pecuaria ha sido la adición de fitasas microbianas a los alimentos balanceados, lo que mejora la utilización del fósforo vegetal y reduce la carga ambiental asociada a su excreción (Selle & Ravindran, 2007; Shi et al., 2007). Sin embargo, las fitasas comerciales actualmente disponibles, derivadas en su mayoría de *Aspergillus niger* y *Escherichia coli*, presentan limitaciones funcionales. Entre éstas, destaca su sensibilidad térmica, al perder actividad a temperaturas superiores a 60 – 70 °C (Lei et al., 2007), lo que impide su actividad tras procesos industriales como la peletización. Asimismo, presentan escasa eficiencia a pH ácido, como pH 2,0 – 3,0, presente en el estómago de animales monogástricos (Selle & Ravindran, 2008; Singh & Satyanarayana, 2011).

En este contexto, la búsqueda biotecnológica de nuevas fitasas con propiedades mejoradas ha cobrado relevancia. En particular, la fitasa periplásmica de *Klebsiella pneumoniae* GCEP-84, aislada de suelos agroindustriales colombianos, ha mostrado un perfil enzimático prometedor, con actividad en condiciones de pH 4,0 y resistencia térmica a 50 °C, manteniendo aproximadamente

un 60% de actividad a 60 °C (Maldonado-Pava, 2023). Esta enzima pertenece a la familia de las *histidine acid phosphatases* (HAPs) y ha demostrado una cinética catalítica comparable a las enzimas comerciales, lo que la convierte en una candidata atractiva para su modificación estructural y optimización. En particular, su potencial para soportar procesos industriales exigentes como la peletización, así como ambientes gástricos altamente ácidos, como los del sistema digestivo de animales monogástricos, refuerza su viabilidad para aplicaciones en nutrición animal (Rebello et al., 2017).

La ingeniería de proteínas mediante herramientas bioinformáticas ha surgido como una alternativa eficaz para optimizar enzimas de interés industrial, permitiendo mejorar sus propiedades funcionales bajo condiciones extremas, como altas temperaturas o ambientes altamente ácidos. A través del diseño racional de mutantes *in silico*, es posible modificar la secuencia aminoacídica de manera dirigida para favorecer la estabilidad estructural y funcional de las enzimas, con una reducción significativa en tiempo y costos en comparación con métodos tradicionales como la evolución dirigida o la mutagénesis aleatoria (Rebello et al., 2017). Herramientas como FoldX y Rosetta permiten predecir el efecto de mutaciones puntuales sobre la energía libre de plegamiento (Schymkowitz et al., 2005; Sora et al., 2023), mientras que las simulaciones de dinámica molecular ofrecen información detallada sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en distintos entornos (Chen et al., 2015; Ushasree et al., 2017). Estos enfoques han sido aplicados exitosamente en el rediseño de enzimas industriales, logrando mejoras en su termoestabilidad, tolerancia a pH extremos y eficiencia catalítica (Rebello et al., 2017).

Dado el potencial biotecnológico de la fitasa de *K. pneumoniae* y la necesidad de enzimas más robustas para su uso en alimentos balanceados, el presente trabajo de grado tiene como

objetivo diseñar variantes termoestables y tolerantes a pH ácido mediante estrategias computacionales. Se propone utilizar herramientas de modelado molecular, dinámica molecular, acoplamiento molecular y aprendizaje automático para seleccionar mutaciones prometedoras. Estas variantes podrían ser posteriormente validadas experimentalmente y aplicadas en la formulación de *pellets* alimenticios para animales monogástricos, contribuyendo así a una nutrición más eficiente y a la sostenibilidad ambiental

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Diseñar *in silico* una variante de la fitasa GCEP-84 de *Klebsiella pneumoniae* con características termoestables y tolerancia al pH ácido.

1.2 Objetivos Específicos

Evaluar variantes de la estructura primaria de la fitasa GCEP-84 con potencial termoestable y actividad a pH ácido, haciendo uso de software de aprendizaje automático.

Construir modelos 3D de las proteínas haciendo uso de software especializado en la construcción de modelos moleculares.

Evaluar la estabilidad estructural de los modelos mediante simulaciones de dinámica y Docking molecular.

2. Competencias

Utiliza herramientas de modelado estructural para construir, visualizar y modificar modelos 3D de variantes proteicas.

Adquiere habilidades en la ejecución de simulaciones de dinámica molecular con GROMACS, evaluando la estabilidad estructural de proteínas bajo condiciones de estrés térmico y ácido.

Aplica métodos de acoplamiento molecular utilizando herramientas bioinformáticas, para estimar la afinidad de unión entre proteína y ligando.

Analiza los resultados estructurales y funcionales de las biomoléculas mediante herramientas complementarias, integrando parámetros como el RMSD, la afinidad de unión y la visualización de interacciones en el sitio activo.

Redacta y estructura un informe de investigación científica con coherencia técnica y argumentativa.

3. Metodología

3.1 Revisión bibliográfica y búsqueda de proteínas homólogas

Se realizó una búsqueda de homólogos estructurales y funcionales de la fitasa GCEP-84 de *Klebsiella pneumoniae* previamente caracterizada por Maldonado-Pava (2023), con el objetivo de establecer una base comparativa robusta para evaluar las variantes a construir. Para ello, se utilizó el programa BlastP (*National Center for Biotechnology Information*, 2023), empleando como secuencia de entrada la fitasa de referencia GCEP-84 y se estableció un umbral mínimo de identidad de 97%, con el fin de garantizar una alta similaridad estructural.

3.2 Modelado Estructural y Preparación de Variantes Proteicas

La estructura tridimensional de GCEP-84 fue generada mediante el servidor I-TASSER (Zhang, 2008), seleccionado el modelo con mayor C-Score como indicador de la calidad estructural. Se verificó que la estructura estuviera conformada únicamente por la cadena A. La

estructura cristalográfica de 2WNI fue descargada desde el Protein Data Bank (PDB) y editada en PyMOL (v2.5; Schrödinger, LLC, 2023) para conservar únicamente la cadena A. La estructura de la proteína 2WNI presenta una mutación introducida experimentalmente por los investigadores (H25A) la cual tiene como función inhibir el acoplamiento con el fitato (Böhm et al., 2010). Para obtener la variante revertida (A25H), denominada como “ Δ 2WNI” en este informe, se empleó la herramienta *BuildModel* de FoldX (Schymkowitz et al., 2005) que permite introducir mutaciones puntuales de forma precisa preservando el entorno estructural nativo.

Con el objetivo de generar una variante optimizada se utilizó el servidor FireProt (Musil et al., 2017) que integra predicciones de estabilidad basadas en los software FoldX y Rosetta, junto con análisis de conservación evolutiva. La secuencia optimizada propuesta por FireProt fue modelada con I-TASSER, asegurando la correcta conservación de los motivos catalíticos y la geometría del sitio activo. Esta variante fue nombrada para este estudio como “FireProt”. Posteriormente, se evaluó la calidad estructural de los modelos tridimensionales obtenidos para las cuatro variantes de fitasa mediante el servidor MolProbity (MolProbity, s.f.).

3.3 Análisis Comparativo de Secuencias y Estructuras

Se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias utilizando MAFFT v7 (Kato & Standley, 2013), incorporando las cuatro variantes analizadas: GCEP-84, 2WNI, Δ 2WNI y FireProt, con el fin de identificar mutaciones puntuales, motivos catalíticos conservados y posibles alteraciones en regiones funcionales clave. Como complemento, se empleó el programa EMBOSS Needle (Rice et al., 2000) para realizar alineamientos pareados entre GCEP-84 y cada una de las variantes. Además, se utilizó PyMOL para superponer las estructuras tridimensionales de las proteínas, evaluando visualmente las diferencias en la conformación general y en regiones

específicas como el sitio activo, la superficie electrostática y los lazos externos calculando el RMSD de las variantes respecto a GCEP-84.

Finalmente, se analizó la distribución de cargas electrostáticas en la superficie molecular mediante el complemento APBS (Baker et al., 2001) en PyMOL, obteniendo la carga superficial de cada una de las variantes, con el fin de predecir el posible impacto de las mutaciones sobre la interacción enzima-sustrato y su adaptación a diferentes condiciones de pH.

3.4 Dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para evaluar la estabilidad estructural de las variantes bajo condiciones térmicas y ácidas. Las simulaciones se llevaron a cabo con el programa GROMACS (Abraham et al., 2015) utilizando el campo de fuerza OPLS-AA. Cada sistema se ubicó en una caja cúbica con margen de 1,0 nm y se solvató utilizando el modelo de agua SPC216. Posteriormente, se neutralizó la carga neta mediante la adición de iones, asegurando condiciones electrostáticas adecuadas para la simulación.

De esta manera, cada sistema fue sometido a una minimización de energía, seguida de una fase de equilibrio en los conjuntos NVT y NPT. Finalmente, se realizaron simulaciones de producción de 10 ns a tres temperaturas: 50 °C, 65 °C y 80 °C, con el objetivo de evaluar la estabilidad estructural frente al incremento de las condiciones térmicas. Como medida cuantitativa de la estabilidad, se calculó el RMSD (*Root Mean Square Deviation*) del esqueleto proteico a lo largo de 10 ns.

Para simular ambientes de pH ácido, se utilizó el programa PROPKA (Olsson et al., 2011), con el campo de fuerza AMBER, para estimar los estados de protonación de cada estructura a pH 2,0 y 5,0. Las estructuras se protonaron completamente para obtener archivos *.pqr, que luego fueron convertidos nuevamente a formato *.pdb mediante el programa PyMOL. Estas estructuras

protonadas fueron sometidas a simulaciones de dinámica molecular bajo el campo de fuerza AMBER99SB, utilizando el modelo explícito de agua SPC216, lo cual permitió evaluar la estabilidad de las variantes en entornos altamente ácidos.

3.5 Docking molecular

Con el fin de evaluar la posible afinidad de unión al sustrato, se realizó un análisis de acoplamiento molecular usando AutoDock Tools y AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010). El ligando fue obtenido de la plataforma ChemSpider (Royal Society of Chemistry, 2023) en formato *.mol y convertido a *.mol2 mediante el programa Avogadro (Hanwell et al., 2012), optimizando su geometría 3D. Asimismo, la preparación del ligando y de las proteínas se realizó con el paquete MGLTools (Sanner, 1999), añadiendo hidrógenos polares y asignando cargas Gasteiger al ligando, y cargas Kollman a las proteínas. Los archivos se guardaron en formato *.pdbqt.

Los residuos del sitio activo fueron definidos a partir del análisis estructural previo. Se estableció una caja de búsqueda uniforme de $50 \times 50 \times 50$ Å, centrada en la región catalítica para todas las variantes. Se usó una exhaustividad alta en el análisis para obtener múltiples conformaciones de acoplamiento por proteína, con la intención de comparar la afinidad de unión en condiciones equivalentes.

Una vez obtenidos los resultados del acoplamiento molecular (*Docking*), los archivos *out.pdbqt* y el archivo del ligando en formato *pdbqt* fueron cargados en PyMOL para visualizar el complejo proteína–ligando. Posteriormente, se exportó la conformación con la mayor afinidad de unión para su análisis en el software Discovery Studio Visualizer (v2023; Dassault Systèmes BIOVIA, 2023). En este programa, se examinaron en detalle las interacciones no covalentes entre cada proteína y el ligando, incluyendo enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, puentes salinos e interacciones electrostáticas.

4. Resultados

La presente sección detalla los hallazgos obtenidos a partir del diseño *in silico* y la caracterización computacional de variantes de la fitasa GCEP-84 de *Klebsiella pneumoniae*, con el objetivo de identificar modificaciones que mejoren su termoestabilidad y tolerancia a pH ácido. Para ello, se emplearon diversas herramientas bioinformáticas para la ingeniería de proteínas, y se generaron y analizaron cuatro variantes principales: la proteína control GCEP-84, la variante 2WNI, su mutante revertido Δ 2WNI, y la variante FireProt, optimizada computacionalmente. Los resultados se presentan siguiendo las etapas metodológicas, comenzando con la validación estructural de los modelos y el análisis comparativo de sus secuencias y arquitecturas tridimensionales, seguidos por la evaluación de su estabilidad bajo diferentes condiciones de temperatura y pH mediante simulaciones de dinámica molecular y, finalmente, el estudio de la interacción proteína-ligando a través de acoplamiento molecular para evaluar su afinidad por el sustrato

4.1 Revisión Bibliográfica y Selección de Homólogos Estructurales

Entre las proteínas que cumplían el umbral mínimo de 97% de identidad de secuencia con GCEP-84, se seleccionó mediante BlastP contra la PDB (Protein Data Bank, Berman et al., 2000), la estructura cristalográfica con código 2WNI, caracterizada en el estudio de Böhm et al. (2010). La fitasa 2WNI, de 42 kDa, proviene de la cepa ASR1 de *Klebsiella* sp., aislada de un arrozal indonesio. Dicha fitasa fue purificada y caracterizada como una proteína potencial para aplicaciones industriales y agrícolas, con el fin de que el fósforo del fitato esté disponible para la nutrición vegetal y animal (Sajidan et al., 2004). La estructura 2WNI se adoptó para los análisis subsiguientes.

4.2 Modelado Estructural y Validación

4.2.1 Generación de Modelos 3D

Dado que no se cuenta con una estructura tridimensional experimental de la fitasa CGEP-84, se generó un modelo tridimensional haciendo uso del servidor I TASSER, obteniendo un valor de salida estructural o C-Score de -0,46. Por otro lado, la proteína FireProt, también modelada mediante I TASSER mostrando un mejor valor de calidad estructural o C-score de -0,16. Finalmente, la variante Δ 2WNI fue derivada a partir de la estructura cristalográfica 2WNI disponible en la PDB, bajo el mismo código, revirtiendo la mutación H25A mediante la herramienta *BuildModel* del programa FoldX.

La evaluación de estabilidad estructural mediante el servidor FireProt produjo un total de 7.505 variantes mutacionales, de las cuales únicamente 4.707 fueron evaluadas en términos energéticos mediante FoldX. Los cambios predichos en la energía libre de plegamiento ($\Delta\Delta G$) oscilaron entre -3,98 y +27,65 kcal/mol. Del total de mutaciones evaluadas, el 24,7 % (1.162 variantes) fueron clasificadas como estabilizadoras ($\Delta\Delta G < 0$ kcal/mol), mientras que el 75,3% restante presentó efectos neutros o desestabilizadores.

4.2.2 Validación Estructural

Con el servicio de validación de estructuras de proteínas MolProbity, se analizaron las estructuras obtenidas. GCEP-84 presentó un *Clashscore* de 11,97, ubicado en el percentil 63, indicando una moderada presencia de solapamientos estéricos. El análisis de rotámeros identificó un 12,98% de rotámeros pobres y un 74,93% de rotámeros favorecidos. En cuanto a la distribución de Ramachandran, se observaron 6,43% de residuos fuera de las regiones esperadas y un 82,14% dentro de regiones favorecidas, con un puntaje Z de $-3,88 \pm 0,34$. Además, se identificaron 32 desviaciones significativas de C β (8,16%), un enlace atípico (0,03%) y 77 ángulos fuera de

especificación (1,70%). En los péptidos ómeegas no se encontraron prolinas *cis*, pero sí 33 péptidos retorcidos (7,84%). Adicionalmente, hubo 39 *outliers* de CaBLAM (9,30%) y 15 casos de geometría de CA irregular (3,59%).

Para la variante FireProt, el modelo mostró una mejora significativa en el *Clashscore*, con un valor de 4,91 (percentil 94), reflejando una reducción importante en las colisiones estéricas. El porcentaje de rotámeros pobres fue del 9,44% y el de rotámeros favorecidos alcanzó el 81,12%. La evaluación de Ramachandran reveló 5,24% de residuos en regiones desfavorables y 83,81% en regiones favorables, con un puntaje Z de $-4,28 \pm 0,33$. En términos covalentes, se registraron 23 desviaciones significativas de $C\beta$ (5,87%), 2 enlaces atípicos (0,06%) y 66 ángulos fuera de especificación (1,46%). En la sección péptidos ómeegas se identificó una prolina *cis* (3,70%) y 28 péptidos retorcidos (6,65%). Bajo los criterios de baja resolución, se reportaron 33 *outliers* de CaBLAM (7,90%) y 10 casos de geometría de CA atípica (2,39%).

En la proteína 2WNI, el *Clashscore* obtenido fue de 13,26, situándose en el percentil 57. El modelo presentó un 6,58% de rotámeros pobres y un 87,77% de rotámeros favorecidos. Notablemente, no se detectaron residuos Ramachandran fuera de las regiones permitidas, con un 96,99% de residuos favorecidos y un puntaje Z de $-2,72 \pm 0,36$. Se reportaron 4 desviaciones significativas de $C\beta$ (1,09%), 26 enlaces atípicos (0,83%) y 20 ángulos fuera de especificación (0,47%). Se observó una prolina *cis* (3,85%) y ningún péptido retorcido. Además, hubo 1 *outlier* de CaBLAM (0,30%) y un caso de geometría de CA irregular (0,26%).

Finalmente, en la variante Δ 2WNI, se obtuvo un *Clashscore* de 13,41 (percentil 56). Este modelo mostró valores similares a 2WNI, con un 6,56% de rotámeros pobres y 87,81% de rotámeros favorecidos. No se registraron residuos Ramachandran desfavorables y se observó un 96,69% de residuos favorecidos con un puntaje Z de $-2,72 \pm 0,36$. A nivel covalente se

contabilizaron 4 desviaciones significativas de $C\beta$ (1,09%), 26 enlaces atípicos (0,83%) y 20 ángulos fuera de especificación (0,47%). Se detectó una prolina *cis* (3,85%) sin péptidos retorcidos, así como un *outlier* de CaBLAM (0,30%) y un *outlier* de geometría de CA (0,26%) (Tabla 1).

Los resultados obtenidos mediante la validación estructural con MolProbity respaldan la calidad de los modelos analizados, mostrando una conformación estérica y geométrica aceptable para estudios computacionales. La ausencia de alertas críticas, junto con los niveles moderados de desviaciones estructurales y el buen comportamiento en los análisis de Ramachandran y Clashscore, otorgaron viabilidad a la continuidad del proyecto. Por tanto, se consideró que las estructuras generadas eran adecuadas para su uso en posteriores etapas de modelado funcional, análisis comparativo o simulaciones de interacción molecular.

Tabla 1. Resultados de la validación estructural mediante MolProbity para las proteínas GCEP-84, FireProt, 2WNI y Δ 2WNI.

Parámetro MolProbity	GCEP-84	V. FireProt	2WNI	Δ 2WNI
Clashscore (percentil)	11,97 (63%)	4,91 (94%)	13,26 (57%)	13,41 (56%)
Rotámeros pobres (%)	12,98	9,44	6,58	6,56
Rotámeros favorecidos (%)	74,93	81,12	87,77	87,81
Ramachandran Outliers (%)	6,43	5,24	0,00	0,00
Ramachandran Favorecidos (%)	82,14	83,81	96,99	96,69
Ramachandran Z-score	-3,88 \pm 0,34	-4,28 \pm 0,33	-2,72 \pm 0,36	-2,72 \pm 0,36
MolProbity Score (percentil)	3,14 (18%)	2,68 (37%)	2,46 (49%)	2,47 (49%)
Desviaciones C β >0.25Å (%)	8,16	5,87	1,09	1,09
Enlaces atípicos (%)	0,03	0,06	0,83	0,83
Ángulos atípicos (%)	1,70	1,46	0,47	0,47
Prolinas cis (%)	0,00	3,70	3,85	3,85
Péptidos retorcidos (%)	7,84	6,65	0,00	0,00
CaBLAM Outliers (%)	9,30	7,90	0,30	0,30
CA geometry Outliers (%)	3,59	2,39	0,26	0,26

Nota. La tabla resume las métricas obtenidas con MolProbity, incluyendo Clashscore, análisis de rotámeros, distribución de Ramachandran, puntajes generales, desviaciones de geometría covalente, presencia de prolinas cis y péptidos retorcidos, así como valores fuera de límites en geometría CA y CaBLAM.

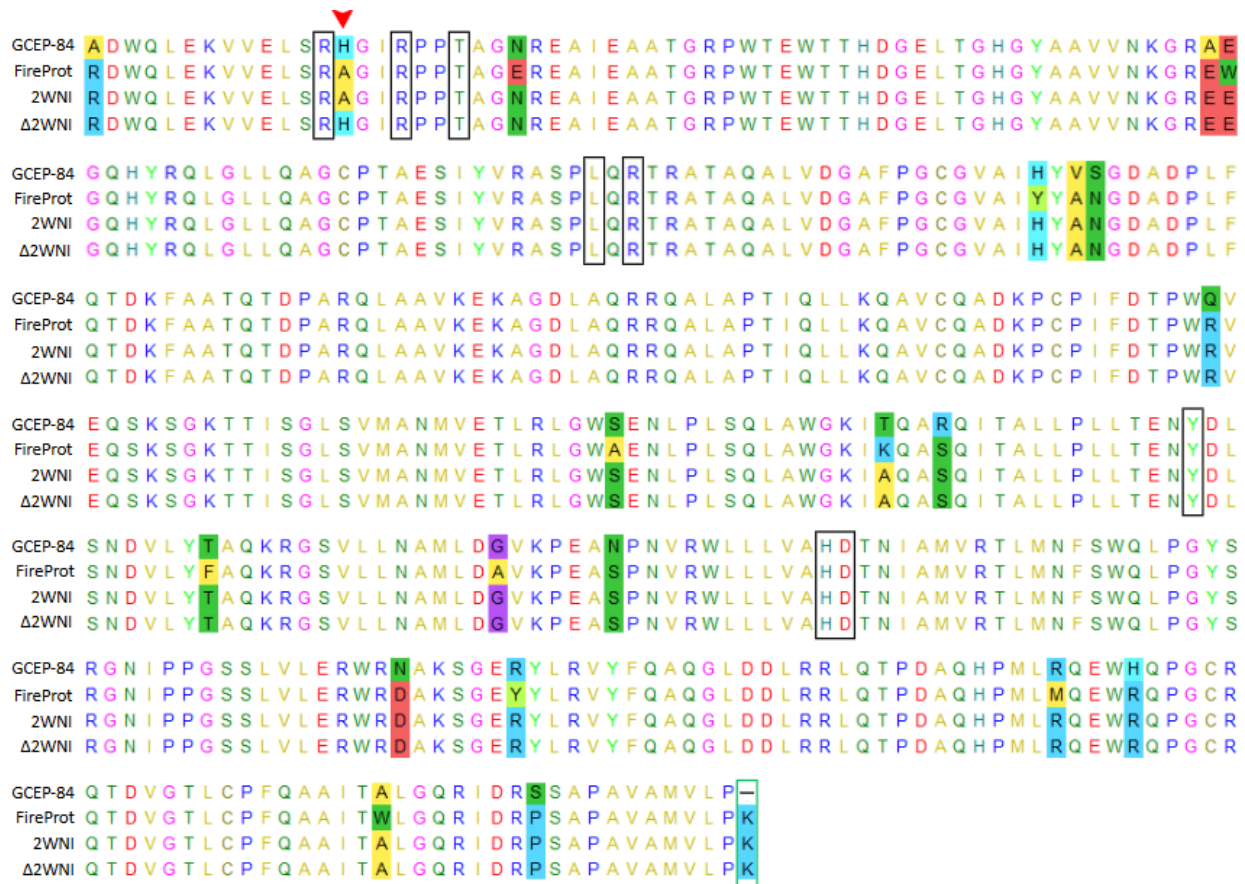
4.3 Análisis Comparativo de Secuencias y Estructuras

4.3.1 Alineamientos y Mutaciones

El análisis comparativo de secuencias realizado mediante el software MAFFT (Figura 1) permitió identificar sustituciones puntuales en las variantes mutantes 2WNI, Δ 2WNI y FireProt, en relación con GCEP-84. La variante 2WNI acumuló un total de 11 mutaciones: A29R, H42A, V140A, Q207R, T250A, R253S, N296S, N345D, H383R, S412P y una inserción adicional en el extremo terminal (p.L422_K423insK). Estas mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo de la secuencia. La variante Δ 2WNI comparte la mayoría de las mutaciones observadas en 2WNI, pero adicionalmente incorpora dos cambios puntuales específicos: A87E y S141N.

Por otro lado, la variante FireProt presentó un número considerable de 23 mutaciones. Además de compartir algunas sustituciones con las variantes anteriores, FireProt incluyó cambios adicionales específicos como N51E, E88W, H138Y, S236A, T250K, T275F, G290A, R351Y, R379M y A404W, lo que indica un intento intensivo de optimización, cuyo impacto en la estructura y función deberá evaluarse en detalle en etapas posteriores del proyecto

Figura 1. Alineamiento múltiple de las variantes GCEP-84, FireProt, 2WNI y Δ2WNI.



Nota. El panel muestra el alineamiento completo de las cuatro secuencias proteicas coloreadas por identidad de residuo. Cada línea corresponde a una variante (de arriba abajo: GCEP-84, FireProt, 2WNI y Δ2WNI) y los residuos conservados se representan con el mismo color, mientras que las sustituciones se destacan con tonalidades distintas. Las casillas coloreadas marcan las posiciones donde se producen mutaciones clave: 2WNI y Δ2WNI comparten la mayoría de los cambios respecto a GCEP-84, y FireProt presenta mutaciones adicionales distribuidas a lo largo de la secuencia. Se señala con una flecha roja la mutación de reversión presente en Δ2WNI con respecto a 2WNI (A25H), mientras que los aminoácidos del sitio activo se destacan mediante cajas negras.

Adicionalmente, se marca con una caja verde la delección específica que presenta GCEP-84 en comparación con las demás variantes.

El alineamiento con el servidor EMBOSS Needle reveló que la variante Δ 2WNI conservó el mayor porcentaje de identidad respecto a GCEP-84, alcanzando un 97%. En comparación, la variante 2WNI presentó valores ligeramente inferiores con 96,7 % de identidad, seguida por FireProt con 94,4 % de identidad (Tabla 2).

Tabla 2. *Identidad, similaridad y métricas de alineamiento par-a-par entre GCEP-84 y sus variantes*

Seq	Longitud (aa)	Identidad (n)	Identidad (%)	Similaridad (n)	Similaridad (%)	Gaps (n)	Gaps (%)	Score
GCEP-84 vs. FireProt	395	373	94,4	379	95,9	1	0,3	1946,0
GCEP-84 vs. Δ 2WNI	395	383	97,0	387	98,0	1	0,3	2013,0
GCEP-84 vs. 2WNI	395	382	96,7	386	97,7	1	0,3	2003,0

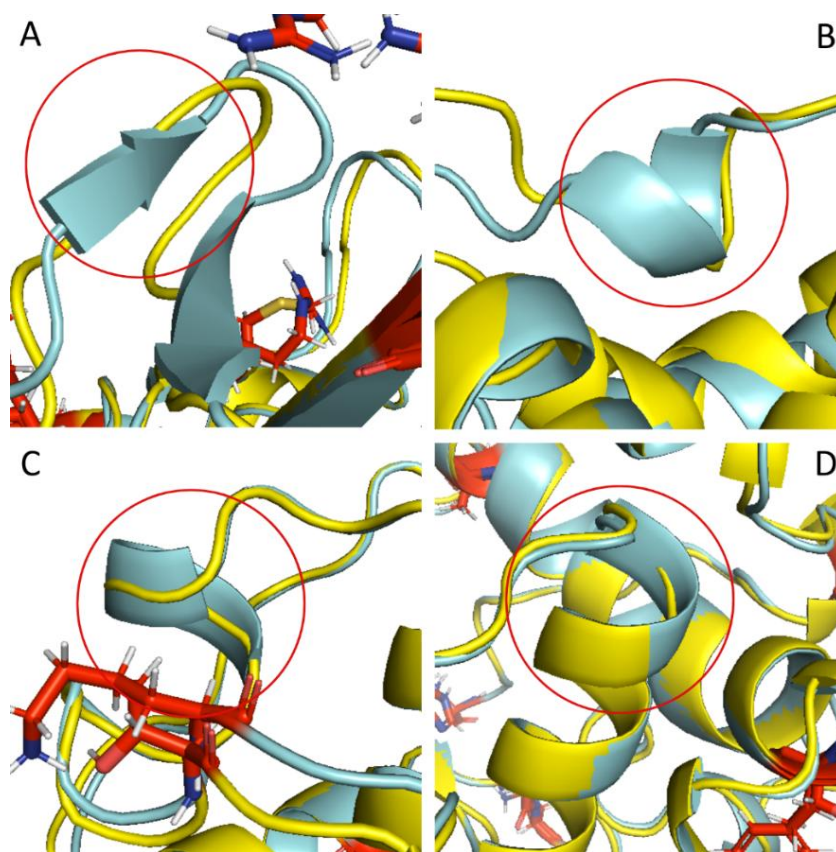
Nota. Los alineamientos se realizaron con la matriz de sustitución EBLOSUM62 empleando penalizaciones de apertura y extensión de huecos de 10,0 y 0,5, respectivamente.

3.3.2 Superposición Estructural

La comparación estructural, realizada mediante superposición en PyMOL, mostró que todas las variantes estudiadas conservan el núcleo estructural básico de una fitasa (Figura 3). Sin embargo, se observaron diferencias en las regiones periféricas, especialmente en bucles y hélices superficiales. La variante FireProt presentó modificaciones conformacionales puntuales, incluyendo la conversión de bucles en hélices α en determinadas zonas (Figura 2). Los valores de

RMSD obtenidos a partir del alineamiento estructural con respecto a la proteína GCEP-84 fueron los siguientes: FireProt, 0,643 Å; 2WNI, 0,761 Å; y Δ 2WNI, 0,762 Å. Estos valores indican que todas las variantes presentan desviaciones estructurales leves frente a la proteína de referencia.

Figura 2. Superposición estructural de GCEP-84 (Amarillo) y FireProt (Cian) con las mutaciones resaltadas.

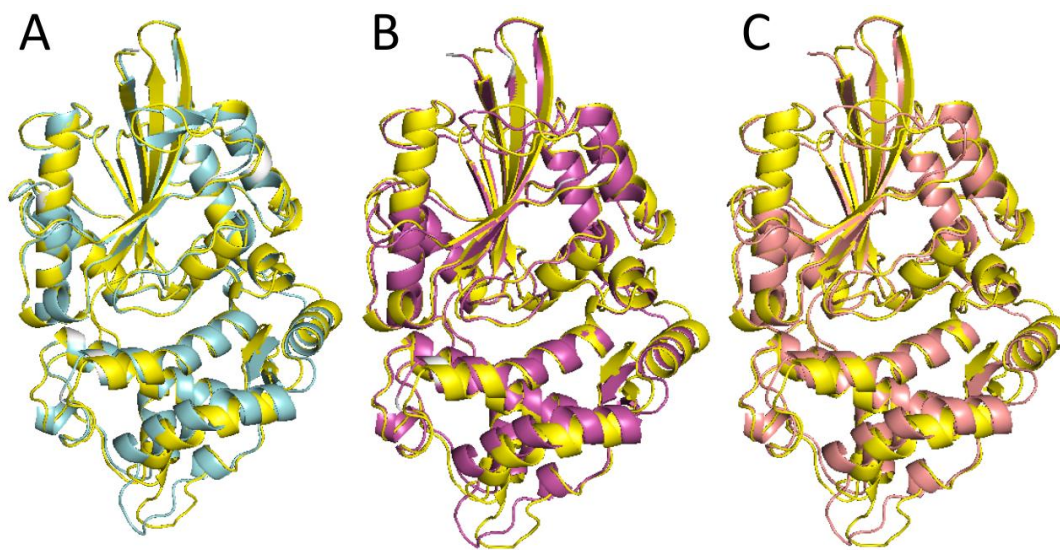


Nota. En el panel A se aprecia que el lazo cercano al sitio activo adopta en FireProt una conformación más cerrada que en GCEP-84; en el panel B se observa la elongación de la hélice adyacente y el ligero desplazamiento del lazo contiguo, lo que sugiere un empaquetamiento secundario más compacto; el panel C muestra el acercamiento de un lazo superficial hacia el núcleo, reduciendo la exposición de la superficie al solvente; y en el panel D se advierte un acortamiento de la hélice correspondiente en FireProt junto con leves ajustes de los bucles

circundantes, mientras que el núcleo de la proteína permanece globalmente superponible entre ambas variantes.

En términos de composición secundaria, la proteína GCEP-84 mostró 11 hélices α y nueve láminas β , mientras que la variante FireProt presentó 13 hélices α y 10 láminas β . Por otra parte, las variantes 2WNI y Δ 2WNI conservaron una composición estructural idéntica con 13 hélices α y ocho láminas β , sugiriendo que la diferencia específica en la posición 25 no tuvo un efecto significativo sobre la arquitectura general.

Figura 3 Superposición comparativa de la proteína de referencia GCEP-84 (amarillo) con sus variantes mutadas

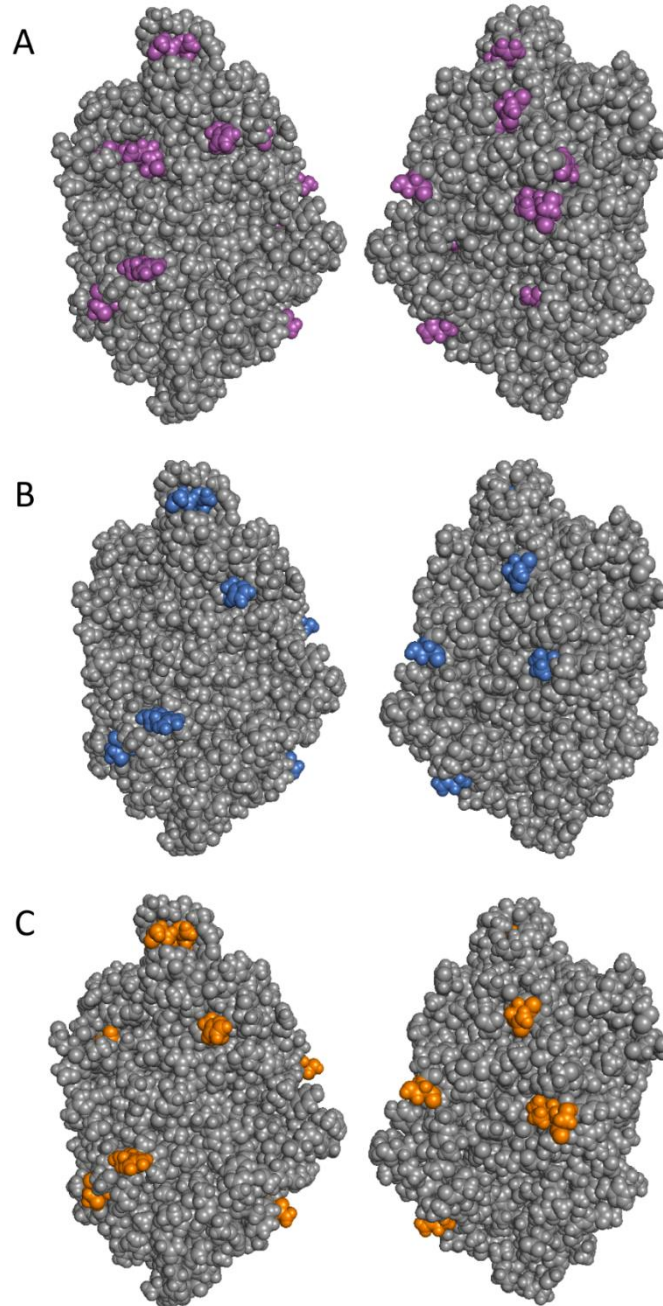


Nota. El panel A presenta la superposición entre GCEP-84 (amarillo) y FireProt (azul), donde ambas estructuras comparten un núcleo prácticamente idéntico; se aprecian ligeras desviaciones en bucles y hélices periféricas, reflejando los ajustes introducidos para estabilizar regiones flexibles en FireProt. En el panel B, la comparación de GCEP-84 (amarillo) con 2WNI (morado) muestra una coincidencia global elevada, aunque se distinguen pequeños desplazamientos en los

extremos de algunas hélices y lazos superficiales, coherentes con la pérdida de actividad catalítica reportada para 2WNI. Por último, el panel C superpone GCEP-84 (amarillo) con Δ 2WNI (rosado).

Se precisó que las mutaciones estaban predominantemente localizadas en la superficie de las proteínas, una estrategia frecuente en ingeniería para preservar el núcleo catalítico. No obstante, en las variantes 2WNI y FireProt se identificaron sustituciones puntuales como H42A, ubicada adyacente al residuo catalítico R41, y N51E cercana al residuo catalítico T48. En contraste, la variante Δ 2WNI presentó sustituciones estrictamente superficiales sin interferencias aparentes con el sitio activo (Figura 4).

Figura 4. Distribución superficial de las mutaciones en las variantes de fitasa respecto a GCEP-84.



Nota. La figura muestra la vista frontal (izquierda) y posterior (derecha) de la proteína GCEP-84 representada como superficie gris, con los residuos mutados en cada variante resaltados. En el

panel A se observan las mutaciones de FireProt (magenta), distribuidas en parches a lo largo de la superficie, con predominio en las regiones de los extremos superior e inferior. El panel B destaca las sustituciones presentes en 2WNI (azul), localizadas principalmente en zonas periféricas aisladas, mientras que el núcleo permanece sin alteraciones visibles. El panel C ilustra las mutaciones de Δ 2WNI (naranja), concentradas mayoritariamente en la periferia de la proteína, tanto en la cara frontal como en la posterior, con una cobertura más homogénea que la observada en 2WNI.

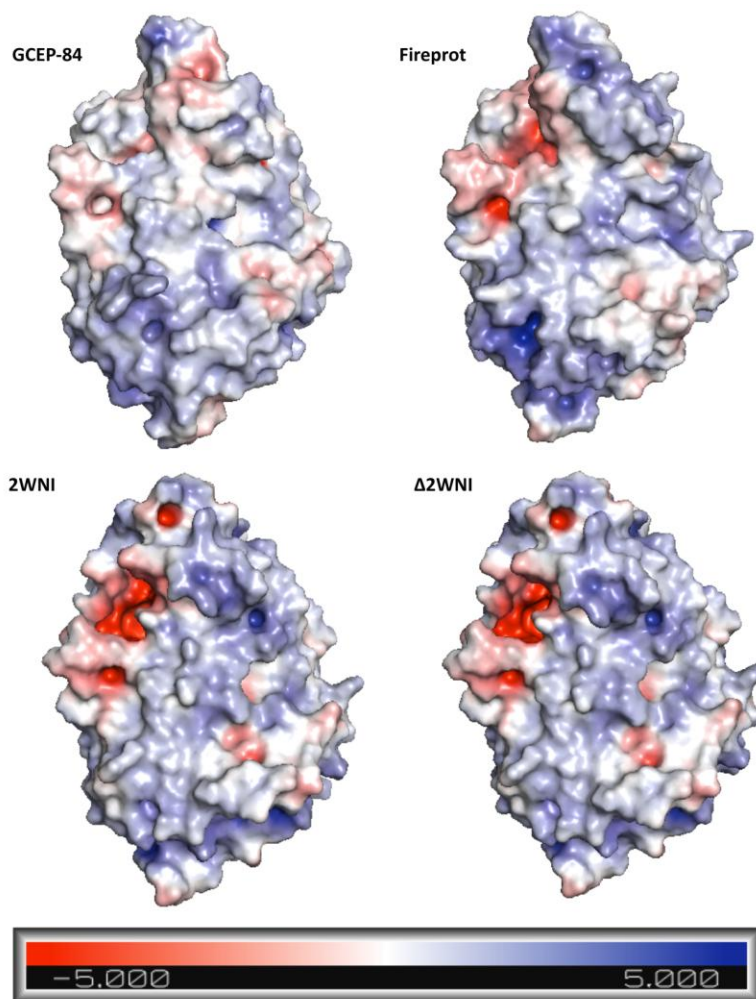
4.3.3 Distribución Electroestática

El análisis de distribución electrostática llevado a cabo mediante el complemento APBS en PyMOL evidenció diferencias claras entre las proteínas analizadas. GCEP-84 mostró una superficie con zonas alternadas de carga, reflejando una distribución balanceada de cargas electrostáticas. Esta configuración es característica de enzimas mesofílicas y sugiere una versatilidad funcional en distintos entornos. De manera consistente, la proteína control exhibió una superficie más equilibrada, con distribución uniforme de cargas positivas y negativas (Figura 6). En contraste, la variante FireProt presentó un predominio claro de cargas positivas concentradas en zonas específicas, como se observa por las regiones azul intenso. Este patrón es coherente con su diseño dirigido a incrementar la estabilidad en ambientes ácidos, donde la protonación favorece interacciones internas reforzadas por cargas positivas.

Por su parte, 2WNI evidenció una superficie más heterogénea, con múltiples parches negativos dispersos. La variante Δ 2WNI, aunque similar a 2WNI, presentó un patrón ligeramente más homogéneo y con menor densidad de cargas negativas en zonas críticas, incluyendo un bolsillo intensamente positivo menos pronunciado en la vista posterior (Figura 5). Estas diferencias electrostáticas no solo reflejan el impacto de las mutaciones en la superficie proteica, sino que

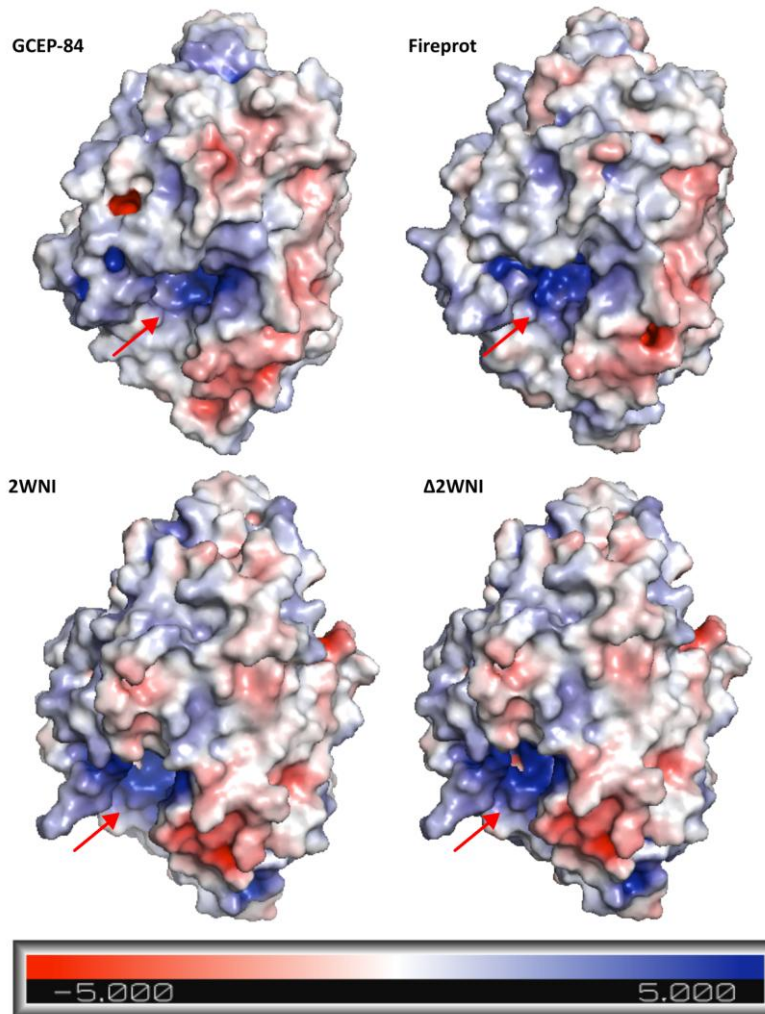
también sugieren implicaciones funcionales importantes en términos de afinidad por el sustrato y tolerancia a pH extremos, elementos clave para su uso potencial en entornos industriales.

Figura 5. *Distribución del potencial electrostático en la superficie posterior de diferentes variantes de fitasa*



Nota. Superficie posterior de las variantes de fitasa: GCEP-84, FireProt, 2WNI y Δ 2WNI. Se muestra la distribución del potencial electrostático en la superficie molecular, donde las regiones en rojo indican cargas negativas y las regiones en azul, cargas positivas. Las imágenes fueron generadas utilizando el mismo rango de escala electrostática para facilitar la comparación visual.

Figura 6. Distribución del potencial electrostático en la superficie frontal de las cuatro variantes de fitasa



Nota. Superficie frontal de las variantes de fitasa: GCEP-84, FireProt, 2WNI y Δ 2WNI. Se representa el potencial electrostático sobre la superficie molecular, con zonas rojas indicando cargas negativas y zonas azules indicando cargas positivas. Se señala con una flecha roja el bolsillo correspondiente al sitio activo. Las imágenes se generaron utilizando una escala electrostática uniforme para permitir una evaluación visual coherente entre variantes.

4.4 Evaluación de la estabilidad estructural mediante dinámica molecular

La estabilidad estructural se evaluó mediante simulaciones de dinámica molecular realizadas a tres temperaturas distintas: 50 °C, 65 °C y 80 °C. A 50 °C, las variantes 2WNI y Δ 2WNI mostraron ser notablemente más estables, manteniendo valores bajos y consistentes de RMSD entre 1,5 y 2,0 Å (1 nanómetro [nm] equivale a 10 Ångstroms [Å]). Estos resultados sugieren que ambas variantes mantienen una estructura compacta y con pocas fluctuaciones. Por otro lado, la variante FireProt tuvo un aumento significativo en el RMSD (\sim 4,6 Å, aproximadamente 0,46 nm) después de 8 ns, lo que sugiere una pérdida parcial en su organización estructural. La proteína control mostró cierta inestabilidad, aunque menor que FireProt, alcanzando valores alrededor de 3,5 Å (aproximadamente 0,35 nm), indicando que es algo sensible a estas condiciones térmicas (Figura 8).

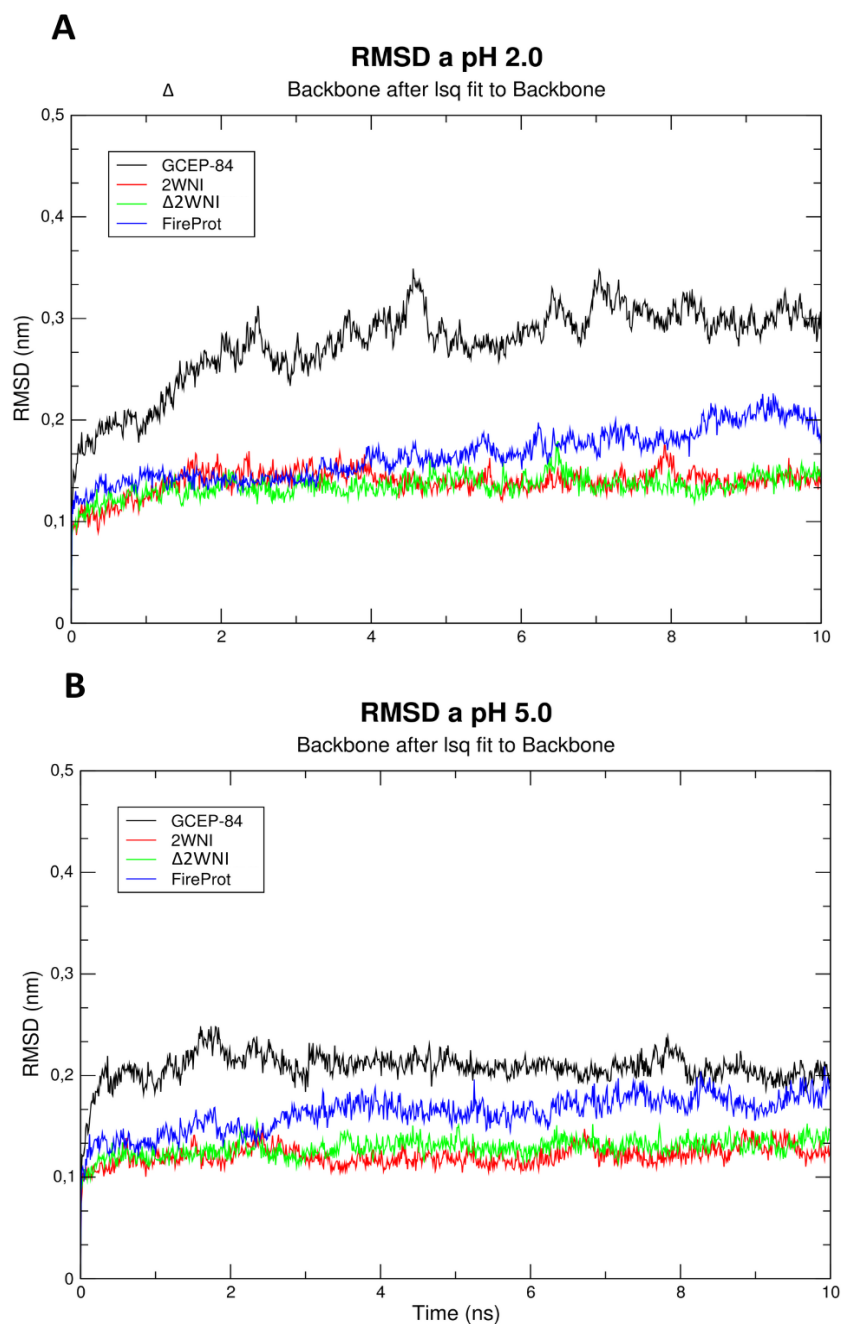
Al elevar la temperatura a 65 °C, las variantes 2WNI y Δ 2WNI continuaron mostrando buena estabilidad estructural, con RMSD entre 2,0 y 3,5 Å (0,2 a 0,35 nm). En contraste, la proteína control exhibió valores más elevados, entre 3,5 y 4,2 Å (0,35 a 0,42 nm), señalando mayor vulnerabilidad al calor.

A 80 °C, los resultados fueron parcialmente distintos: la variante FireProt destacó al mantener una estabilidad considerable con un RMSD constante alrededor de 1,5 Å (0,15 nm), mientras que Δ 2WNI y la proteína control mostraron valores altos (\sim 3,6 Å, alrededor de 0,36 nm), indicando mayor desorganización estructural.

En condiciones ácidas, específicamente a pH 2, los resultados resaltaron la gran inestabilidad estructural de la proteína control, que presentó un RMSD de aproximadamente 3,5 Å (0,35 nm). Por su parte, las variantes 2WNI y Δ 2WNI mantuvieron estabilidad notable, con desviaciones menores a 1,5 Å (0,15 nm). FireProt también mostró buena estabilidad, aunque presentó ligeras

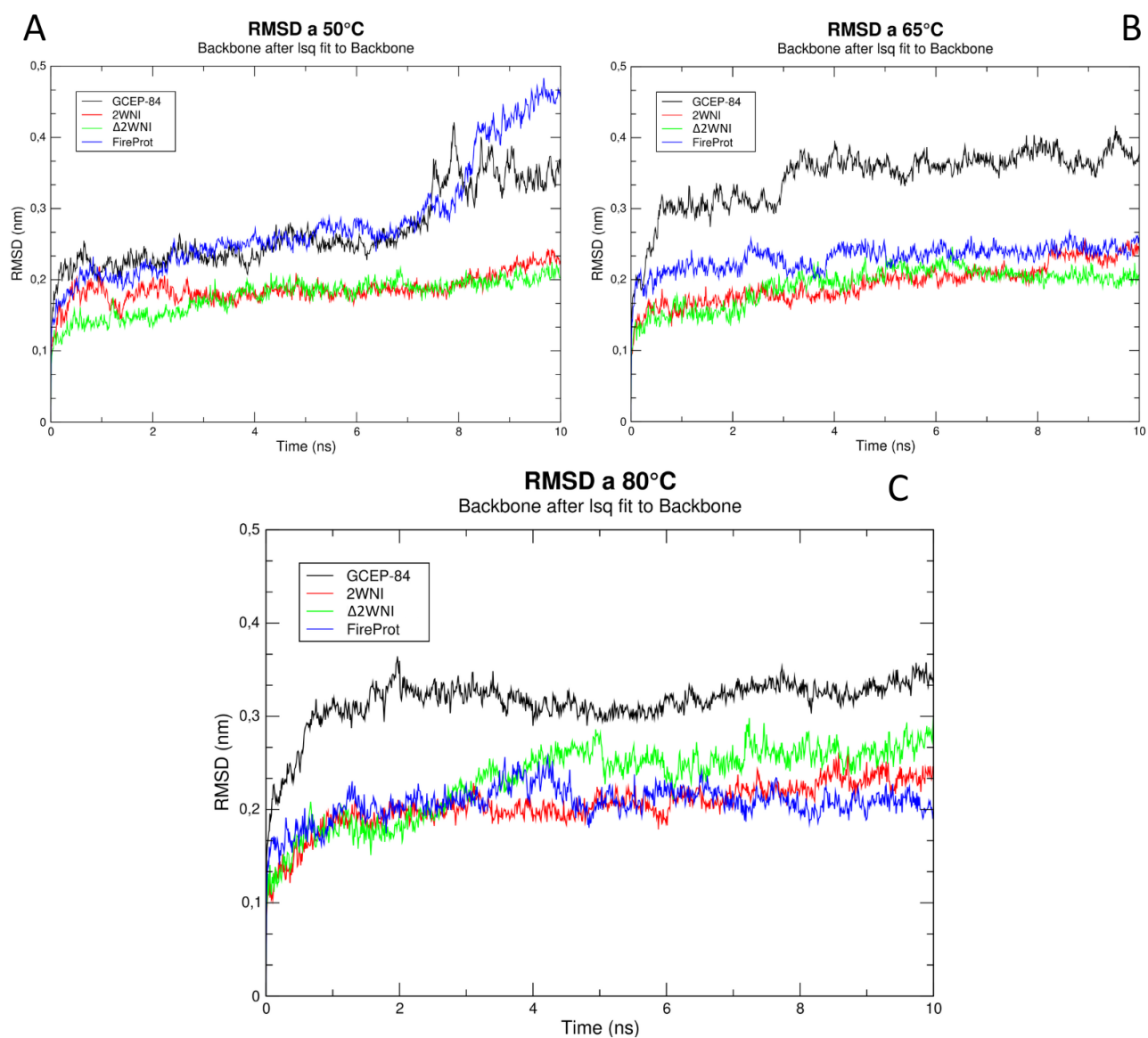
fluctuaciones con valores entre 1,3 y 2,2 Å (0,13 a 0,22 nm). Finalmente, a pH 5, todas las variantes se comportaron de manera más estable, destacando especialmente 2WNI y Δ2WNI (Figura 7).

Figura 7. Análisis de RMSD a pH 2.0 y 5.0



Nota. Gráficos de desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de las cuatro variantes de fitasa: GCEP-84 (negro), 2WNI (rojo), Δ 2WNI (verde) y FireProt (azul), simuladas a pH 2 (A) y pH 5 (B). Se observa la estabilidad estructural relativa de cada variante en condiciones de acidez extrema y moderada.

Figura 8. Análisis de RMSD a temperaturas de 50 °C, 65 °C y 80 °C.



Nota. Gráficos de RMSD de las variantes GCEP-84 (negro), 2WNI (rojo), Δ 2WNI (verde) y FireProt (azul), simuladas a 50 °C (A), 65 °C (B) y 80 °C (C). La figura permite comparar la estabilidad estructural de las proteínas bajo condiciones térmicas progresivamente más exigentes.

Los resultados obtenidos mediante dinámica molecular permiten concluir que las variantes 2WNI y Δ 2WNI presentan una estabilidad estructural sobresaliente en condiciones de temperatura moderada y acidez extrema, superando consistentemente a la proteína nativa GCEP-84. Por su parte, FireProt mostró un desempeño diferencial, con inestabilidad inicial a bajas temperaturas, pero una notable resistencia estructural a 80 °C, lo cual podría deberse a una reorganización interna favorecida por las mutaciones múltiples diseñadas para termoestabilidad. Estos patrones sugieren que diferentes estrategias de ingeniería conducen a perfiles de estabilidad específicos, siendo Δ 2WNI la variante con el mejor compromiso entre robustez térmica y tolerancia a pH ácido. Esta información es clave para orientar su aplicación potencial en entornos industriales exigentes, que es lo que se busca en este trabajo de grado.

4.5 Interacción proteína-ligando mediante acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular con AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) indicó que GCEP-84 presenta la mejor afinidad por su sustrato (-8,6 kcal/mol), reflejo de su conformación nativa óptima para interacciones catalíticas. Δ 2WNI conservó una afinidad alta (-8,1 kcal/mol), apenas por encima del umbral funcional (-8,0 kcal/mol), lo que sugiere que las mutaciones superficiales no impactaron adversamente la arquitectura del bolsillo catalítico (Trott & Olson, 2010) estos resultados son congruentes con su red de interacciones que consiste mayormente de interacciones iónicas estables y puentes de hidrógeno. Por el contrario, FireProt y 2WNI mostraron afinidades

menores ($-7,5$ y $-7,6$ kcal/mol), evidenciando el clásico compromiso entre estabilidad y actividad enzimática (Eijsink et al., 2005).

Tabla 3. Afinidad de unión y RMSD del modo mejor clasificado para cada variante

Proteína	Afinidad (kcal · mol ⁻¹)	RMSD l.b. (Å)	RMSD u.b. (Å)
GCEP-84	-8,6	0,000	0,000
FireProt	-7,6	0,000	0,000
2WNI	-7,6	0,000	0,000
Δ2WNI	-8,1	0,000	0,000

Nota. Los valores corresponden al modo 1 (mejor puntuado) de cada experimento de acoplamiento molecular; “l.b.” y “u.b.” indican los límites inferior y superior del RMSD, respectivamente.

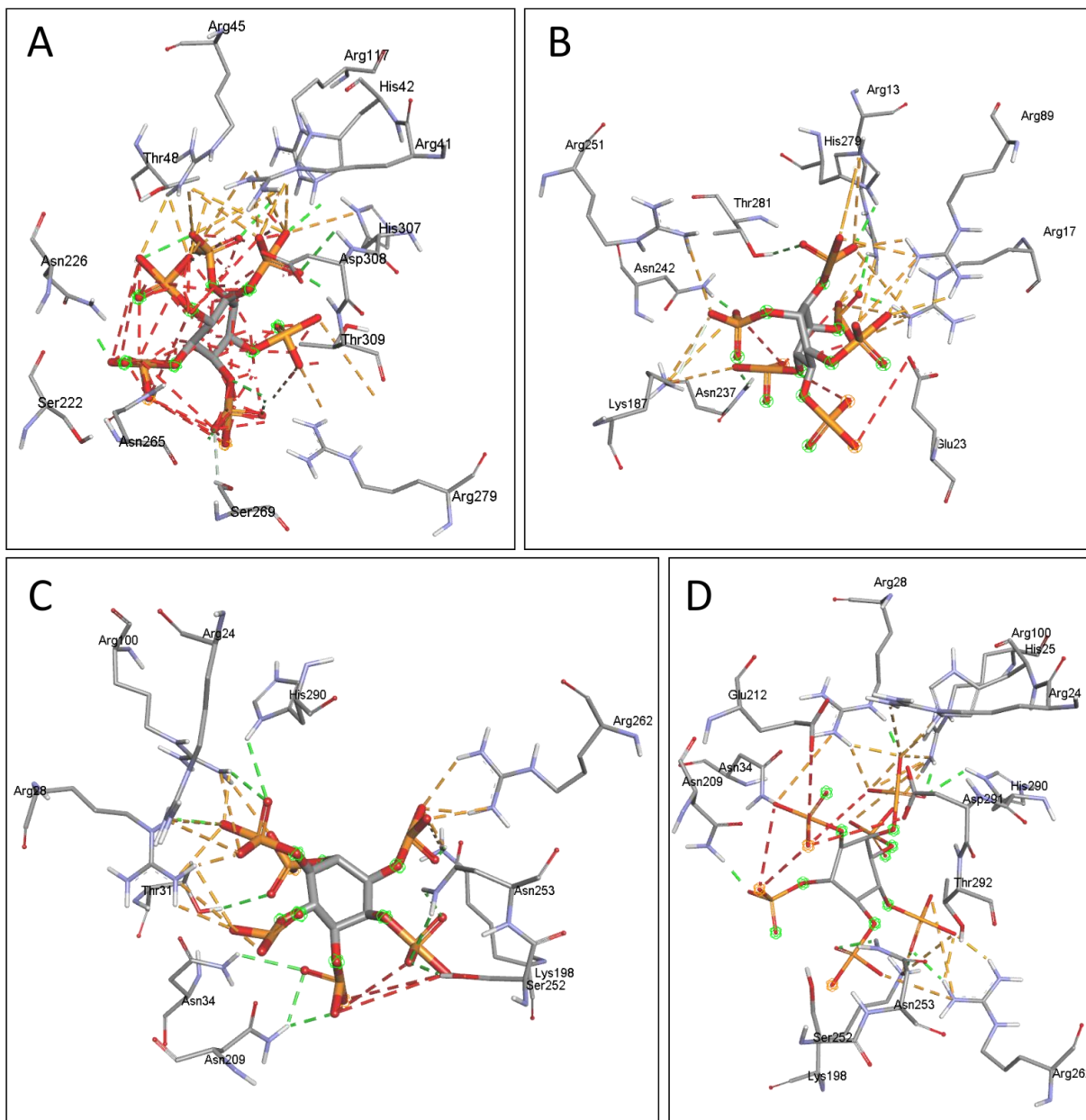
El patrón de interacción entre el ligando y los residuos del sitio activo se mantuvo constante entre las variantes, aunque se observaron pequeñas variaciones en la orientación y accesibilidad del bolsillo catalítico. En GCEP-84, los residuos involucrados en la interacción fueron R41, R45, T48, L115, R117, Y266, H307 y D308. En las variantes 2WNI y Δ2WNI, los residuos equivalentes fueron R24, R28, T31, L98, R100, Y249, H290 y D291, mientras que en FireProt corresponden a R13, R17, T20, L87, R89, Y238, H279 y D280 (Figura 9).

El análisis de las interacciones proteína-ligando realizado en Discovery Studio Visualizer permitió identificar diferencias cualitativas y cuantitativas en la red de interacciones estabilizadoras y desfavorables entre las variantes CGEP-84, FireProt, 2WNI y Δ2WNI. En la variante CGEP-84 se detectaron cinco enlaces de hidrógeno convencionales, seis interacciones de tipo puente salino o carga atractiva y una interacción desfavorable. La variante FireProt mostró

tres enlaces de hidrógeno convencionales, seis interacciones de tipo puente salino o carga atractiva y también una interacción desfavorable. Por su parte, la variante 2WNI presentó una red favorable, con seis enlaces de hidrógeno convencionales y cinco interacciones de tipo puente salino o carga atractiva, sin observarse interacciones desfavorables evidentes. Finalmente, la variante Δ 2WNI mostró tres enlaces de hidrógeno convencionales, seis interacciones de tipo puente salino o carga atractiva y dos interacciones desfavorables claras (Apéndices 1-4).

Se identificó que los residuos Arg y Lys contribuyen significativamente a las interacciones electrostáticas estabilizadoras, mientras que residuos polares como Asn, Thr y Ser participan predominantemente en los enlaces de hidrógeno convencionales. Las interacciones desfavorables detectadas en las variantes CGEP-84, FireProt y Δ 2WNI (como Asp o Glu), implican principalmente contactos negativos-negativos o aceptores no compensados.

Figura 9. Interacciones del sitio activo de las variantes de fitasa con el sustrato.



Nota. Representación de las interacciones moleculares entre las variantes de fitasa y el fitato en el sitio activo. Se muestran las interacciones de GCEP-84 (A), FireProt (B), 2WNI (C) y Δ 2WNI (D). Las líneas discontinuas indican interacciones no covalentes, como enlaces de

hidrógeno (verde), interacciones hidrofóbicas (rojo) y puentes salinos o interacciones iónicas (naranja).

Finalmente, al correlacionar los resultados de las simulaciones de dinámica molecular con los valores de afinidad obtenidos en el docking, se observó una tendencia interesante. Las variantes más estables estructuralmente, como FireProt y 2WNI, no necesariamente exhibieron la mejor afinidad por el sustrato. En contraste, Δ 2WNI logró un balance notable entre estabilidad térmica y retención de afinidad, lo que la convierte en una candidata prometedora para aplicaciones donde se requiere resistencia a condiciones adversas sin pérdida significativa de actividad.

5. Discusión

A continuación, integramos los hallazgos obtenidos a lo largo del estudio, cuyo objetivo principal fue diseñar variantes *in silico* de la fitasa GCEP-84 de *K. pneumoniae* con propiedades mejoradas de termoestabilidad y tolerancia a pH ácido. A través de herramientas bioinformáticas de modelado molecular, validación estructural, dinámica molecular y acoplamiento proteína-ligando, se caracterizaron comparativamente cuatro variantes: GCEP-84, 2WNI, Δ 2WNI y FireProt. Cada una de estas etapas permitió evaluar la calidad estructural, la conservación funcional y la viabilidad de las modificaciones introducidas. Analizaremos de forma crítica los resultados obtenidos, contrastándolos con la literatura científica y considerando sus implicaciones para futuras aplicaciones biotecnológicas.

5.1 Selección bibliográfica y modelado estructural

La elección de la estructura cristalográfica 2WNI como homólogo principal atiende a criterios de identidad y resolución óptimos para modelar la fitasa GCEP-84. Berman et al. (2000)

describen la relevancia de emplear estructuras experimentales existentes en la PDB para garantizar un modelado preciso. Los resultados obtenidos por el servidor FireProt al generar la variante FireProt concuerdan con observaciones previas que indican una baja proporción efectiva de mutaciones estabilizadoras identificadas mediante enfoques combinados (FoldX y Rosetta) de análisis energético y evolutivo (Bednar et al., 2015; Schymkowitz et al., 2005). Adicionalmente, la generación de los modelos tridimensionales de GCEP-84 y FireProt mediante I-TASSER brindó valores aceptables para proteínas de tamaño intermedio, de 400 aminoácidos aproximadamente, ya que indican confianza moderada en la topología global propuesta (Roy et al., 2010; Yang & Zhang, 2015).

En el caso de las variantes 2WNI y Δ 2WNI, la utilización de la herramienta *BuildModel* de FoldX para introducir mutaciones sobre la estructura de 2WNI garantizó que los cambios puntuales se incorporaran de manera estéricamente congruentes (Schymkowitz et al., 2005). Esta estrategia minimiza discrepancias locales y asegura que la geometría covalente y la red de interacciones de vecindad se conserven en gran medida, conforme a lo reportado por Guerois et al. (2002).

5.2 Validación estructural

La calidad de los modelos generados fue evaluada mediante MolProbity (Chen et al., 2010), permitiendo cuantificar la presencia de solapamientos atómicos (Clashscore), el porcentaje de rotámeros pobres y favorecidos, la distribución en el diagrama de Ramachandran, y la detección de desviaciones en geometría covalente. Para GCEP-84, un Clashscore de 11,97 (percentil 63) y un 6,43 % de residuos fuera de regiones favorecidas en Ramachandran reflejan imperfecciones esperables en estructuras generadas *ab initio* (Chen et al., 2010). Sin embargo, FireProt mostró un Clashscore notablemente inferior (4,91; percentil 94) y solo 5,24% de residuos en regiones

desfavorables, indicando que la reingeniería computacional aumentó la calidad estructural local y global (Chen et al., 2010). De igual manera, los porcentajes de rotámeros favorecidos para FireProt (81,12 %) y GCEP-84 (74,93 %) se alinean con los criterios sugeridos por Laskowski et al. (1996) para estructuras de resolución moderada.

En las variantes 2WNI y Δ 2WNI, la ausencia de residuos fuera de regiones permitidas de Ramachandran (0 % desfavorables) y un porcentaje elevado de residuos en zonas favorables (96,99 % y 96,69 %, respectivamente) sugieren que, al partir de una estructura cristalográfica de alta resolución, las mutaciones introducidas no perturbaron la tolerancia estérica de forma significativa (Chen et al., 2010; Lovell et al., 2003). Además, la baja frecuencia de desviaciones de $C\beta$ (<1,1 %) y la escasez de péptidos retorcidos indican una geometría covalente congruente con una conformación plegada de manera correcta (Lovell et al., 2003). Estos resultados confirman la robustez de los modelos y respaldan su uso para análisis posteriores.

5.3 Análisis comparativo de secuencias y estructuras

El alineamiento múltiple realizado con MAFFT permitió identificar mutaciones puntuales en las variantes 2WNI, Δ 2WNI y FireProt respecto a GCEP-84. Katoh y Standley (2013) resaltan que MAFFT ofrece balances óptimos entre precisión y tiempo computacional, especialmente en alineamientos extensos. Las 11 mutaciones en 2WNI (p. ej., A29R, H42A) se distribuyen a lo largo de la secuencia, lo que sugiere posibles efectos tanto en la estabilidad local de las proteínas como en la funcionalidad catalítica (Tokuriki, 2009). Δ 2WNI agrega dos mutaciones adicionales (A87E, S141N), que pueden regular la red de interacciones de superficie sin alterar el núcleo catalítico, lo cual coincide con estrategias previas de ingeniería de estabilidad superficial (Vieille & Zeikus, 2001). Por otro lado, FireProt presenta 23 mutaciones, entre las que destacan N51E y E88W, que introducen residuos con potencial de establecer interacciones específicas, como enlaces de

hidrógeno o contactos hidrofóbicos, que podrían contribuir a estabilizar regiones periféricas de la proteína (Reetz et al., 2006).

El análisis de identidad y similaridad a través de EMBOSS Needle (Rice et al., 2000) mostró que Δ 2WNI conserva un 97% de identidad con el control, seguido de 2WNI (96,7%) y FireProt (94,4%). Estos porcentajes reflejan el compromiso entre introducir mutaciones para aumentar la estabilidad y mantener la funcionalidad nativa (Arnold, 1998). En particular, la menor similaridad de FireProt sugiere un mayor grado de alejamiento de la secuencia parental, de acuerdo a su objetivo de optimización de estabilidad.

La superposición estructural en PyMOL reveló que todas las variantes estudiadas mantienen el núcleo plegado característico de la fitasa GCEP-84. La variante FireProt mostró cambios notables en su estructura secundaria, destacando especialmente la conversión de algunos bucles en hélices α , lo que incrementó el número total de hélices de 11 a 13, y de láminas β de nueve a 10 (Baker et al., 2007). Este incremento de estructura secundaria, tales como hélices α y láminas β , está relacionado con una mayor rigidez y estabilidad térmica en proteínas (Kumar & Nussinov, 2001). Por su parte, las variantes 2WNI y Δ 2WNI conservaron la composición global de 13 hélices α y ocho láminas β , sugiriendo que la mutación puntual en la posición 25 (H25A frente a A25H) no produjo modificaciones significativas a nivel estructural, aunque podría afectar interacciones superficiales locales.

Estos resultados concuerdan con los valores de RMSD obtenidos durante la comparación estructural frente a la proteína control, los cuales indicaron desviaciones globales menores a 1 Å en todas las variantes analizadas. FireProt mostró el valor más bajo (0,643 Å), indicando una conservación superior del pliegue tridimensional respecto al control, mientras que 2WNI y Δ 2WNI mostraron valores ligeramente mayores (0,761 y 0,762 Å, respectivamente). Estas pequeñas

desviaciones estructurales soportan cuantitativamente las diferencias locales observadas en regiones periféricas flexibles. Este análisis se fundamenta en el RMSD, métrica utilizada para cuantificar similitudes y diferencias estructurales en proteínas alineadas tridimensionalmente (Kufareva & Abagyan, 2012).

Las mutaciones mayormente localizadas en la superficie confirman la estrategia de mantener el núcleo catalítico intacto al rodear residuos próximos a R41 y T48, lo que sugiere que estas mutaciones, al localizarse en regiones cercanas, pero no directamente implicadas en la catálisis, podrían modificar sutilmente la dinámica local sin comprometer la función enzimática (Bloom & Arnold, 2009). $\Delta 2\text{WNI}$, al evitar cambios cercanos al centro catalítico, retiene la geometría del bolsillo y, por tanto, la actividad nativa (Tokuriki & Tawfik, 2009).

El análisis electrostático con APBS (Baker et al., 2001) demostró que FireProt presenta una superficie predominantemente positiva, lo cual favorece interacciones iónicas sólidas a pH ácido (Nezhad et al., 2020). En GCEP-84, la distribución equilibrada de cargas sugiere una facilidad para formar puentes salinos y adaptarse a fluctuaciones de pH (Kumar et al., 2000). Las variantes 2WNI y $\Delta 2\text{WNI}$ mostraron patrones electrostáticos similares, a pesar de que $\Delta 2\text{WNI}$ exhibió un bolsillo menos positivo en la vista posterior, lo que podría regular la accesibilidad del sustrato en condiciones ácidas (Tran et al., 2011). Estas diferencias apoyan la hipótesis de que la redistribución de cargas en FireProt contribuye a su resistencia en entornos de pH bajo.

5.4 Estabilidad estructural mediante dinámica molecular

Las simulaciones a 50 °C, 65 °C y 80 °C reflejaron la respuesta diferencial de cada variante a la tensión térmica. A 50 °C, 2WNI y $\Delta 2\text{WNI}$ mantuvieron un RMSD entre 1,5 Å (0,15 nm) y 2,0 Å (0,20 nm), consistente con estructuras compactas y baja fluctuación, en concordancia con estudios previos que asocian pequeñas desviaciones de RMSD con robustez térmica (Karshikoff

& Ladenstein, 2001). FireProt, en cambio, mostró un pico de RMSD de $\sim 4,6$ Å (0,46 nm) tras 8 ns, indicando reorganización parcial, un fenómeno reportado en variantes diseñadas para termoestabilidad, donde aumentos iniciales de RMSD pueden preceder a una conformación más estable a largo plazo (Purmonen et al., 2007).

Al incrementar la temperatura a 65 °C, 2WNI y $\Delta 2$ WNI continuaron con RMSD bajos (1,2–2,0 Å; 0,12–0,20 nm), mientras que GCEP-84 presentó valores más altos ($\sim 3,5$ a 4,2 Å; 0,35 a 0,42 nm), evidenciando alta sensibilidad térmica, tal como otros estudios han descrito para fitasas mesófilas (Noorbacha et al., 2013). A 80 °C, la inversión de la tendencia, con FireProt estabilizándose cerca de 1,5 Å (0,15 nm) y $\Delta 2$ WNI alcanzando $\sim 3,6$ Å (0,36 nm), sugiere que las mutaciones de FireProt confieren ventajas de interacción interna que solo se manifiestan a temperaturas elevadas, coincidiendo con el concepto de “termoflexibilidad controlada” (Vieille & Zeikus, 2001).

En condiciones de pH ácido, la inestabilidad de GCEP-84 (RMSD $\sim 3,5$ Å; 0,35 nm a pH 2,0) contrasta con la estabilidad de 2WNI y $\Delta 2$ WNI ($< 1,5$ Å; $< 0,15$ nm), lo que demuestra que las mutaciones puntuales en estos mutantes mejoran la tolerancia al medio ligeramente desfavorable para la red interna de enlaces de hidrógeno (Huang et al., 2008). FireProt, aunque más estable que el control, exhibió RMSD entre 1,3 y 2,2 Å (0,13 a 0,22 nm), lo cual se ajusta a su perfil de resistencia mixta (Bednar et al., 2015). A pH 5,0 se observó que todas las variantes mejoran su estabilidad, con 2WNI y $\Delta 2$ WNI aún líderes, corroborando que los cambios superficiales introducidos minimizan la desestabilización por protonación excesiva de residuos cargados (Abbasi et al., 2022). Estos hallazgos coinciden con el paradigma de que la ingeniería de superficie para introducir cargas compensatorias o eliminar interacciones de alta energía (p. ej., mutar histidinas en posiciones estratégicas) mejora la estabilidad en entornos extremos (Sterpone

et al., 2010; Kumar & Nussinov, 2001). Teniendo en cuenta los resultados, las simulaciones de dinámica molecular confirman que el diseño racional de la proteína puede modular exitosamente la estabilidad estructural de las fitasas, bajo condiciones extremas. $\Delta 2\text{WNI}$ se destaca por mantener un equilibrio favorable entre estabilidad térmica y tolerancia a pH ácido, sin comprometer significativamente la arquitectura catalítica. FireProt, por su parte, exhibe una termoestabilidad destacada a 80 °C, lo que podría ser aprovechable en contextos de alta exigencia térmica, aunque con una ligera penalización en la afinidad por el sustrato. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la ubicación y naturaleza de las mutaciones son determinantes clave en el perfil estructural y funcional de las variantes, y aportan evidencia concreta para la selección de candidatos en futuras validaciones experimentales.

5.5 Interacción proteína-ligando mediante acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular con AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) indicó que GCEP-84 presenta la mejor afinidad por su sustrato (-8,6 kcal/mol), reflejo de su conformación nativa óptima para interacciones catalíticas. $\Delta 2\text{WNI}$ conservó una afinidad alta (-8,1 kcal/mol), apenas por encima del umbral funcional (-8,0 kcal/mol), lo que sugiere que las mutaciones superficiales no impactaron adversamente la arquitectura del bolsillo catalítico (Trott & Olson, 2010) estos resultados son congruentes con su red de interacciones que consiste mayormente de interacciones iónicas estables y puentes de hidrógeno. Por el contrario, FireProt y 2WNI mostraron afinidades menores (-7,5 y -7,6 kcal/mol), evidenciando el clásico compromiso entre estabilidad y actividad enzimática (Eijsink et al., 2005).

En todas las variantes, los residuos catalíticos clave permanecen inalterados, aunque con numeración diferente debido a procesamiento en la secuencia. No se produjeron mutaciones en el núcleo catalítico. Sin embargo, los diagramas de interacción revelan ligeras variaciones en la

orientación y distancia de estos residuos respecto al ligando, debido a cambios conformacionales inducidos por mutaciones periféricas. Estos ajustes sutiles pueden incidir en la geometría del bolsillo y, como consecuencia, penalizar la afinidad de unión, sin comprometer la arquitectura esencial de la catálisis (Xiang et al., 2004; Rahman et al., 2019; Böhm et al., 2010).

La correlación entre estabilidad y afinidad evidencia que, aunque FireProt logra la mayor robustez a altas temperaturas, sacrifica parte de la eficiencia de unión. $\Delta 2\text{WNI}$, en cambio, logra un balance atractivo: alta estabilidad térmica y ácida junto con afinidad casi equiparable al control. Estos hallazgos sugieren un equilibrio favorable entre estabilidad térmica y tolerancia a pH ácido, manteniendo en gran medida la arquitectura catalítica intacta (Reetz et al., 2010; Chen et al., 2013).

6. Conclusiones

Los resultados presentan un panorama coherente de cómo las diferentes estrategias de ingeniería (modificación superficial en 2WNI/ $\Delta 2\text{WNI}$ vs. abordaje extensivo en FireProt) impactan la estabilidad estructural y la funcionalidad. La variante $\Delta 2\text{WNI}$ emerge como candidata óptima para aplicaciones industriales en condiciones adversas, al combinar resistencia térmica y ácida con una afinidad de sustrato cercana a la de la proteína nativa. Las métricas de validación estructural y los patrones de electrostática revelan los mecanismos moleculares subyacentes, mientras que la dinámica molecular y el docking profundizan en el comportamiento funcional en contextos extremos. Estas observaciones se alinean con estudios previos en ingeniería de fitasas (Nezhad et al., 2020; Fakhravar & Hesampour, 2018) que subrayan el potencial de mutaciones superficiales dirigidas para diseñar enzimas versátiles sin perder eficiencia catalítica.

Referencias Bibliográficas

- Abbasi Kheirabadi, M., Saffar, B., Hemmati, R., & Mortazavi, M. (2022). Thermally stable and acidic pH tolerant mutant phytases with high catalytic efficiency from *Yersinia intermedia* for potential application in feed industries. *Environmental science and pollution research international*, 29(22), 33713–33724. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18578-4>
- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Arnold, F. H. (1998). Design by Directed Evolution. *Accounts of Chemical Research*, 31(3), 125–131. <https://doi.org/10.1021/ar960017f>
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10037–10041. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>
- Bednar, D., Beerens, K., Sebestova, E., Bendl, J., Khare, S., Chaloupkova, R., Prokop, Z., Brezovsky, J., Baker, D., & Damborsky, J. (2015). FireProt: Energy- and evolution-based computational design of thermostable multiple-point mutants. *PLOS Computational Biology*, 11(11), e1004556. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004556>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bloom, J. D., & Arnold, F. H. (2009). In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 Suppl 1(Suppl 1), 9995–10000. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901522106>

- Bohn, L., Meyer, A. S., & Rasmussen, S. K. (2008). Phytate: Impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University: Science B* 9(3), 165–191. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710640>
- Böhm, K., Herter, T., Müller, J. J., Borriss, R., & Heinemann, U. (2010). Crystal structure of *Klebsiella* sp. ASR1 phytase suggests substrate binding to a preformed active site that meets the requirements of a plant rhizosphere enzyme. *The FEBS journal*, 277(5), 1284–1296. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07559.x>
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397), 185–194. <https://doi.org/10.1038/nature11117>
- Chen, C. C., Cheng, K. J., Ko, T. P., & Guo, R. T. (2015). Current Progresses in Phytase Research: Three-Dimensional Structure and Protein Engineering. In *ChemBioEng Reviews* 2(2) 76–86. <https://doi.org/10.1002/cben.201400026>
- Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66, 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *Journal of Environmental Quality*, 27(2), 261–266. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020004x>
- Dassault Systèmes BIOVIA. (2023). *Discovery Studio Visualizer* (Versión 2023) [Software]. Dassault Systèmes. <https://www.3ds.com/products-services/biovia/>

- Driver, J. P., Pesti, G. M., Bakalli, R. I., & Edwards, H. M., Jr. (2006). The effect of feeding calcium- and phosphorus-deficient diets to broiler chickens during the starting and growing-finishing phases on carcass quality. *Poultry Science*, 85(11), 1939–1946. <https://doi.org/10.1093/ps/85.11.1939>
- Duke University. (s.f.). *MolProbity* [Software]. <http://molprobity.biochem.duke.edu>
- Eijsink, V. G., Gåseidnes, S., Borchert, T. V., & Van den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular engineering*, 22(1-3), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2004.12.003>
- Elkhalil, E. A. I., Männer, K., Borriss, R., & Simon, O. (2007). *In vitro* and *in vivo* characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *British Poultry Science*, 48(1), 64–70. <https://doi.org/10.1080/00071660601148195>
- Fakhravar, A.; Hesampour, A. (2018). Rational design-based engineering of a thermostable phytase by site-directed mutagenesis. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2053–2061. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4362-x>
- Giver, L., Gershenson, A., Freskgård, P. O., & Arnold, F. H. (1998). Directed evolution of a thermostable esterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 12809–12813. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.12809>
- Goldenzweig, A., Goldsmith, M., Hill, S. E., Gertman, O., Laurino, P., Ashani, Y., Dym, O., Unger, T., Albeck, S., Prilusky, J., Lieberman, R. L., Aharoni, A., Silman, I., Sussman, J. L., Tawfik, D. S., & Fleishman, S. J. (2016). Automated structure- and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability. *Molecular Cell*, 63(2), 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.012>

- Gribenko, A. V., & Makhatadze, G. I. (2007). Role of the charge-charge interactions in defining stability and halophilicity of the CspB proteins. *Journal of Molecular Biology*, 366(3), 842–856. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.061>
- Guazzaroni, M. E., Silva-Rocha, R., & Ward, R. J. (2015). Synthetic biology approaches to improve biocatalyst identification in metagenomic library screening. In *Microbial Biotechnology* 8(1), 52–64. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12146>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Honig, B., & Nicholls, A. (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science*, 268(5214), 1144–1149. <https://doi.org/10.1126/science.7761829>
- Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Fu, D., Shao, N., Wang, G., Yang, P., & Yao, B. (2008). A novel phytase from *Yersinia rohdei* with high phytate hydrolysis activity under low pH and strong pepsin conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(3), 417–426. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1556-5>
- Karshikoff, A., & Ladenstein, R. (1998). Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein engineering*, 11(10), 867–872. <https://doi.org/10.1093/protein/11.10.867>
- Karshikoff, A., & Ladenstein, R. (2001). Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *Trends in biochemical sciences*, 26(9), 550–556. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01918-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01918-1)

- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kufareva, I., & Abagyan, R. (2012). Methods of protein structure comparison. In A. Orry & R. Abagyan (Eds.), *Homology modeling* (Vol. 857, pp. 231–257). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10
- Kumar, S., Ma, B., Tsai, C. J., & Nussinov, R. (2000). Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers. *Proteins*, 38(4), 368–383. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(20000301\)38:4<368::aid-prot3>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(20000301)38:4<368::aid-prot3>3.0.co;2-r)
- Kumar, S., & Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cellular and molecular life sciences*, 58(9), 1216–1233. <https://doi.org/10.1007/PL00000935>
- Kumar, S., & Nussinov, R. (2002). Close-range electrostatic interactions in proteins. *ChemBioChem*, 3(7), 604–617. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X)
- Leaver-Fay, A., Tyka, M., Lewis, S. M., Lange, O. F., Thompson, J., Jacak, R., ... Bradley, P. (2011). Rosetta3. *Methods in Enzymology*, 545–574. <https://doi:10.1016/b978-0-12-381270-4.00019-6>
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., & Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase: Source, structure and application. In *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (pp. 505–529). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_29
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., 3rd, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2003). Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*, 50(3), 437–450. <https://doi.org/10.1002/prot.10286>

- Lönnerdal, B. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1378S–1383S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1378S>
- Mak, W. S., & Siegel, J. B. (2014). Computational enzyme design: transitioning from catalytic proteins to enzymes. *Current opinion in structural biology*, 27(87–94). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.05.010>
- Musil, M., Stourac, J., Bendl, J., Brezovsky, J., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2017). FireProt: Energy- and evolution-based computational design of thermostable multiple-point mutants. *PLOS Computational Biology*, 13(11), e1005600. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005600>
- Mullaney, E. J., & Ullah, A. H. J. (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(1), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.176>
- National Center for Biotechnology Information. (2023). *BLASTp* [Herramienta en línea]. U.S. National Library of Medicine. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nezhad, N. G.; Raja Abd Rahman, R. N. Z.; Normi, Y. M.; Oslan, S. N.; Shariff, F. M.; Leow, T. C. (2020). Integrative Structural and Computational Biology of Phytases for the Animal Feed Industry. *Catalysts*, 10(8), 844. <https://doi.org/10.3390/catal10080844>
- Noorbacha, I. A., Sultan, A. M., Salleh, H. M., & Amid, A. (2013). Understanding thermostability factors of *Aspergillus niger* PhyA phytase: a molecular dynamics study. *The protein journal*, 32(4), 309–316. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9489-y>
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2), 525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>

- Raboy, V. (2009). Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. In *Plant Science* (Vol. 177, Issue 4, pp. 281–296). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.012>
- Raboy, V., Young, K. A., Dorsch, J. A., & Cook, A. (2001). Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. In *J. Plant Physiol* (Vol. 158). <http://www.urbanfischer.de/journals/jpp>
- Rebello, S., Jose, L., Sindhu, R., & Aneesh, E. M. (2017). Molecular advancements in the development of thermostable phytases. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 101, Issue 7, pp. 2677–2689). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8195-7>
- Reddy, C. S., Kim, S. C., & Kaul, T. (2017). Genetically modified phytase crops role in sustainable plant and animal nutrition and ecological development: a review. In *3 Biotech* (Vol. 7, Issue 3). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0797-3>
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., & Vogel, A. (2006). Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45(46), 7745–7751. <https://doi.org/10.1002/anie.200602795>
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D., & Lohmer, R. (2008). Addressing the numbers problem in directed evolution. *ChemBioChem*, 9(11), 1797–1804. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800298>
- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16(6), 276–277. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2)
- Romano, N., & Kumar, V. (2018). Phytase in animal feed. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives* (pp. 73–88). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00004-6>

- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Royal Society of Chemistry. (2023). *ChemSpider* [Base de datos química]. <http://www.chemspider.com/>
- Rutherford, S. M., Chung, T. K., & Moughan, P. J. (2014). Effect of microbial phytase on phytate P degradation and apparent digestibility of total P and Ca throughout the gastrointestinal tract of the growing pig. *Journal of Animal Science*, 92(1), 189–197. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6923>
- Purmonen, M., Valjakka, J., Takkinen, K., Laitinen, T., & Rouvinen, J. (2007). Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases. *Protein Engineering, Design & Selection*, 20(11), 551–559. <https://doi.org/10.1093/protein/gzm056>
- Sanner, M. F. (1999). Python: A programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17(1), 57–61. No DOI.
- Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P., Müller, E.-C., & Borriss, R. (2004). Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 110–118. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1530-1>
- Schrödinger, LLC. (2023). The PyMOL Molecular Graphics System (Version 2.5). <https://pymol.org/>
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., & Serrano, L. (2005). The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gki387>
- Schymkowitz, J. W., Rousseau, F., Martins, I. C., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., & Serrano, L. (2005). Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force

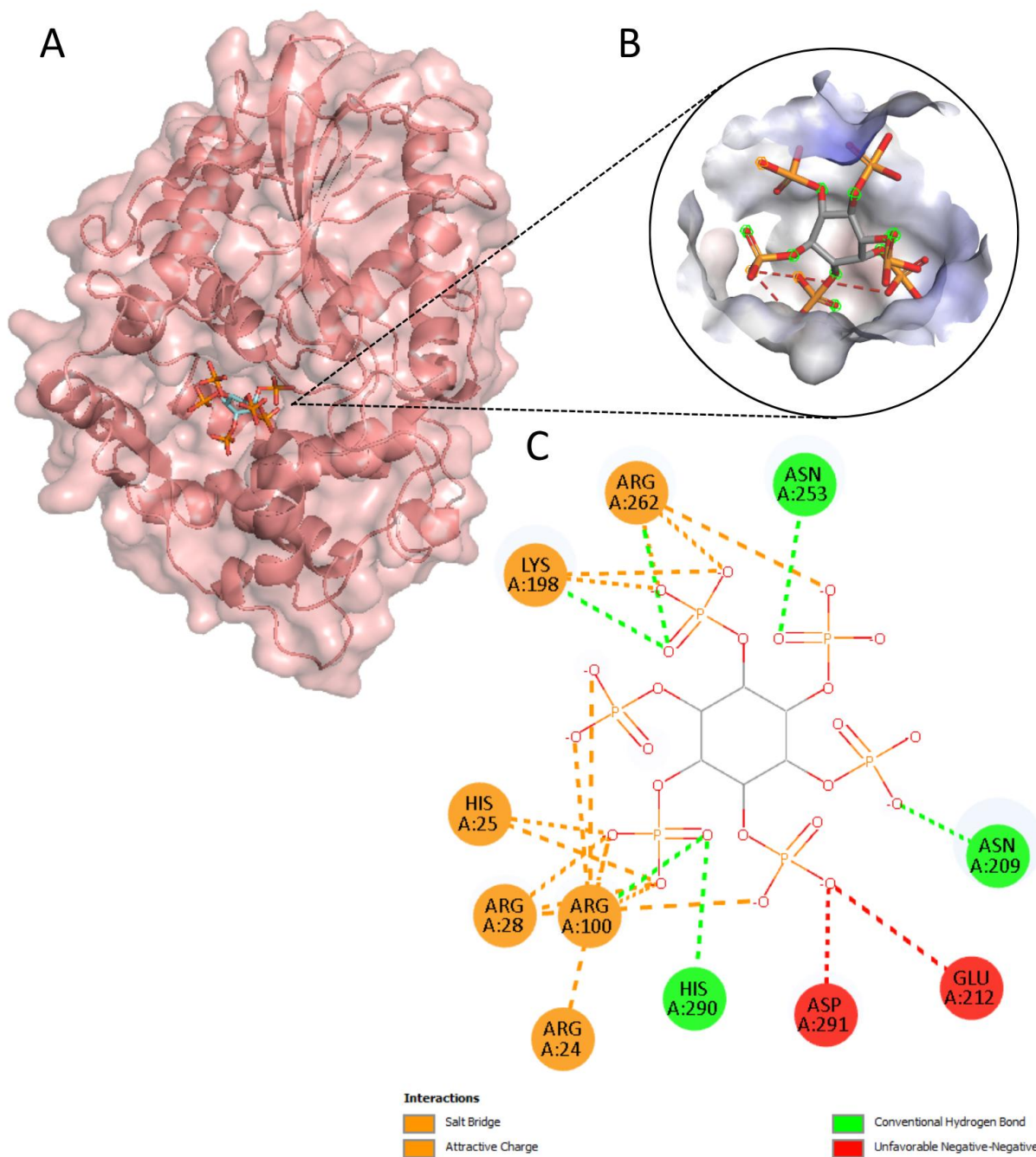
- field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), 10147–10152. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501980102>
- Selle, P. H., & Ravindran, V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. In *Animal Feed Science and Technology* (Vol. 135, Issues 1–2, pp. 1–41). <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>
- Selle, P. H., & Ravindran, V. (2008). Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. In *Livestock Science* (Vol. 113, Issues 2–3, pp. 99–122). <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.05.014>
- Sharpley, A. N., McDowell, R. W., & Kleinman, P. J. A. (2001). Phosphorus loss from land to water: Integrating agricultural and environmental management. *Plant and Soil*, 237(2), 287–307. <https://doi.org/10.1023/A:1013363905530>
- Shi, J., Wang, H., Schellin, K., Li, B., Faller, M., Stoop, J. M., Meeley, R. B., Ertl, D. S., Ranch, J. P., & Glassman, K. (2007). Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nature Biotechnology*, 25(8), 930–937. <https://doi.org/10.1038/nbt1322>
- Shivange, A. V., & Schwaneberg, U. (2017). Recent advances in directed phytase evolution and rational phytase engineering. In *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications* (pp. 145–172). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50413-1_6
- Singh, B., & Satyanarayana, T. (2011). Phytases from thermophilic molds: Their production, characteristics and multifarious applications. *Process Biochemistry*, 46(7), 1391–1398. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.009>
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100(1–3), 179–196. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3)

- Sterpone, F., Bertonati, C., Briganti, G., & Melchionna, S. (2010). Water around thermophilic proteins: The role of charged and apolar atoms. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 22(28), 284113. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/28/284113>
- Sora, V., Laspiur, A. O., Degn, K., Arnaudi, M., Utichi, M., Beltrame, L., De Menezes, D., Orlandi, M., Stoltze, U. K., Rigina, O., Sackett, P. W., Wadt, K., Schmiegelow, K., Tiberti, M., & Papaleo, E. (2023). RosettaDDGPrediction for high-throughput mutational scans: From stability to binding. *Protein Science*, 32(1). <https://doi.org/10.1002/pro.4527>
- Tokuriki, N., & Tawfik, D. S. (2009). Stability effects of mutations and protein evolvability. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(5), 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.08.003>
- Tran, T., Mamo, G., Buxó, L., Nhi, N., Gaber, Y., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2011). Site-directed mutagenesis of an alkaline phytase: Influencing specificity, activity and stability in acidic milieu. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.05.012>
- Trott, O., & Olson, A. J. (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>
- Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M., & McKelvie, I. D. (2002). Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1420), 449–469. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0837>
- Ushasree, M. V., Shyam, K., Vidya, J., & Pandey, A. (2017). Microbial phytase: Impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications. *Bioresource Technology*, 245, 1790–1799. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.060>

- Ushasree, M. V., Vidya, J., & Pandey, A. (2016). Other Enzymes: Phytases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 309–333). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00014-2>
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1–43.
- Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current protocols in bioinformatics*, 54, 5.6.1–5.6.37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
- Wodzinski, R. J., & Ullah, A. H. J. (1996). Phytase. *Advances in Applied Microbiology*, 42, 263–302. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70375-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70375-7)
- Xiang, T., Liu, Q., Deacon, A. M., Koshy, M., Kriksunov, I. A., Lei, X. G., Hao, Q., & Thiel, D. J. (2004). Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine. *Journal of molecular biology*, 339(2), 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.057>
- 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>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zheng, L., Baumann, U., & Reymond, J. L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic acids research*, 32(14), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh110>

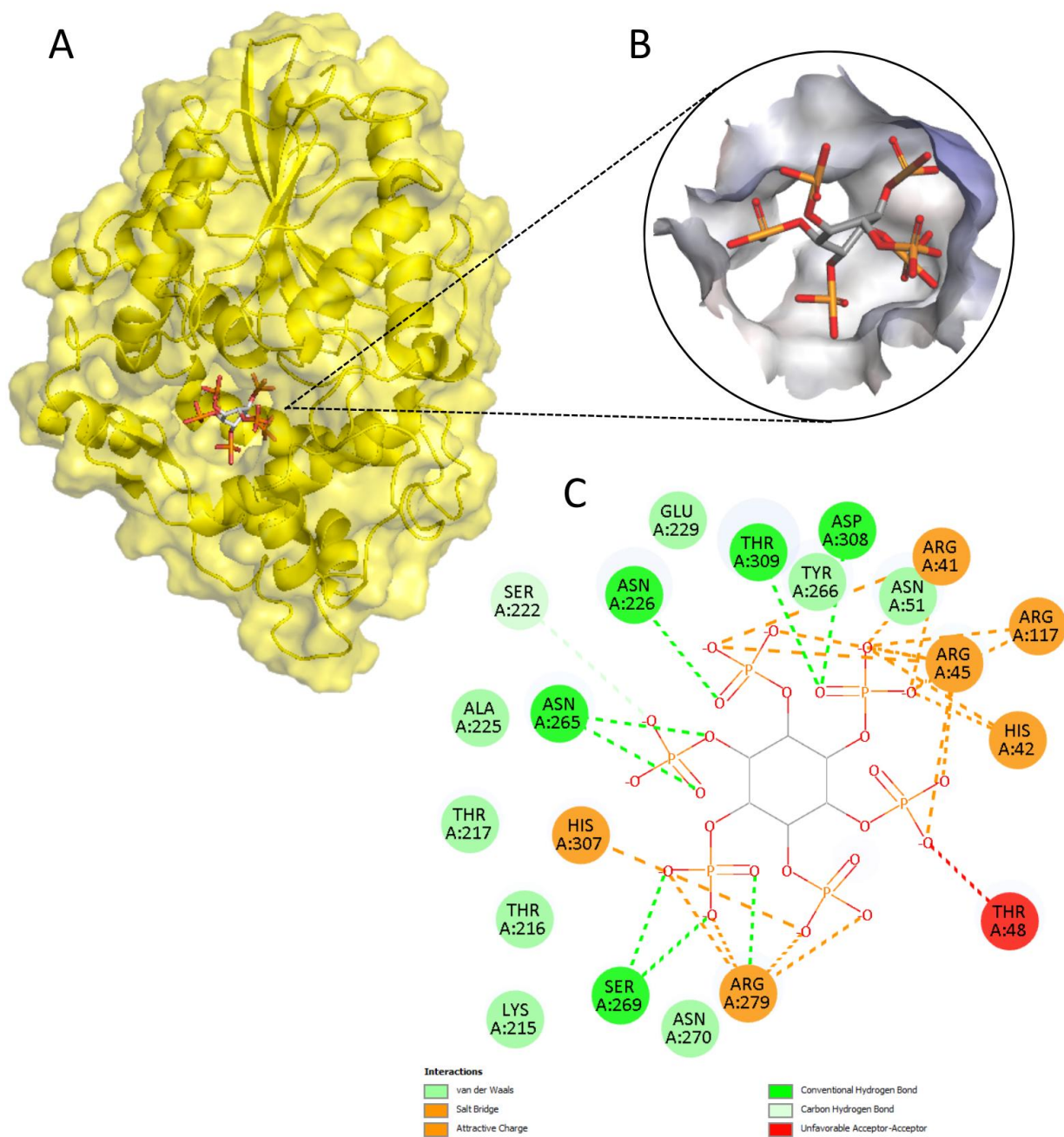
Apéndices

Apéndice A. Interacciones proteína–ligando en la variante $\Delta 2WNI$



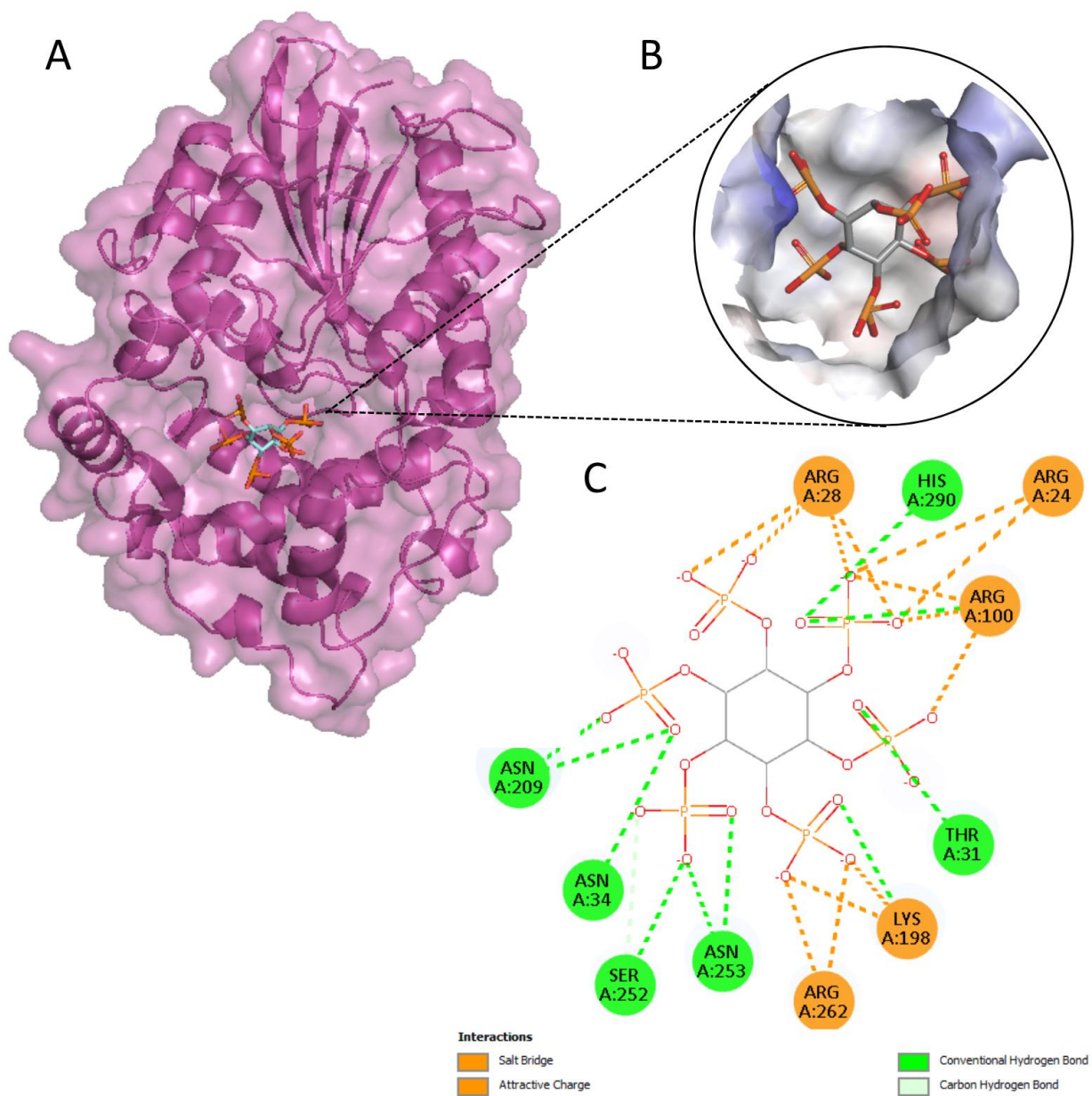
Nota. Análisis de las interacciones moleculares en la variante $\Delta 2WNI$ mediante visualizaciones estructurales (A y B) y diagrama de interacciones 2D (C).

Apéndice B. Interacciones proteína–ligando en la variante GCEP-84



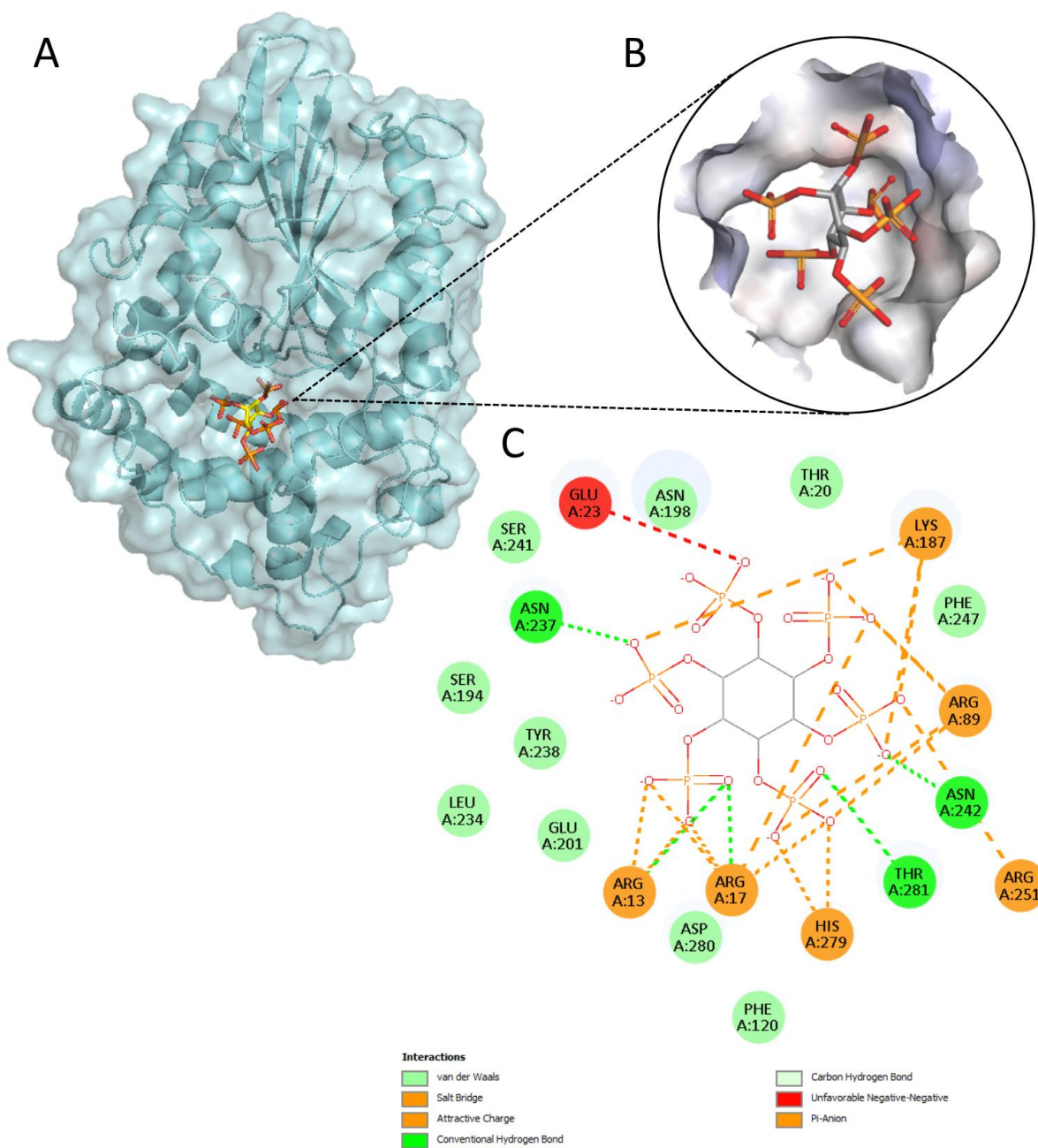
Nota. Análisis de las interacciones moleculares en la variante CGEP-84 mediante visualizaciones estructurales (A y B) y diagrama de interacciones 2D (C).

Apéndice C. Interacciones proteína–ligando en la variante 2WNI



Nota. Análisis de las interacciones moleculares en la variante 2WNI mediante visualizaciones estructurales (A y B) y diagrama de interacciones 2D (C).

Apéndice D. *Interacciones proteína–ligando en la variante FireProt*



Nota. Análisis de las interacciones moleculares en la variante FireProt mediante visualizaciones estructurales (A y B) y diagrama de interacciones 2D (C).