



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema: Análisis estructural de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* y enzimas homólogas

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Adriana Alexandra Aguirre Muñoz

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato-Ecuador

Marzo 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 11 de febrero del 2022

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 110360547-1

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Aguirre Muñoz Adriana Alexandra, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

Adriana Alexandra Aguirre Muñoz

C.I. 180528683-6

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente de Tribunal

Dr. Irvin Ricardo Tubón Usca

CI: 0604250357

Dr. Santiago Casado Rojo

CI: 1759126954

Ambato, 11 de marzo de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

.....
Adriana Alexandra Aguirre Muñoz

C.I. 1805286836

AUTORA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios, quien con su guía y protección divina me ha permitido alcanzar este logro tan importante en mi vida.

A mis padres, Lida Muñoz y Miguel Aguirre, quienes han sido un pilar fundamental para mi formación profesional y personal.

A mis abuelitos Ángel Muñoz y América Pazos, quienes me han brindado todo su cariño y afecto durante mi trayectoria estudiantil.

A mi hermano Adrián Aguirre, quien siempre ha formado parte de mi vida y me brindado su ayuda constante.

A mi querida tía Carmen Muñoz, por todo el apoyo y confianza que me ha brindado a lo largo de mi vida universitaria.

A mi primo Javier Gavilánez, quien a pesar de la distancia y circunstancias siempre me cuido y aconsejo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la fuerza y valor de seguir siempre adelante, por ser mi mejor refugio y fortaleza ante las dificultades, porque sin su presencia en mi vida el alcanzar este logro hubiese sido imposible.

A mis padres Lida Muñoz y Miguel Aguirre, por todo su esfuerzo y dedicación, porque sin ellos el culminar esta meta no sería posible, les agradezco por toda la confianza y cariño brindado durante toda mi vida tanto personal como estudiantil. A mi hermano porque a pesar de los problemas o circunstancias siempre ha estado dispuesto a ayudarme. A mis abuelitos América Pazos y Ángel Muñoz, les agradezco por todo el apoyo emocional que me dieron, porque con sus palabras de cariño y afecto me motivaron a nunca rendirme y superarme cada día más. A toda mi familia en general, especialmente a mi tía Carmen Muñoz quien siempre estuvo presente a lo largo de mi vida personal y estudiantil ofreciéndome en todo momento su ayuda constante y sincera. A mi primo Javier Gavilanes por todos sus consejos y cuidados continuos, porque a pesar de la distancia nunca me dejó sola. A mi amada prima Abigail Muñoz por formar parte de mi vida y regalarme momentos únicos y divertidos a su lado.

A mi querida amiga y compañera Patricia Dávalos por todos los buenos momentos compartidos a lo largo de la carrera y por su ayuda incondicional tanto en lo académico como en lo personal. A mi gran amiga Abigail Manzano, por toda la comprensión, soporte emocional y espiritual que me supo ofrecer cuando más lo necesite, por siempre motivarme a ser una mejor persona y no desfallecer ante las dificultades de la vida.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por permitirme realizar mis estudios y formarme como profesional. Le agradezco a mi tutor PhD. Mario García por el tiempo y esfuerzo dedicado, por sus valiosos conocimientos brindados para el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Polietileno tereftalato en el medioambiente.....	1
1.1.2. Estructura del PET	3
1.1.3. Degradación del PET	4
1.1.3.1. Reciclaje químico	4
1.1.3.2. Reciclaje Físico	4
1.1.3.3. Reciclaje mediante gasificación con vapor	5
1.1.4. Biodegradación del PET por biocatálisis.....	5
1.1.5. <i>Ideonella sakaiensis</i>	6
1.1.5.1. Aislamiento y caracterización	6
1.2. Objetivos	10
CAPITULO II.....	11
METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales	11
2.1.1. Recursos materiales	11
2.1.2. Recursos tecnológicos.....	11
2.2. Metodología.....	11
2.2.1. Secuencia y estructura tridimensional de la enzima <i>IsPETasa</i> y de enzimas homologas.	11
2.2.2. Análisis de homología de las secuencias	12
2.2.3. Análisis de homología estructural.....	12
2.2.4. Alineamiento múltiple de secuencias	14

2.2.5. Comparación estructural de la enzima <i>IsPETasa</i> y sus enzimas homólogas.	14
CAPITULO III.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1. Análisis y discusión de los resultados	15
3.1.1. Secuencia y estructura tridimensional de la enzima <i>IsPETasa</i> nativa	15
3.1.2. Análisis de homología de las secuencias y homología estructural	20
3.1.3. Alineamiento múltiple de secuencias y comparación estructural de la enzima <i>IsPETasa</i> y sus enzimas homólogas.....	28
3.1.4. Análisis de las variantes mutantes W159H, S238F, S121E, D186H, y R280A de <i>IsPETasa</i> con respecto a sus enzimas homologas.	34
CAPITULO IV.....	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	38
4.1. Conclusiones	38
4.2. Recomendaciones	39
MATERIALES DE REFERENCIA	40
Referencias bibliográficas	40
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros establecidos para la de búsqueda de homología.....	12
Tabla 2. Parámetros para la búsqueda de homología estructural en PBDeFold.	13
Tabla 3. Enzimas que comparten similitud de secuencia con <i>IsPETasa</i>	21
Tabla 4. Enzimas que comparten similitud estructural con <i>IsPETasa</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proyección del crecimiento de los residuos plásticos en los océanos.	2
Figura 2. Estructura química del PET, de sus materias primas y de sus productos de degradación.	3
Figura 3. Crecimiento de <i>I. sakaiensis</i> 201-F6 en PET.....	7
Figura 4. Metabolismo del PET por <i>I. sakaiensis</i>	8
Figura 5. Secuencia nativa de <i>IsPETasa</i>	15
Figura 6. Estructura 3D de <i>IsPETasa</i>	16

Figura 7. Pliegues y puentes disulfuro presentes en IsPETasa.	17
Figura 8. 2-HE (MHET) ₄ en el sitio activo de la IsPETasa	18
Figura 9. Conformación de W185 y S214 en IsPETasa	19
Figura 10. Sobreposición de SvCUT190_S176A_S226P_R228S en IsPETasa.	28
Figura 11. Sobreposición de la mutante R228S de SvCUT190_S176A_S226P_R228S (código PDB 5ZNO) en el residuo N212 de IsPETasa.....	29
Figura 12. Sitio de unión de los iones metálicos en SvCUT190.....	31
Figura 13 Sobreposición de las estructuras 3D de las enzimas Bbhidrolasa (código PDB 7CWQ) y Pblipasa en IsPETasa.	32
Figura 14. Sobreposición estructural de RgPETasa_E186A (código PDB 7DZV) en IsPETasa.....	33
Figura 15. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencia correspondiente a las mutantes W159H y S238F.	35
Figura 16. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencia correspondiente a las mutantes S121E y D186H.....	36
Figura 17. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencias correspondiente a la mutante variante R280A.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento múltiple de secuencias de enzimas que comparten similitud de secuencia con IsPETasa.....	47
Anexo 2. Alineamiento múltiple de secuencias de enzimas que comparten similitud estructural con IsPETasa	54

RESUMEN

El polietileno tereftalato (PET) es un termoplástico de bajo costo producido industrialmente a partir de materias primas fósiles, es empleado de manera masiva en la industria, llegando a convertirse en un contaminante de alto impacto. Entre los últimos descubrimientos relacionados al tratamiento enzimático del PET se encuentra la PETasa de *I. sakaiensis* (*IsPETasa*) la cual es una hidrolasa capaz de degradar al PET. El presente trabajo se elaboró con la finalidad de establecer posibles mutaciones y modificaciones que mejoren la actividad catalítica y estabilidad enzimática de *IsPETasa*, para lo cual se realizó un análisis estructural de la misma. Mediante el empleo de las bases de datos UNITPROT y PDBeFOLD se identificaron las enzimas que comparten un alto grado de homología con *IsPETasa*, a partir de estos resultados se realizó un análisis en base a su porcentaje de identidad de secuencia e identidad de estructura secundaria (SEQ y SSE respectivamente), E-value, Score, RMSD y Q. Se seleccionaron las enzimas de mayor interés para este análisis siendo las principales la *PbLipasaT*, *RgPETasa*, *BbHidrolasa* y *SvCUT190*, estableciéndose que la mutación N212S se puede utilizar para mejorar la actividad y estabilidad enzimática, además se describieron posibles sustituciones a ser estudiadas para evaluar el efecto que estas causarían en la enzima (S188E, S188A y S114H). En el análisis de variantes mutantes se identificó la presencia de diferentes aminoácidos en cada caso; por lo que se plantearon distintas sustituciones posibles a realizar en la enzima *IsPETasa*, entre las más relevantes se encuentran W159F y S238T.

Palabras clave: Bioinformática, actividad enzimática, mutaciones, residuos plásticos, PETasa, *Ideonella sakaiensis*, enzimas homólogas.

ABSTRACT

Polyethylene terephthalate (PET), a low-cost thermoplastic produced industrially from fossil raw materials, is massively used in industry, and has become a high-impact pollutant. Among the latest discoveries related to the enzymatic treatment of PET is PETase from *I. sakaiensis* (*Is*PETase), which is a hydrolase capable of degrading PET. The present work was elaborated to establish possible mutations and modifications that improve the catalytic activity and enzymatic stability of *Is*PETase, for which a structural analysis of the same was carried out. Using the UNIPROT and PDBeFOLD databases, the enzymes that share a high degree of homology with *Is*PETase were identified. From these results, an analysis was carried out based on their percentage of sequence identity and secondary structure identity (SEQ and SSE respectively), E-value, Score, RMSD, and Q. The enzymes of greatest interest were selected for this analysis, the main ones being *Pb*LipaseT, *Rg*PETase, *Bb*Hydrolase, and *Sv*CUT190, establishing that the N212S mutation can be used to improve the enzymatic activity and stability, in addition, possible substitutions to be studied were described to evaluate the effect that these would cause in the enzyme (S188E, S188A, and S114H). In the analysis of mutant variants, the presence of different amino acids in each case was identified; therefore, different possible substitutions to be made in the *Is*PETase enzyme were proposed, among the most relevant ones are W159F and S238T.

Keywords: Bioinformatics, enzyme activity, mutations, plastic residues, PETase, *Ideonella sakaiensis*, homologous enzymes.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Polietileno tereftalato en el medioambiente

La contaminación plástica es una de las mayores amenazas para el ecosistema del planeta, pues grandes cantidades de polietileno tereftalato (PET) se acumulan en el medio ambiente ocasionando serias amenazas para los ecosistemas globales y la salud humana, debido a que este polímero posee un tiempo de degradación prolongado (**Dai et al., 2021**). En los últimos años, la fabricación de PET se ha incrementado significativamente. Este polímero es considerado como un material ideal para una gran cantidad de aplicaciones, incluidos embalajes, dispositivos médicos, construcción, transporte, etc., debido a su alta resistencia mecánica, buena resistencia química, durabilidad y bajo costo. Como consecuencia, los residuos plásticos, en particular el PET, se han convertido en un problema ambiental (**Narancic & O'Connor, 2019; Şimşek et al., 2019**).

La inadecuada gestión de los desechos plásticos no biodegradables ha generado su acumulación descontrolada en el medio ambiente, provocando una disminución de la fertilidad del suelo además de muchos otros problemas ecológicos y de salud. Anualmente, se producen alrededor de 57 millones de toneladas de residuos poliméricos (**Ellis et al., 2021; Webb et al., 2013**). En el 2010 debido a la mala gestión de los residuos, se estima que se depositaron 12,77 millones de toneladas de plástico al medio marino (**Crawford & Quinn, 2017; Jambeck et al., 2015**) En los océanos la cantidad de desechos plásticos ha superado en seis veces la del plancton, causando graves amenazas contra las aves acuáticas y la vida marina (**Comăniță et al., 2016; Issifu & Sumaila, 2020**). Si la demanda mundial de plásticos y la gestión de residuos mantiene la tendencia actual y la acumulación sigue con una tendencia al alza (figura 1), para 2050 habrá más plástico en el mar que peces (**Jakobsson, (2021); Ritchie & Roser, (2018)**).

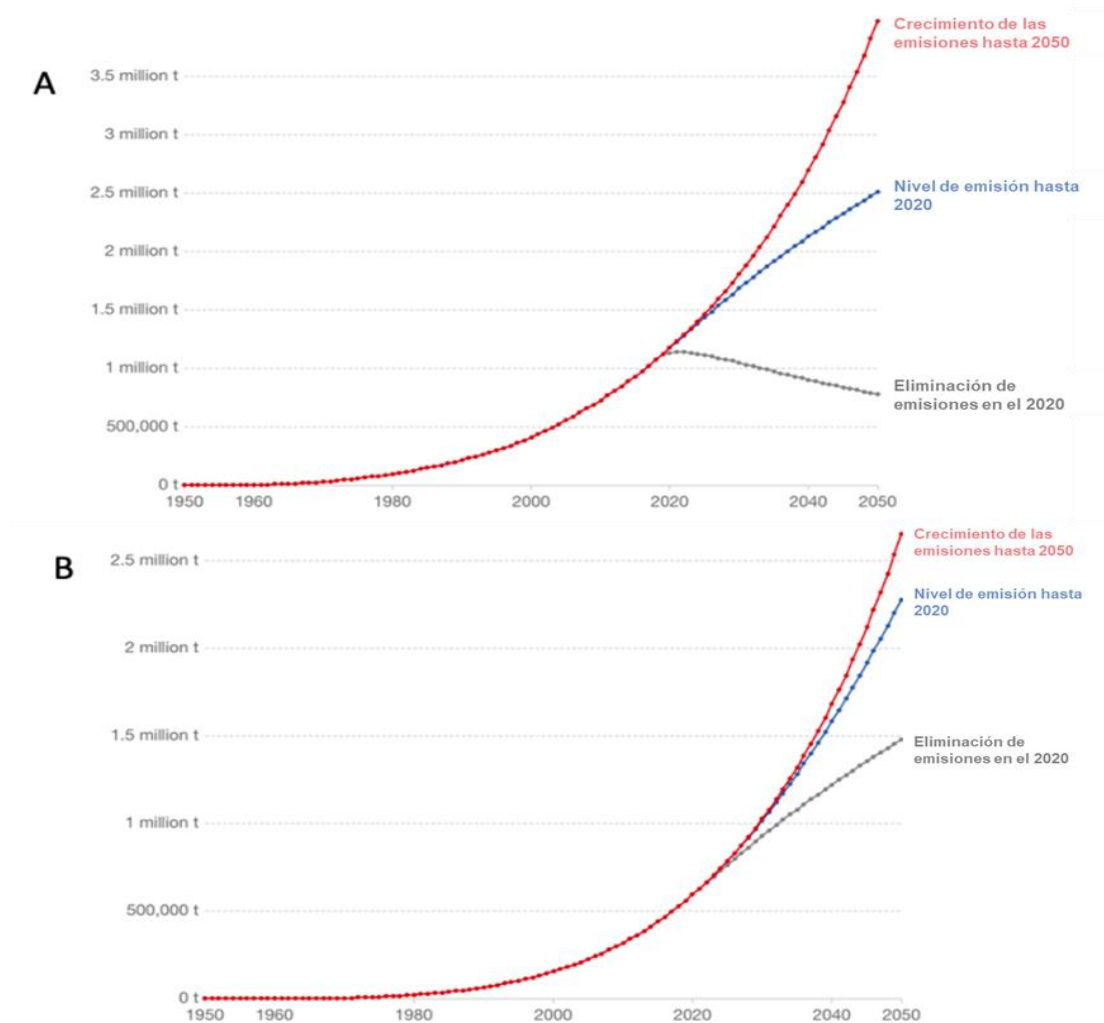


Figura 1. Proyección del crecimiento de los residuos plásticos en los océanos.

A. Macroplásticos en la superficie del mar de 1950 a 2050. Tres escenarios diferentes de cómo puede ser la acumulación de macroplásticos en la superficie del mar. **B.** muestra microplásticos en la superficie del mar bajo los mismos escenarios. Curva gris: representación del crecimiento de los desechos plásticos si se detienen las emisiones en el 2020. Curva azul: incremento de los residuos plásticos si las tasas de emisión se estancan en el 2020. Curva roja: representación del crecimiento de los desechos plásticos si no se toma ninguna medida contra la mala gestión actual y las tasas de emisión se incrementan.

Fuente: Jakobsson, (2021); Ritchie & Roser, (2018)

1.1.2. Estructura del PET

El PET se produce mediante una polimerización en cadena de etilenglicol (EG) y ácido tereftálico (TPA) (figura 2) Los productos plásticos a base de petróleo son semicristalinos con dominios tanto cristalizados como amorfos. El PET tiene una cristalinidad diferente dependiendo de su uso, el PET utilizado en la fabricación de botellas y textiles tiene una cristalinidad más alta (30-40%) mientras que el PET para envases tiene una cristalinidad de alrededor del 8% (Jakobsson, 2021; Taniguchi et al., 2019).

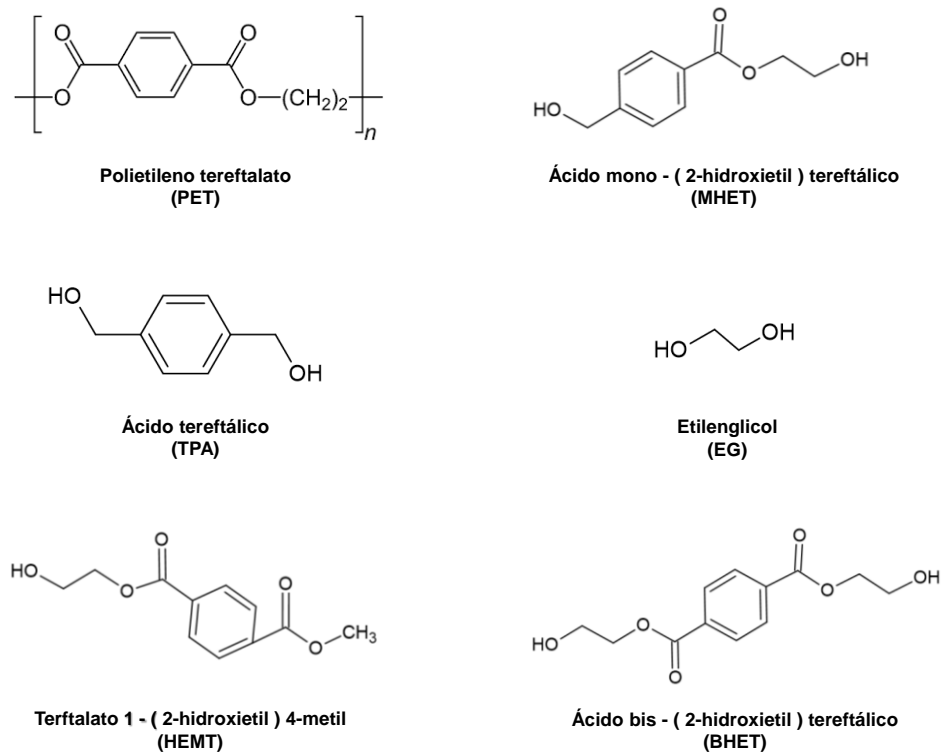


Figura 2. Estructura química del PET, de sus materias primas y de sus productos de degradación.

Fuente: modificado de: **Taniguchi et al., (2019)**

La biodegradabilidad de este polímero se ve afectada por factores adicionales como su hidrofobicidad, topografía de la superficie y tamaño molecular. Existe cierta fluctuación de estos factores a temperaturas superiores a la temperatura de transición vítrea, la cual, en el caso del PET, se encuentra alrededor de 80 °C, pero puede descender a 60-65 °C en el agua cuando las moléculas de agua entran entre las cadenas

del polímero y afectan la movilidad de la cadena al debilitar los enlaces de hidrógeno entre los polímeros (**Jakobsson, 2021; Kawai et al., 2019**).

1.1.3. Degradación del PET

En la actualidad, se han desarrollado diferentes técnicas para la degradación y reutilización de los desechos plásticos, como el reciclaje térmico o el reciclaje químico. Sin embargo, estos métodos generan contaminación ambiental debido a las emisiones de CO₂ o de residuos procedentes de la catálisis química (**Joo et al., 2018; Hiraga et al., 2019**).

1.1.3.1. Reciclaje químico

El reciclaje químico del PET es el más empleado debido que en este método no se produce pérdida de calidad como lo es en el caso del reciclaje térmico en el cual el plástico se derrite y reutiliza provocando una gran pérdida de propiedades mecánicas (**Jakobsson, 2021**). El reciclaje químico del PET se puede realizar con ácidos, metanol y glicoles. Esta técnica conduce a la formación de las materias primas a partir de las cuales se fabrica originalmente el PET, TPA y EG. Esto se consigue mediante el uso de procesos de hidrólisis, metanólisis, glucólisis, amonólisis y aminólisis (**Khoonkari et al., 2015**).

1.1.3.2. Reciclaje Físico

El tratamiento físico del PET es uno de los métodos más empleados actualmente debido a que el resultando de este proceso se puede emplear de forma directa en la elaboración de otros productos (**Quito & Villafuerte, 2011; Sinha et al., 2008**). De manera general, este se subdivide en 4 fases las cuales son: el reciclaje primario que implica el uso de chatarra y salvamento industrial previo al consumo (**Damayanti & Wu, 2021; Elamri et al., 2020**), el reciclaje secundario que implica el reprocesamiento físico (por ejemplo, trituración, fusión y reformado), el reciclaje terciario implica someter los residuos de PET a un tratamiento químico mediante el cual sus componentes se aíslan y reprocesan para su uso en la fabricación y finalmente el

reciclaje cuaternario en el que el contenido energético de los residuos plásticos puede recuperarse mediante incineración (Al-Sabagh et al., 2016; Jablonska et al., 2019).

1.1.3.3. Reciclaje mediante gasificación con vapor

Otra alternativa para el reciclaje del PET es la gasificación con vapor, esta consiste en convertir los materiales carbonosos en productos gaseosos (Li et al., 2021). En este proceso el agente oxidante (aire, vapor u oxígeno) se introduce en el sistema de gasificación en cantidades subestequiométricas, y el combustible se descompone en CO y H₂ a una temperatura de 550–1000 °C (Lopez et al., 2018; Pereira et al., 2012). Esta técnica se divide en cuatro fases principales las cuales son: (1) secado; (2) pirólisis (desvolatilización); (3) craqueo, combustión y desplazamiento del alquitrán; y (4) reacciones de gasificación heterogéneas carbonizadas. Este método se puede incorporar en los sistemas de energía y producción de combustibles (Anuar Sharuddin et al., 2016; Klinghoffer & Castaldi, 2013).

1.1.4. Biodegradación del PET por biocatálisis

La degradación del PET por biocatálisis se considera un método más ecológico a comparación de los mencionados anteriormente. La degradación enzimática de este tipo de polímeros se realiza típicamente mediante cutinasas que pueden hidrolizar la cutina y varios poliésteres como el PET (Carr et al., 2020; Liebminger et al., 2007; Roth et al., 2014). Estas enzimas realizan una despolimerización completa del PET en sus monómeros, TPA y EG que pueden reutilizarse para la síntesis de PET **virgen** (de Castro et al., 2017; Furukawa et al., 2018). Entre las principales enzimas que presentan una capacidad de degradación del PET relativamente alta se encuentran: la hidrolasa de *Thermobifida fusca* (*TfH*), la hidrolasa BTA-2 de *T. fusca* DSM43793 (*TfH* BTA-2), la cutinasa 1 de *T. fusca* KW3 (*Tf* Cut1), cutinasa 2 de *T. fusca* KW3 (*Tf* Cut2), LC cutinasa del metagenoma en abono vegetal, cutinasa de *Saccharomonospora viridis* AHK190 (*CUT190*), la cutinasa HiC de *Thermomyces insolens* y la lipasa B de *Candida antártica* (Carniel et al., 2021; Joo et al., 2018; Wei et al., 2014; Wei & Zimmermann, 2017). A estas enzimas se ha sumado

recientemente la PET hidrolasa de *Idionella sakaiensis* (*IsPETasa*) (**Yoshida et al., 2016**)

1.1.5. *Ideonella sakaiensis*

1.1.5.1. Aislamiento y caracterización

En 2016, Yoshida y colaboradores realizaron estudios en varios sitios que se encontraban altamente contaminados con diferentes desechos, como sedimentos, aguas residuales, y lodos activados. De entre los 250 sitios que se analizaron, en el consorcio N° 46 se localizaron bacterias con la capacidad de producir significativas alteraciones en láminas de baja cristalinidad de PET (1,9%) (**Yoshida et al., 2016**). A partir de este consorcio se aisló *I. sakaiensis* 201-F6, un microorganismo con la habilidad de degradar el PET. El género *Ideonella* pertenece a la familia *Comamonadaceae* de la clase *Betaproteobacteria*. Según lo reportado por **Tanasupawat et al., (2016)**, las células de la cepa 201-F6 son bacilos aeróbicos ($0,6-0,8 \times 1,2-1,5 \mu\text{m}$), no formadores de esporas, mesófilos con una temperatura óptima de 30 a 47 °C, no halófilas, tinción de Gram negativa y móviles con un flagelo polar. **Yoshida et al., (2016)** determinaron que *I. sakaiensis* tiene la capacidad de adherirse y colonizar el plástico debido a que posee ciertos apéndices que facilitan la secreción de enzimas extracelulares sobre el sustrato que permiten la total degradación del PET en 70 días (figura 3A, 3B).

La presencia de los apéndices permite que las células que se forman de *I. sakaiensis* se conecten entre si lo que ayuda en el suministro de enzimas secretadas a la película de PET (figura 3C, 3D, 3E), pero la principal razón por la cual esta bacteria tiene estas cualidades se da debido a que emplea al PET como fuente de carbono y energía. Esto es posible ya que *I. sakaiensis* expresa la enzima PET hidrolasa (*IsPETasa*) (**Yoshida et al., 2016**). Se conoce que *IsPETasa* es similar a las cutinasas y lipasas; sin embargo, esta presenta una actividad de 5,5 a 120 veces mayor contra el PET, debido a que convierte al polímero en monómeros que son más fácilmente asimilables (**Han et al., 2017**).

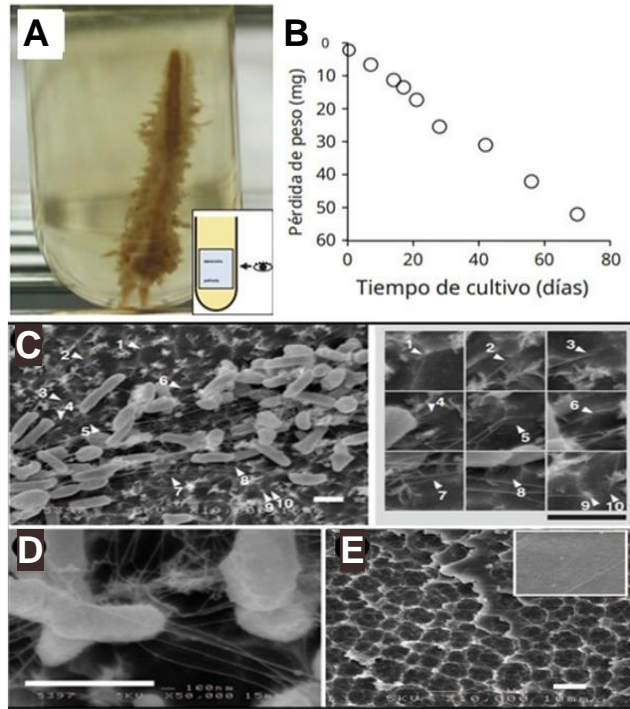


Figura 3. Crecimiento de *I. sakaiensis* 201-F6 en PET.

A. Crecimiento en una película de PET transcurridos 20 días. **B.** Evolución de la degradación del PET a 30°C. **C.** Imágenes SEM (Scanning Electron Microscope) de células de *I. sakaiensis* cultivadas en películas de PET durante 60 horas, las flechas indican los puntos de contacto de los apéndices. **D.** Unión de las células por los apéndices. **E.** Superficie de una película PET degradada.

Fuente: Yoshida et al., (2016)

1.1.5.2. Mecanismo molecular de *Ideonella sakaiensis*

I. sakaiensis 201-F6 posee la capacidad de degradar el PET debido a que utiliza este compuesto como su principal fuente de carbono y energía para su crecimiento. El mecanismo molecular que emplea *I. sakaiensis* para catabolizar el PET requiere la acción sinérgica de dos enzimas. La primera, como se mencionó anteriormente, es la enzima *IsPETasa*, que convierte el PET en ácido mono (2-hidroxiethyl) tereftálico (MHET), ácido tereftálico (TPA) y bis (2-hidroxiethyl) tereftalato (BHET) (Figura 5). De entre estos, se conoce que el MHET es el principal producto de la reacción. La segunda enzima que interviene es la MHET hidrolasa (*IsMHETasa*) la cual convierte el MHET en los monómeros no tóxicos, TPA y EG (Han et al., 2017). Es decir, la *IsPETasa* extracelular hidroliza el PET para producir principalmente MHET y TPA y

posteriormente la *IsMHETase* hidroliza el MHET en TPA y EG. A continuación, *I. sakaiensis* incorpora el TPA a través del transportador TPA (TPATP) y lo cataboliza mediante las enzimas TPA 1,2-dioxigenasa (TPADO), 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1,4-dicarboxilato de hidrogenasa (DCDDH). El ácido protocatequico (PCA) resultante se escinde en el anillo mediante la enzima PCA 3,4-dioxigenasa (Pca34). El proceso de catabolismo del PET se describe en la figura 5 (Yoshida et al., 2016).

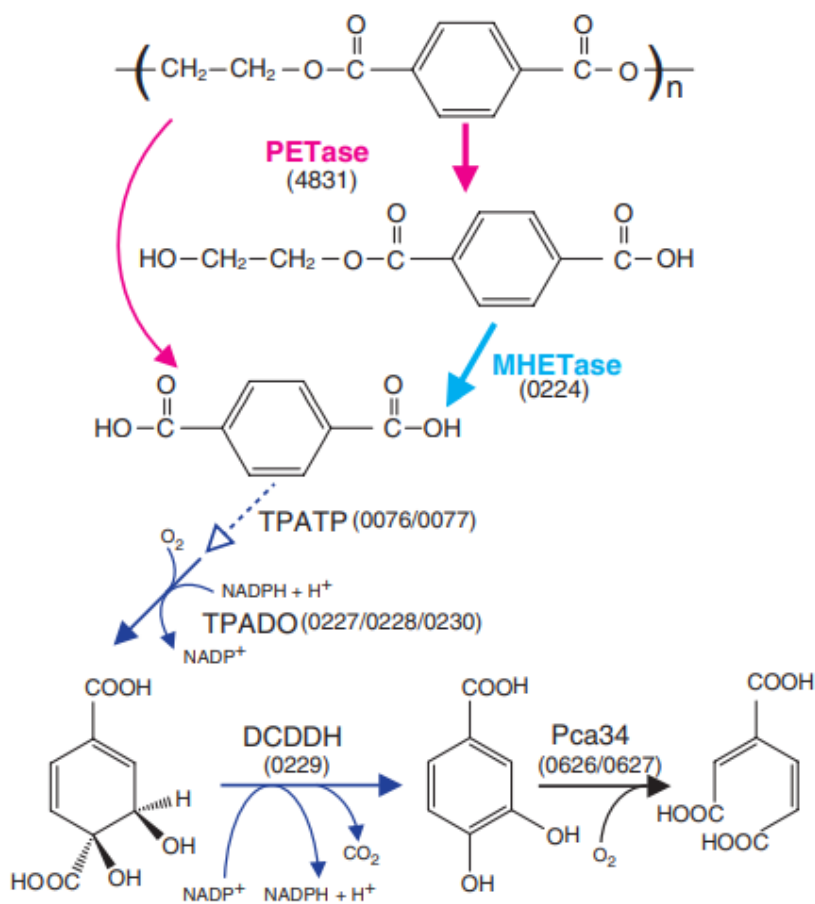


Figura 4. Metabolismo del PET por *I. sakaiensis*.

Vía prevista de degradación de PET de *I. sakaiensis*. TPATP: transportador TPA; TPADO: TPA 1,2-dioxigenasa; DCDDH: 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadieno-1,4-dicarboxilato de hidrogenasa; Pca34: PCA 3,4-dioxigenasa

Fuente: Yoshida et al., (2016)

1.1.5.3. Evolución dirigida de *IsPETasa*

El proceso en el que se emplea esta enzima es considerado uno de los más económicos y menos ofensivos para el medio ambiente debido a que la enzima presenta una alta actividad catalítica y a su vez genera el mismo resultado que al utilizar el método químico. Se han realizado múltiples estudios para mejorar la efectividad de la PETasa. Dentro de los resultados más relevantes se puede mencionar la inclusión de las mutaciones W159H y S238F, ensayadas por **Austin et al., (2018)**, y S121E, D186H, y R280A, por **Son et al., (2019)**, las cuales incrementan significativamente la actividad y termo estabilidad de la enzima con respecto a la enzima silvestre.

Las dos mutaciones realizadas por **Austin et al., (2018)** se introdujeron en una región adyacente para hacer más estrecha la supuesta hendidura secundaria de unión al sustrato. La enzima resultante exhibe una mayor eficacia en la reducción de la cristalinidad del PET. En el caso de las mutaciones realizadas por **Son et al., (2019)** se demostró que la variante de *IsPETasa*, S121E/D186H/R280A, aumento 14 veces la actividad de degradación de PET.

Joo et al., (2018), también realizó un estudio relacionado con la mutagénesis dirigida en *IsPETasa*. En este caso se remplazaron los residuos que componen la triada catalítica, S160, A206 e H237, con alanina, dando como resultado una pérdida total de la actividad enzimática. Consecutivamente remplazaron por una alanina a los residuos que conforman el subsitio I, Y87, W185, M161 e I208, de las cuales los mutantes Y87A y W185A mostraron únicamente un 5% de actividad hidrolítica en comparación con la *IsPETasa* nativa. Las variantes M161A y I208A por otra parte exhibieron un 52% y 46% de actividad hidrolítica, respectivamente.

En un estudio desarrollado por **Liu et al., (2018)**, se realizaron las mutaciones, W97, Q182, R123 y N241, las cuales de acuerdo con el ensayo BHET que ejecutaron, estas disminuyen significativamente la actividad de hidrolisis. Sin embargo, las mutaciones que dan como resultado más espacio en el centro de unión (Y87A, W159A, W159H, A209I) o una mayor aromaticidad en el borde del bolsillo de unión (S214H) generaron una actividad más alta que la de la enzima de tipo salvaje.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Analizar estructuralmente la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* y enzimas homólogas.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Compilar secuencias de enzimas homólogas a PETasa de *I. sakaiensis*.
- Definir patrones estructurales conservados en las secuencias y estructuras de PETasa de *I. sakaiensis* y enzimas homólogas.
- Comparar la estructura de las variantes mutantes; W159H, S238F, S121E, D186H, y R280A de PETasa de *I. sakaiensis* con las estructuras de las enzimas que comparte mayor grado de homología.

CAPITULO II METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Recursos materiales

- Computadora personal

2.1.2. Recursos tecnológicos

- Scopus
- ProQuest
- SCIFINDER
- Repositorio de información sobre proteínas, UniProt
- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB (RCSB PDB)
- Clustal Omega
- PyMol

2.2. Metodología

2.2.1. Secuencia y estructura tridimensional de la enzima *IsPETasa* y de enzimas homologas.

La secuencia nativa de la enzima *IsPETasa* se obtuvo de la base de datos Universal Protein (UnitProt) (**UniProt, 2021**), en donde en la barra de búsqueda se colocó el nombre de la enzima y se presionó la opción “SEARCH” obteniéndose el código de acceso correspondiente a la enzima PETasa, reconociendo que la secuencia perteneciente a este Código es la de la enzima nativa, debido a que no presenta una cola de histidinas o mutaciones. Para la obtención de la estructura tridimensional se empleó la base de datos Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB (RCSB PDB) (**RCSB PDB, 2021**).

2.2.2. Análisis de homología de las secuencias

El análisis de homología de secuencias se realizó a partir de la secuencia obtenida de la enzima nativa en su formato FASTA. Para este efecto se empleó la base de datos UniProt (**UniProt, 2021**). En este servidor se utilizó la herramienta “BLAST” para alinear e identificar enzimas homólogas a la *IsPETasa* de acuerdo con su porcentaje de identidad. Para el BLAST se emplearon los parámetros que se muestran en la Tabla 1. De los resultados obtenidos se extrajeron las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de las enzimas que presentaron >50% de homología con *IsPETasa*. Además, se recopiló la información más relevante del alineamiento, como los porcentajes de identidad, valores de homología (E) y Score (Puntuación del alineamiento).

Tabla 1. *Parámetros establecidos para la de búsqueda de homología*

Target database	UniProtKB reference proteomes plus Swiss-Prot
E-Threshold	10
Matrix	Auto
Filtering	None
Gapped	No
Hits	250

Fuente: UniProt, (2021)

2.2.3. Análisis de homología estructural

Para analizar estructuralmente la enzima PETasa e identificar estructuras de enzimas homólogas se utilizó la base de datos PDBeFold (**PDBeFold, 2022**). Esta herramienta emplea comparaciones de estructura secundaria (SSM) con toda la base de datos del RCSB PDB. Al ingresar a esta base de datos se seleccionó la opción “Launch PDBeFold” para realizar la comparación estructural. Posteriormente, se insertó el código de la enzima *IsPETasa* nativa, que de acuerdo con los resultados obtenidos en

la sección 2.2.1, tiene el código “6EQE. Finalmente, para la ejecución de la herramienta se tomó en consideración los parámetros que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. *Parámetros para la búsqueda de homología estructural en PDBeFold.*

Submission Form		Pairwise	
QUERY		TARGET	
Source	PDB entry	Source	Whole PDB
PDB code	6EQE		archive
Chain	A		
Lowest acceptable match (%)	20	Lowest acceptable match (%)	20
Match individual chains	Yes	Best match only	Yes
Match connectivity	Yes	Unique matches only	Yes
If no matches within limits of acceptability are found, show close ones			Yes
Precision			Normal
Sort by			Matched SSEs
Viewer			Jmol

Fuente: PDBeFold, (2021)

Seguido a la búsqueda, se desplegó una lista de las estructuras que presentan homología con la *IsPETasa*. De esta información se extrajo el porcentaje de identidad de la estructura secundaria (%SSEs), los valores de Q, P, Z, RMSD, códigos PDB y el porcentaje de identidad de secuencia (%SEQ), los cuales se analizaron mediante la elaboración de tablas.

Para la obtención de los archivos que contienen las coordenadas tridimensionales de las enzimas homologas se empleó la base de datos RCSB PDB (**RCSB PDB, 2021**). Primero, se identificó la entrada de cada enzima homóloga mediante los códigos obtenidos del PDBeFold. A continuación, se descargó cada estructura tridimensional en su formato .pdb y su secuencia de aminoácidos en formato FASTA.

2.2.4. Alineamiento múltiple de secuencias

Para identificar los aminoácidos clave del sitio activo de *IsPETasa* y de sus enzimas homólogas y cómo estos se relacionan, se ejecutó un alineamiento múltiple de secuencias empleando el programa Clustal Omega (**Clustal Omega, 2021**). Para esto, se recopiló todas las secuencias en formato FASTA en un solo archivo de texto. Se realizó alineamientos para los resultados obtenidos a partir de UniProt (homología de secuencias) y PDBeFold (homología estructural) por separado. En cuanto al proceso de alineamiento en Clustal Omega, se colocó las secuencias en el cuadro de entrada de la herramienta virtual, teniendo en consideración que las funciones de la herramienta web se mantuvieron por defecto. Finalmente se presionó la opción “Submit” para la generación de cada alineamiento.

2.2.5. Comparación estructural de la enzima *IsPETasa* y sus enzimas homólogas.

La comparación estructural de la enzima *IsPETasa* (silvestre y mutantes) con las estructuras de sus enzimas homólogas se realizó de acuerdo con lo descrito previamente por **Espín & García, (2021)**. Se realizó una sobreposición de las estructuras de la enzima *PETasa* sobre las coordenadas tridimensionales de las enzimas homólogas identificadas, empleando el programa PyMol (**PyMOL, 2021**) el cual permitió realizar un análisis de la posición y conformación de residuos clave para la catálisis. Para llevar a cabo este procedimiento se toma en cuenta los archivos PDB extraídos con anterioridad, los cuales se ingresaron en los programas para su posterior análisis.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Secuencia y estructura tridimensional de la enzima *IsPETasa* nativa

La secuencia nativa de *IsPETasa* se extrajo de la base de datos de UniProt mediante el uso de la herramienta BLAST empleando la secuencia de aminoácidos de la estructura 6EQE alojada en la base de datos del PDB. La secuencia nativa de *IsPETasa* identificada mediante BLAST tiene el código de acceso **A0A0K8P6T7**, y posee una longitud de 290 aminoácidos (figura 5).

```
MNFPRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVS  
RPSGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIIVPGYTARQSSIKWWGPRLASHGFVVITIDTNSTL  
DQPSSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGKVDTARMGVMGWSMGGGGSLISAANNP  
SLKAAAPQAPWDSSTNFSSVTVPPLIFACENDSIAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEING  
GSHSCANSNGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDFRANC
```

Figura 5. Secuencia nativa de *IsPETasa*

Fuente: UniProt, (2021).

La estructura 3D de *IsPETasa* (figura 6A; generada a partir de la estructura con código PDB **6EQE**) presenta en su sitio activo una triada catalítica conformada por S160, N206 e H237 (figura 6B). Del análisis estructural se puede deducir que el sitio activo de *IsPETasa* es más amplio en comparación con el de otras enzimas de tipo α / β -hidrolasa, por lo que se cree que esto contribuye a que el sustrato se una con mayor facilidad a la enzima (**Chen et al., 2018**). Esta característica se puede observar en la figura 6B, en donde se muestra un ejemplo de la unión de una molécula de tereftalato de 1-(2-hidroxietil) 4-metil (HEMT), un sustrato análogo de la enzima, vinculada al sitio activo.

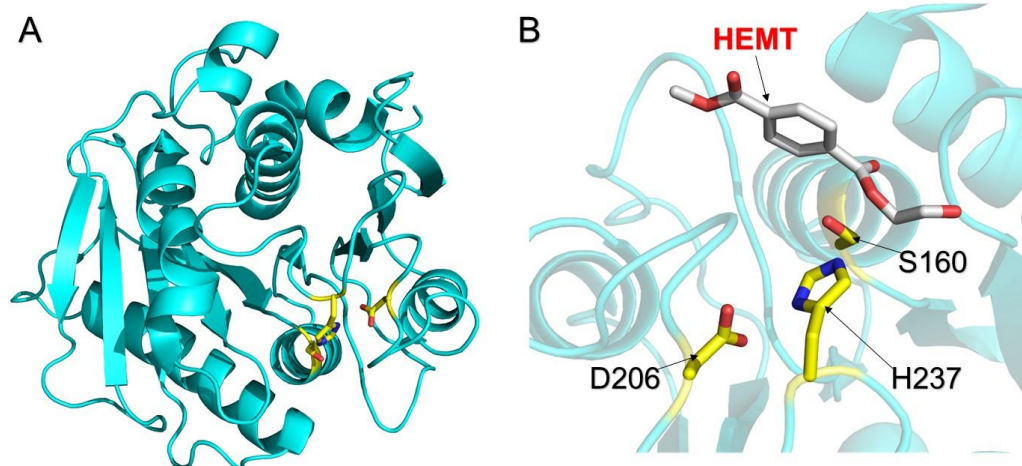


Figura 6. Estructura 3D de *IsPETasa*.

A. Estructura tridimensional de la enzima *IsPETasa* (código PDB 6EQE) ilustrada mediante el programa PyMOL. Los residuos que conforman la triada catalítica se muestran en modelo de palillos de color amarillo. **B.** Aminoácidos que conforma la triada catalítica en la enzima *IsPETasa* (amarillo). Se visualiza una molécula de tereftalato de 1-(2-hidroxietil) 4-metil (HEMT) (blanco) vinculada al sitio activo.

Fuente: Elaboración propia.

La enzima *IsPETasa* adopta un plegamiento de α / β -hidrolasa, con un núcleo que consta de nueve cadenas β y siete hélices α , además de dos puentes disulfuro intramoleculares (DS1 y DS2). El puente DS2 conecta la hélice C-terminal con el último bucle ($\beta 9$), mientras que el puente DS1 permite la unión de los bucles $\beta 7 - \alpha 5$ y $\beta 8 - \alpha 6$, que albergan al ácido catalítico (D206) y la base catalítica (H237), respectivamente (**Pérez et al., 2020**) (figura 7). La presencia de la triada catalítica sugiere un sistema de relevo de carga similar al que se encuentra en otras hidrolasas de pliegues α / β . Además, se ha observado que la ubicación específica y la geometría del sitio activo que presenta esta enzima también se encuentra en las cutinasas (**Austin et al., 2018**).

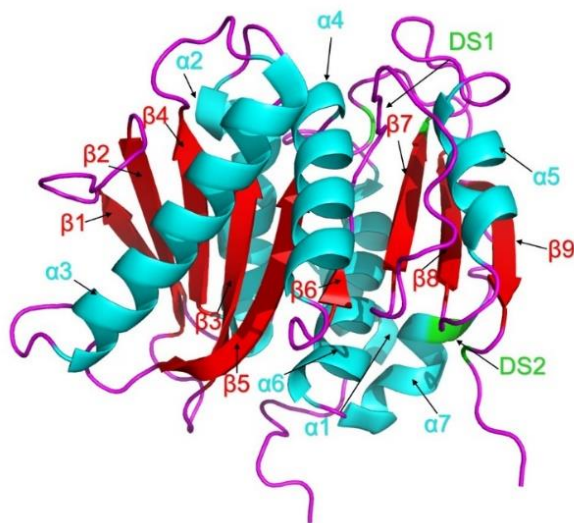


Figura 7. Pliegues y puentes disulfuro presentes en *IsPETasa*.

Las láminas β se encuentran representadas de color rojo, las hélices α de color cian y los puentes disulfuro de color verde (DS1 y DS2).

Fuente: Elaboración propia.

Son et al., (2020), mediante un experimento de cromatografía de exclusión por tamaño estableció que *IsPETasa* existe como monómero. De igual manera determinó que, en el sitio activo, S160 funciona como un nucleófilo covalente al átomo de carbono del carbonilo en el enlace éster escindible, como en otras carboxilesterasas. Todos los estudios realizados anteriormente han demostrado que el amplio espacio de unión al sustrato puede ser uno de los factores que explican por qué *IsPETasa*, a diferencia de las cutinasas, podría acomodar un sustrato más voluminoso como el PET, (**Chen et al., 2018**). Se ha planteado la hipótesis de que la presencia de una hendidura más amplia en el sitio activo podría ser necesaria para la colocación de poliésteres semi aromáticos cristalinos (**Austin et al., 2018**). La superficie de la hendidura de unión al sustrato es principalmente hidrófoba y tiene una longitud de ~ 40 Å.

Joo et al., (2018) se basaron en el enlace éster escindible de 2-hidroxietilo-(tereftalato de monohidroxietilo)₄ (2-HE(MHET)₄), una molécula conformada por cuatro monómeros MHET que imita al PET (Figura 8A), para determinar como el sitio de unión del sustrato se divide en dos subsitios, subsitio I y subsitio II, donde se unen los restos de MHET (Figura 8B). Para la unión del primer resto de MHET en el subsitio I, el anillo de benceno se coloca entre los dos residuos aromáticos de Y87 y W185

(Joo et al., 2018). Así mismo se ha determinado que *IsPETasa* tiene una carga superficial altamente polarizada, creando un dipolo a través de la molécula (Chen et al., 2018).

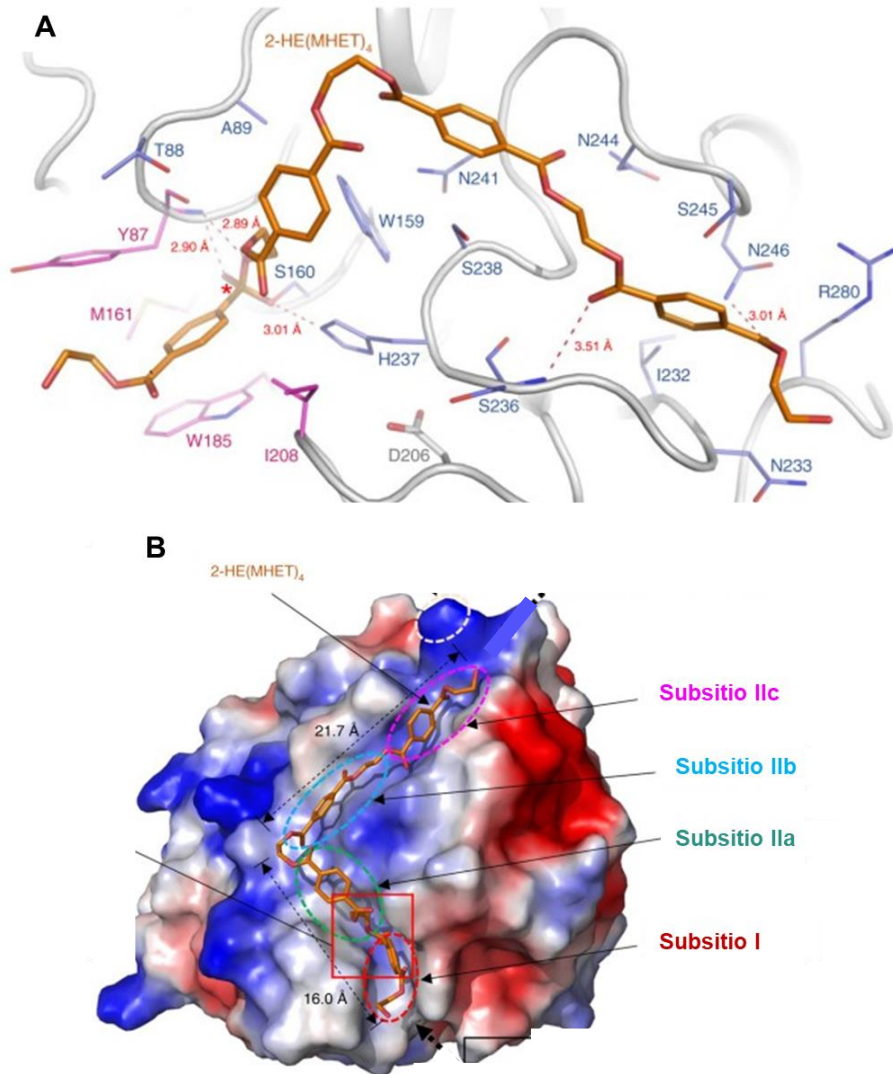


Figura 8. 2-HE (MHET)₄ en el sitio activo de la *IsPETasa*

A. Representación cartoon del sitio de unión al sustrato de *IsPETasa*. El modelo de acoplamiento molecular de 2-HE (MHET)₄, se muestra como palillos de color naranja. **B.** Imagen de superficie y representación electrostática del sitio activo de *IsPETasa*. Los subsitios I, IIa, IIb y IIc del sitio de unión del sustrato se indican con círculos punteados de color rojo, verde, celeste y fucsia, respectivamente.

Fuente: Joo et al., (2018)

Los tres segmentos de polipéptido que conforman el sitio activo de *IsPETasa* se denominaron cadena A, B y C. Además, se observa la presencia del residuo W185 adyacente al centro catalítico, el cual se encuentra conservado en todas las enzimas homólogas, pero exhibe más de una conformación en *IsPETasa* de acuerdo con el análisis de las diferentes estructuras cristalinas de la enzima (figura 9) (Chen et al., 2021). Interesantemente, W185 no cambia de conformación en enzimas homólogas capaces de hidrolizar el PET, en donde adopta la conformación “C” (Han et al., 2017). Este cambio conformacional, único de la *IsPETasa*, se denomina “bamboleo de W185” (W185 wobbling) y está involucrado en la unión al sustrato (Pérez et al., 2020).

En un análisis realizado por Han et al., (2017), se estableció que el bamboleo W185 de *IsPETasa* se debe a la presencia del residuo S214 (figura 9), ya que este posee un tamaño óptimo que permite que el residuo W185 tenga espacio para rotar y cambiar de conformación. En enzimas homólogas a *IsPETasa*, S214 se encuentra substituida por una histidina. Aparentemente, la longitud de la cadena lateral de la histidina restringe el movimiento de W185 y facilita su ordenamiento. S214 también presenta múltiples conformaciones en *IsPETasa*, lo cual sugiere que la rotación de W185 es concertada con un reacomodamiento de la posición del grupo hidroxilo de S214 (figura 9).

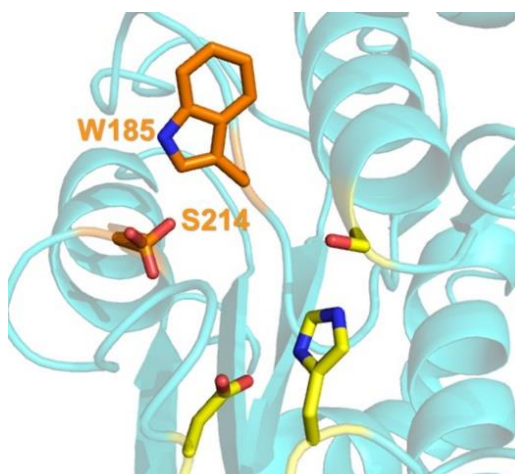


Figura 9. Conformación de W185 y S214 en *IsPETasa*

W185 y S214 se muestran de color naranja, cercanos a la tríada catalítica representada de color amarillo

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2. Análisis de homología de las secuencias y homología estructural

Para identificar las secuencias de enzimas homólogas a *IsPETasa* se realizó un BLAST mediante la herramienta UniProt. Los resultados obtenidos, ordenados con respecto a su porcentaje de homología de secuencia (%SEQ), se muestran en la tabla 3. Con base a los resultados se pudo determinar que la mayor proporción de enzimas homólogas obtenidas pertenecen a enzimas de las familias lipasas y cutinasas. Las enzimas que comparten un mayor porcentaje de homología de secuencia son la lipasa triglicerol de *Polyangium brachysporum* (*PbLipasaT*) (65.5%), la PETasa obtenida de *Rhizobacter gummiphilus* (*RgPETasa*) (61.5%) y la alpha/beta hidrolasa de *Ketobacter sp* (*Ksα_βHidrolasa*), (57.9%). Los valores E para estas secuencias indican una alta probabilidad de homología ya que estos son menores que 0,02. Estos resultados correlacionan con lo descrito previamente por **Austin et al., (2018)**, quienes establecieron que *IsPETasa* comparte similitudes estructurales con lipasas y cutinasas, ya que comparten el pliegue clásico de α / β -hidrolasa con un núcleo que consta de nueve cadenas β y siete hélices α .

La lipasa triglicerol de *P. brachysporum* es empleada en el tratamiento enzimático del PET, pues según lo expuesto por **Kawai et al., (2019)** esta enzima es capaz de hidrolizar poliésteres aromáticos. Por otra parte, se conoce que la PETasa de *R. gummiphilus*, identificada mediante BLAST, posee una actividad hidrolasa similar a la *IsPETasa* hacia el PET microcristalino (**Sagong et al., 2021**).

Tabla 3. Enzimas que comparten similitud de secuencia con IsPETasa.

Nombre	Abreviación	Código de acceso	E-value	Score	% SEQ
PETasa de <i>Rhizobacter gummiphilus</i>	RgPETasa	A0A1W6L588	2,50E-146	1080	79,1
Lipasa triglicerol de <i>Polyangium brachysporum</i>	PbLipasaT	A0A0G3BI90	8,20E-130	972	65,5
Alpha/beta hidrolasa de <i>Ketobacter sp</i>	Ks α _ β Hidrolasa	A0A3F2UZQ6	1,10E-94	742	57,9
Proteína que contiene el dominio DLH de <i>Ketobacter alkanivorans</i>	KaDLH	A0A2K9LJV9	4,50E-89	705	55,6
Cutinasa de <i>Marinobacter daqiaonesis</i>	MdCUT	A0A1I6HGD3	6,30E-91	717	54,8
Lipasa de <i>Oleispira antarctica</i> RB-8	OaLipasa	R4YKL9	4,00E-89	705	54,8
Proteína que contiene el dominio DLH de <i>Alkalilimnicola ehrlichii</i>	AeDLH	A0A3E0WVY1	4,10E-85	678	54,8
Proteína no caracterizada de <i>Roseateles depolymerans</i>	RdProt	A0A0U3LPW8	6,70E-83	662	54,1
Cutinasa de <i>Arenicella xantha</i>	AxCUT	A0A395JIT5	1,10E-83	669	52,5
Cutinasa de <i>Pseudomonas salegens</i>	PsCUT	A0A1H2H9F1	7,60E-88	697	52,2
Triacilglicerol lipasa de <i>Deinococcus maricopenis</i> (strain DSM 21211 /LMG 22137 / NRRL B-23946 / LB-34)	DmLipasaT	E8U721	2,20E-79	641	52,1
Alpha/beta hidrolasa de <i>Saccharothrix sp</i> ALI-22-I	Ss α _ β Hidrolasa	A0A1V2PXV9	2,40E-85	678	52
Cutinasa de <i>Micromonospora coxensis</i>	McCUT	A0A1C5GKF5	1,60E-83	667	51,9
Triglicerol lipasa de <i>Pseudomonas yangmingensis</i>	PyLipasaT	A0A1I4Q7B4	1,40E-85	681	51,7
Alpha/beta hidrolasa de <i>Micromonospora craterilacus</i>	Mca α _ β Hidrolasa	A0A2W2FFS0	2,40E-82	657	51,6
Alpha/beta hidrolasa de <i>Aquabacterium sp</i> SJQ9	Aqs α _ β Hidrolasa	A0A426VCW9	2,30E-79	638	51,4
Cutinase de <i>Micromonospora echinospora</i>	MeCUT	A0A1C4ZBK4	1,20E-85	681	51,4
Lipasa de <i>Amycolatopsis albispota</i>	AdLipasa	A0A344L4M2	7,20E-82	655	51,3

Triacilglicerol lipasa - <i>Micromonospora maris</i> (strain DSM 45365 / JCM 31040 / NBRC 109089 / NRRL B-24793 / AB-18-032)	<i>MmLipasaT</i>	F4FAL2	1,30E-81	654	51,1
Cutinasa de <i>Actinophytocola oryzae</i>	<i>AoCUT</i>	A0A4R7W3H8	2,70E-84	671	50,9
Cutinasa de <i>Micromonospora echinofusca</i>	<i>MefCUT</i>	A0A1C5G7B8	8,90E-83	662	50,9
Cutinasa de <i>Micromonospora nigra</i>	<i>MnCUT</i>	A0A1C6R9R3	7,20E-82	656	50,9
Triacilglicerol lipasa de <i>Micromonospora aurantiaca</i> (strain ATCC 27029 / DSM 43813 / BCRC12538 / CBS 129.76 / JCM 10878 / NBRC 16125 / NRRL B-16091 / INA 9442)	<i>MaLipasaT</i>	D9SZ22	4,00E-83	664	50,9
Cutinasa de <i>Micromonospora avicenniae</i>	<i>MaCUT</i>	A0A1N6VAB5	8,00E-84	669	50,7
Lipasa de <i>Streptomyces sp</i> AS58	<i>SsLipasa</i>	A0A0M8VY28	2,10E-83	669	50,7
Proteína de la familia de dieno lactona hidrolasa <i>Prauserella muralis</i>	<i>PmProtH</i>	A0A2V4AKA1	8,10E-83	662	50,7
Lipasa de <i>Cellulomonas cellasea</i> DSM 20118	<i>CcLipasa</i>	A0A0A0B7G5	1,30E-82	663	50,6
Lipasa trigiglicerol de <i>Actinosynnema mirum</i> (cadena ATCC 29888/DSM43827/JCM3225/ NBRC 14064 / NCIMB 13271 / NRRLB-12336/ IMRU 3971 / 101)	<i>AmLipasaT</i>	C6WFI2	9,40E-87	687	50,5
Alpha/beta hidrolasa de <i>Actinoplanes sp</i> ATCC53533	<i>Asα_βHidrolasa</i>	A0A428YT29	2,30E-86	685	50,4
Alpha/beta hydrolasa de <i>Micromonospora endolithica</i>	<i>Meα_βHidrolasa</i>	A0A3A9YUB8	7,50E-84	669	50,3

*E-value: Secuencias probablemente homologas (0.02 - 1.0: homología no descartable; >1: Homología no significativa) Score: Puntuación de probabilidad para cada posición en una alineación que se basa en la frecuencia con la que se sabe que ocurre esa sustitución entre los bloques de consenso dentro de proteínas relacionadas % SEQ: Porcentaje de identidad de secuencia

Fuente: UniProt (2021)

Adicionalmente, con el fin de identificar proteínas que no necesariamente comparten una alta identidad de secuencia pero que presentan homología de su arquitectura 3D con respecto a la *IsPETasa*, se comparó la estructura secundaria de *IsPETasa* nativa con todas las estructuras depositadas en el Protein Data Bank (PDB) mediante el uso de la herramienta PDBfold. Los resultados de este experimento se visualizan en la tabla 4. La comparación entre las estructuras se realizó mediante el uso de diferentes variables, tales como, RMSD, porcentaje de similitud de secuencia o identidad de secuencia (%SEQ), porcentaje de identidad de la estructura secundaria o porcentaje de elementos de la estructura secundaria (%SSE), valor Q, valor P y valor Z.

El RMSD representa la desviación cuadrática media de la similitud calculada entre átomos de carbono α de los residuos emparejados en la mejor superposición tridimensional de las estructuras analizadas; es decir, indica una media de cuan separado está un par de átomos de carbono α de dos estructuras diferentes. Generalmente, cuanto más grande es el RMSD, mayores son las diferencias en el plegamiento de la estructura secundaria de las estructuras emparejadas (**Jha et al., 2019**). El valor Q representa la puntuación con respecto a la calidad de alineación entre las estructuras, siendo 1 la puntuación más alta. El valor P indica la probabilidad de encontrar un emparejamiento de calidad al elegir las diferentes estructuras analizadas, por lo que toma en cuenta el RMSD, el número de aminoácidos alineados, la cantidad de elementos de estructura secundaria coincidentes y la puntuación de coincidencia de elementos de estructura secundaria. Finalmente, la puntuación Z mide la significancia estadística de coincidencias en términos de estadísticas gaussianas. Es decir, si dos estructuras coinciden de forma única entre sí. Esta puntuación permite determinar la calidad de coincidencias a nivel estructural de manera que se obedece la distribución gaussiana, con la probabilidad de que se pueda encontrar la misma calidad o una mejor coincidencia, por lo tanto, mientras más elevado sea el valor de Z mayor será la significancia estadística de la comparación (**Jha et al., 2019**).

El porcentaje de similitud de secuencia (%SEQ) se calcula como la fracción de pares de residuos idénticos entre todos los residuos alineados. Este porcentaje indica que, si dos cadenas idénticas están alineadas de modo que solo se mapeen entre sí residuos idénticos, entonces el %SEQ resultaría igual al 100%. Se estima que si el %SEQ es igual o superior a

45% existe la probabilidad de una posible función similar entre las estructuras comparadas, mientras que si este valor se ubica entre 25 - 45% significa que solamente existe similitud en el plegamiento 3D general. Si este es menor al 20 % no existe similitud estructural (**Espín & García, 2021; Jha et al., 2019**). Por otra parte, el porcentaje de identidad de la estructura secundaria (% SSE) indica la relación entre dos estructuras con respecto al plegamiento de las cadenas polipeptídicas. Este valor indica qué fracción de la estructura secundaria de la cadena objetivo se identificó en la proteína de consulta (**PDBeFold, 2021**).

A partir de estas premisas se determinó que, de acuerdo con los datos presentados en la tabla 4, la enzima que presenta la mayor similitud estructural es la enzima PETasa de *R. gummiphila* (*RgPETasa*) y sus variantes mutantes, siendo el mutante E186A la que posee valores más significativos ya que tanto su porcentaje de SEQ como de SSE son elevados (78 y 100% respectivamente). Además, el solapamiento de ambas enzimas muestra un valor de RMSD bajo (0,60) lo cual sugiere que la posición de los residuos en ambos polipéptidos es similar. Por otra parte, la comparación de *IsPETasa* y *RgPETasa* mostró una elevada puntuación de calidad de alineación, Q (0,91) y valores P y Z significativos (33,6 y 17,4 respectivamente). Estos resultados correlacionan con el análisis previo, donde se observó que *RgPETasa* presenta además una elevada identidad de secuencia. *RgPETasa* es la primera PET hidrolasa que tiene un nivel de actividad sobre el PET similar al de *IsPETasa* a temperatura ambiente. Esto se debe a que ambas enzimas comparten ciertas características estructurales que se conoce que en *IsPETasa* son clave para una alta actividad de hidrólisis de PET, tales como los residuos que constituyen la tríada catalítica, un amplio sitio de unión del sustrato, el bucle de conexión extendido $\beta 8-\alpha 6$ y los dos enlaces disulfuro. Sin embargo, *RgPETasa* por su parte muestra una conformación única del bucle oscilante que contiene a W185. Además, se conoce que su actividad de degradación se ve afectada por el cambio de la carga superficial electrostática en el bucle (**Sagong et al., 2021**).

Por otra parte, la estructura de *IsPETasa* muestra un alto grado de homología estructural con la hidrolasa de *B. bacterium* (*BbHidrolasa*) la cual, según **Chen et al., (2021)**, posee características clave como la presencia del subsitio IIB y W315, análogo al residuo W185 en *IsPETasa*. No obstante, como se mencionó anteriormente, W315 se encuentra empaquetado por una histidina (H344) para adoptar la conformación de tipo C.

Tabla 4. Enzimas que comparten similitud estructural con IsPETasa

Nombre	Abreviatura	Código	RMSD	%SEQ	%SSE	Q	P	Z
PETasa E186A mutante de <i>Rhizobacter gummiphilus</i>	RgPETasa_E186A	7dzv:A	0.60	78	100	0.91	33.6	17.4
PETasa K169A mutante de <i>Rhizobacter gummiphilus</i>	RgPETasa_K169A	7dzu:A	0.70	78	100	0.90	34.5	17.7
Hidrolasa de <i>Burkholderiales bacterium</i>	BbHidrolasa	7cwq:B	0.76	65	100	0.89	31.5	16.9
Alfa / Beta hidrolasa enzima sintética	α _ β Hidrolasa	7cuv:A	1.05	50	100	0.81	27.7	15.8
Cutinasa CUT190 S176A / S226P / R228S / mutante CA (2 +) de <i>Saccharomonospora viridis</i>	SvCUT190_S176A_S226P_R228S	5zno:A	1.10	46	100	0.81	28.1	15.9
Cutinasa CUT190 / S226P / R228S / con el terminal C tres residuos de eliminación de <i>Saccharomonospora viridis</i>	SvCUT190_S226P_R228S	7cef:A	1.12	46	100	0.80	28.3	16.0
Cutinasa CUT190 con mutaciones de inactivación S226P / R228S / Q138A / D250C-E296C / Q123H / N202H y S176A de <i>Saccharomonospora viridis</i>	SvCUT190_8M	7cts:A	1.12	46	100	0.80	28.5	16.0
Cutinasa CUT190 S176A / S226P / R228S mutante en ZN (2 +) - estado conducido de <i>Saccharomonospora viridis</i>	SvCUT190_S176A_S226P_R228S_Zn(2+)	5zrq:A	1.12	46	100	0.80	28.4	16.0
Hidrolasa PE-H Y250S mutante de <i>Pseudomonas aestusnigri</i>	PaHidrolasa_Y250S	6scd:A	1.12	51	100	0.82	28.5	16.0

Cutinasa CUT190 S176A / S226P / R228S mutante en estado conducido por monoetil adipato de <i>Saccharomonospora viridis</i>	SvCUT190_S176A_S226P_R228S_MA	5zrs:A	1.18	45	100	0.80	28.4	16.0
Cutinasa CUT190 S226P MUTANTE EN CA (2 +) - estado libre de <i>Saccharomonospora viridis</i>	SvCUT190_S226P	4wfi:A	1.29	44	100	0.75	24.6	14.9
PETasa de <i>Rhizobacter gummiphilus</i>	RgPETasa	7dzt:A	0.62	78	93	0.91	32.1	17.1
Cutinasa 2 de <i>Thermobifida cellulosilytica</i>	TcCUT2	5luj:A	1.03	53	93	0.77	24.2	14.7
Lipasa <i>Streptomyces exfoliatus</i> con resolución 1.9A	SeLipasa	1jfr:A	1.04	49	93	0.79	28.1	15.9
Poliéster hidrolasa LEIPZIG 7 aislada de un metagenoma de compost	Poliester_Hidrolasa	7nei:B	1.05	50	93	0.82	26.5	15.4
Cutinasa <i>Thermobifida alba</i>	TaCUT	6aid:A	1.09	50	93	0.78	26.0	15.3
Lipasa PET 2 mutante F105R- E110K proveniente de un conjunto de datos metagenómicos marinos	UbLipasaPET2_F105R_E110K	7ec8:B	1.10	55	93	0.82	29.7	16.3
Lipasa PET2 R47C-G89C- F105R-E110K-S156P-G180A-T297P de un conjunto de datos metagenómicos marinos	UbLipasaPET2_7M	7ecb:A	1.11	53	93	0.81	29.5	16.3
Cutinasa de <i>Thermobifida fusca</i>	TfCUT	5zoa:A	1.12	54	93	0.77	24.7	14.9
Cutinasa EST119 de <i>Thermobifida alba</i> AHK119	TaCUT_EST119_AH K119	3vis:A	1.12	50	93	0.81	24.7	14.9
Cutinasa unida a calcio EST119 de <i>Thermobifida alba</i> .	TaCUT_EST119	3wyn:A	1.12	51	93	0.80	24.6	14.9
Cutinasa 1 de <i>Thermobifida cellulosilytica</i>	TcCUT1	5lui:A	1.16	53	93	0.77	26.2	15.3

Variante doble de cutinasa 2 de <i>Thermobifida cellulositytica</i>	<i>Tc</i> CUT2_doble	5luk:A	1.16	53	93	0.77	26.6	15.5
Variante triple de cutinasa 2 de <i>Thermobifida cellulositytica</i>	<i>Tc</i> CUT2_triple	5lul:A	1.16	53	93	0.78	25.0	15.0
Cutinasa CUT190 S226P / R228S / Q138A / D250C-E296C / Q123H / N202H de <i>Saccharomonospora viridis</i>	<i>Sv</i> CUT190_7M	7ctr:B	1.20	44	93	0.75	24.8	14.9
Cutinasa CUT190 S176A / S226P / R228S / con terminal C eliminación de tres residuos en forma de expulsión de ligas de <i>Saccharomonospora viridis</i>	<i>Sv</i> CUT190_S176A_S226P_R228S_EIR	7ceh:A	1.21	45	93	0.70	26.3	15.4
Hidrolasa termostable de <i>Thermobifida fusca</i>	<i>Tf</i> Hidrolasa_TerEst	4cg3:A	1.20	53	87	0.79	22.7	14.3
Poliéster hidrolasa PE-H de <i>Pseudomonas aestusnigri</i>	<i>Pa</i> Poliester_Hidrolasa	6sbn:A	1.22	50	87	0.70	25.5	15.1
Cutinasa cut190 S176A / S226P / R228S en estado obligado a succinato de monoetilo de <i>Saccharomonospora viridis</i>	<i>Sv</i> CUT190_S176A_S226P_R228S_SM	5zrr:A	1.28	44	87	0.70	24.7	14.9
Lipasa de <i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Pm</i> Lipasa	2fx5:A	2.10	23	87	0.48	10.6	9.9

Código: Codificación de 4 dígitos PDB y separado por dos puntos a se localiza la cadena de la cual se toma en consideración el análisis. RMSD: Desviación cuadrática media de la raíz entre los átomos de los residuos emparejados, representa la similitud entre la superposición de las coordenadas atómicas equivalentes. %SEQ: Porcentaje de identidad de secuencia. % SSE: identidad de la estructura secundaria Q: Calidad de alineación, siendo 1 la puntuación más alta. P: Probabilidad de encontrar un emparejamiento de calidad al elegir las estructuras de una base de datos al azar. Z: Mide la significación estadística de una coincidencia en términos de estadísticas gaussianas.

Fuente: PDBeFold, (2022)

3.1.3. Alineamiento múltiple de secuencias y comparación estructural de la enzima *IsPETasa* y sus enzimas homólogas

A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis BLAST llevado a cabo en UniProt y la comparación estructural realizada en PDBefold, se construyó dos alineamientos múltiples de secuencias mediante la herramienta Clustal Omega (anexos 1 y 2). Con base a los alineamientos se analizó el grado de conservación de residuos clave para la actividad de *IsPETasa* en las diferentes enzimas homólogas identificadas en el presente estudio. De manera general, los aminoácidos correspondientes a la triada catalítica de *IsPETasa* presentan un alto grado de conservación. En el caso del residuo S160 se observó que este es substituido por alanina en la cutinasa de *Saccharomonospora viridis*, SvCUT190_8M y en las variantes mutantes de la cutinasa SvCUT190_S176A_S226P_R228S (figura 10A). La mutación S176A realizada en SvCUT190_S176A_S226P_R228S también se ha ensayado en *IsPETasa* dando como resultado una pérdida casi completa de la actividad enzimática (Joo et al., 2018). Del análisis estructural se pudo deducir que el efecto negativo de la substitución S160A se debe a que la serina es crucial para la estabilización del sustrato en el sitio activo mediante la formación de contactos polares entre el grupo hidroxilo y el grupo ester del sustrato. La alanina, al poseer un extremo apolar, provocaría interacciones hidrofóbicas negativas que repelerían al sustrato, impidiendo que la enzima trabaje de manera adecuada (figura 10B).

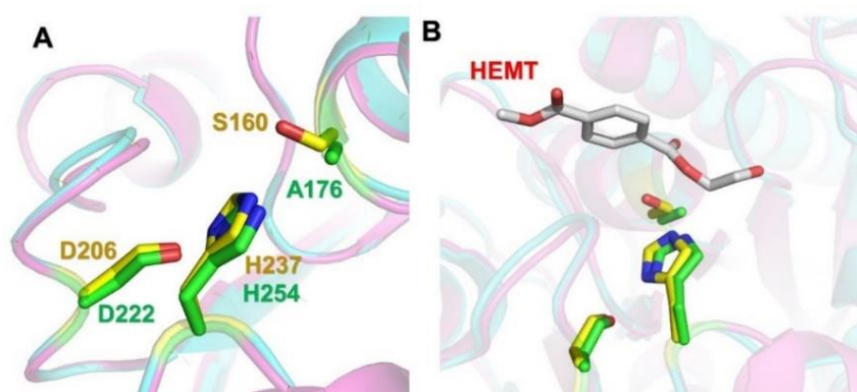


Figura 10. Sobreposición de SvCUT190_S176A_S226P_R228S en *IsPETasa*.

A. Se muestra como los aminoácidos pertenecientes a la triada catalítica de SvCUT190 (verde) se sobreponen en *IsPETasa* (amarillo). **B.** HEMT acoplado en el sitio activo de la sobreposición de SvCUT190_S176A_S226P_R228S en *IsPETasa*.

Fuente: Elaboración propia.

Según Numoto et al., (2018) la variante mutante de SvCUT190_S226P/R228S, presenta una alta actividad catalítica y estabilidad térmica empleando succinato de monoetilo y adipato de monoetilo como sustratos. Al observar el alineamiento múltiple de secuencias (anexo 2) se pudo determinar que en la posición S226P, *IsPETasa* posee una prolina, lo cual sugiere una posible adaptación de la enzima para descomponer el PET. Con respecto a la mutación R228S se observó que en esta posición *IsPETasa* posee el residuo N212 (Figura 11) el cual se localiza en el subsitio II implicado en la catálisis. Por lo tanto, con base a este análisis se podría considerar la sustitución de N212S en *IsPETasa* (o N212R), ya que existe la posibilidad de mejorar la actividad y estabilidad térmica como sucedió en SvCUT190_S176A_S226P_R228S. En la superposición de las estructuras de *IsPETasa* y SvCUT190_S176A_S226P_R228S (Figura 11) se puede observar que la cadena lateral más corta de la serina podría contribuir con formación de contactos polares adicionales con el sustrato o al agrandamiento de la superficie del sitio activo.

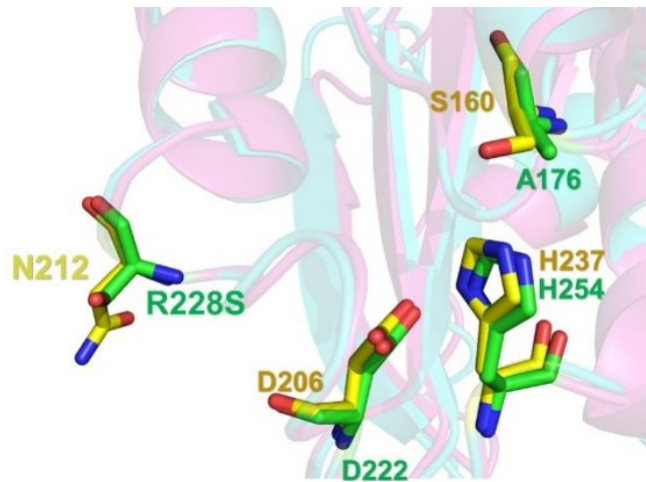


Figura 11. Sobreposición de la mutante R228S de SvCUT190_S176A_S226P_R228S (código PDB 5ZNO) en el residuo N212 de *IsPETasa*.

Se visualiza la mutante R228S de color verde, mientras que en el residuo N212 de *IsPETasa* se encuentra de color amarillo. La triada catalítica de las dos enzimas mantiene el código de colores de la figura 10.

Fuente: Elaboración propia.

La enzima SvCUT190 posee la característica única de que su actividad catalítica y estabilidad se encuentran reguladas por la unión de tres iones Ca^{2+} (Senga et al., 2019). En la estructura cristalina de SvCUT190_S176A_S226P_R228S (código PDB 5ZNO) se puede observar que estos iones metálicos se posicionan en tres diferentes sitios (figura 12A). Se conoce que el sitio 2 contribuye en la estabilidad enzimática, mientras que los sitios 1 y 3 están relacionadas con la actividad catalítica de la enzima. El sitio 1 se encuentra conformado por los residuos S76, A78, F81 y N133; el sitio 2 por E220, D250 y E296 residuos ubicados en los bordes de $\beta 7$, $\beta 8$ y $\beta 9$, respectivamente; y el sitio 3 se localiza entre el bucle $\beta 6$ y $\beta 7$, siendo las cadenas laterales de D204 y T206 las que contribuyen en la vinculación del ion metálico (Senga et al., 2021). Diversos estudios han evaluado el efecto de otros iones metálicos sobre la actividad de SvCUT190, incluyendo los iones Mn^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+} ; sin embargo, la relación entre el ion metálico, concentración y la estabilidad de la enzima es mucho más pronunciada para Ca^{2+} (Kawabata et al., 2017; Miyakawa et al., 2015; Numoto et al., 2018; Oda et al., 2018).

Como se visualiza en la figura 12, al realizar la sobreposición de la enzima SvCUT190_S176A_S226P_R228S en *IsPETasa* se reconoció que los aminoácidos presentes en los sitios de unión de los iones metálicos no se encuentran totalmente conservados. No obstante, se observó que en el sitio 2 el residuo E220 también se localiza en *IsPETasa* como E204, además de que al comparar estructuralmente D250 con N233 se identificó que la cadena lateral que permite la unión del residuo con el ion metálico, tanto del ácido aspártico como de la asparagina, coincide en ambas enzimas. Por otra parte, al comparar los residuos correspondientes al sitio 1 en SvCUT190 con los presentes en *IsPETasa* se determinó que ambas presentan una asparagina, N133 y N114, respectivamente. Por lo tanto, bajo este análisis se puede hipotetizar que probablemente el ion Ca^{2+} no pueda unirse correctamente a *IsPETasa* en los tres sitios descritos. Sin embargo, es interesante considerar la posibilidad de evaluar el efecto de diferentes iones sobre la actividad de la enzima.

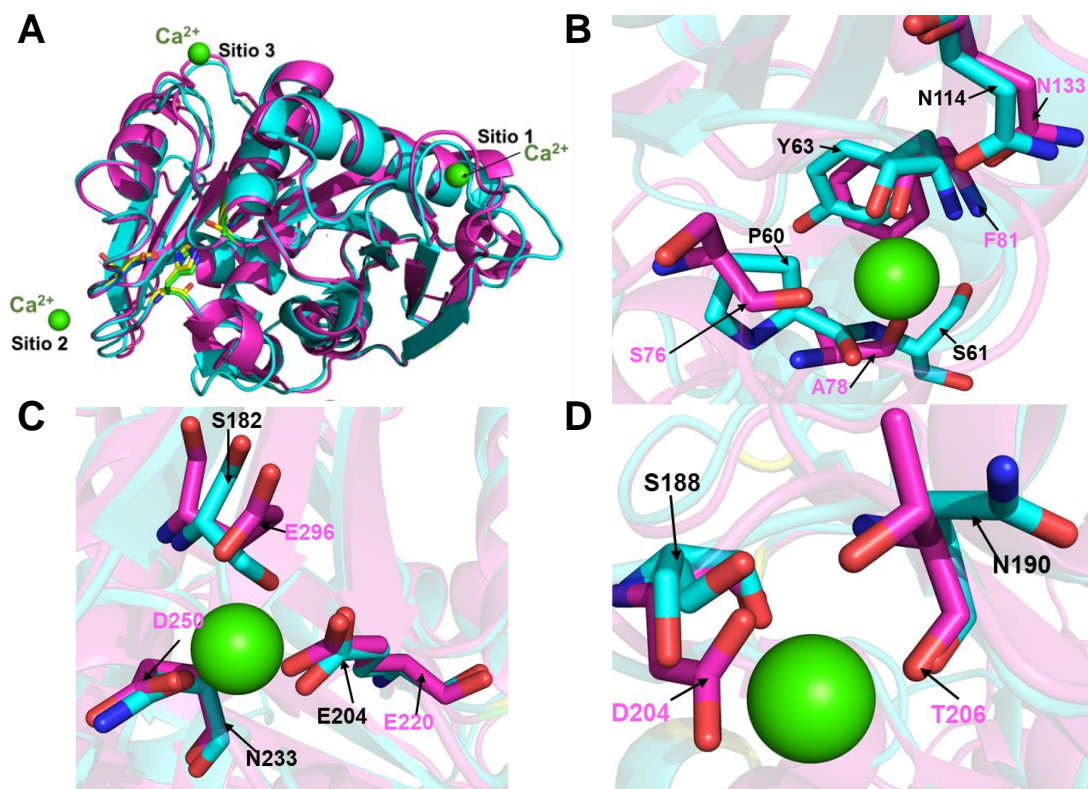


Figura 12. Sitio de unión de los iones metálicos en SvCUT190.

A. Ubicación de los sitios 1, 2 y 3 en donde se encuentra insertados los iones metálicos de Ca^{2+} en SvCUT190. Las esferas de color verde representan al ion Ca^{2+} . La triada catalítica se encuentra marcada siguiendo el código de colores de la figura 10 **B, C, D.** Vistas en primer plano de los sitios 1, 2 y 3 del ion Ca^{2+} , respectivamente. Los residuos correspondientes a *IsPETasa* se encuentran de color cian, mientras que los residuos pertenecientes a SvCUT190 de color fucsia.

Fuente: Elaboración Propia

Como se mencionó anteriormente, la hidrolasa *BbHidrolasa* y lipasa *PbLipasaT* también presentaron un alto grado de homología con *IsPETasa* (Tabla 3 y 4). Mediante la sobreposición de estas enzimas se visualizó que *BbHidrolasa*, al igual que *IsPETasa*, presenta un triptófano en la posición W185, el cual en *BbHidrolasa* corresponde a W315. Este residuo se encuentra empaquetado por H344, equivalente a S214 en *IsPETasa*, lo cual limita su capacidad para cambiar de conformación (**Chen et al., 2021**). *BbHidrolasa* también presenta una triada catalítica compuesta por S290, H238 y D336 (figura 13A). El modelo computacional de *PbLipasa* construido a partir de la estructura cristalina de *BbHidrolasa* (70,41% de identidad de secuencia)

(**BIOZETRUM, 2022**) muestra que tanto los residuos de la triada catalítica, como W185 se encuentran totalmente conservados. En el caso de S214, *Pblipasa* presenta una sustitución por histidina, similar a lo observado en *BbHidrolasa* (figura 13B).

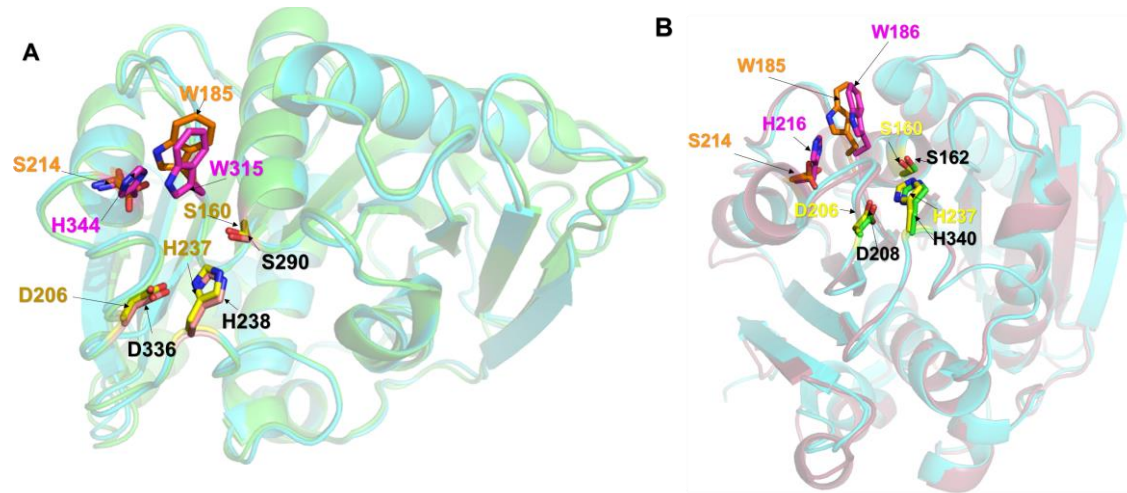


Figura 13 Sobreposición de las estructuras 3D de las enzimas *Bbhidrolasa* (código PDB 7CWQ) y *Pblipasa* en *IsPETasa*.

A. Sobreposición de la enzima *BbHidrolasa* en *IsPETasa* en donde se visualiza la triada catalítica de *BbHidrolasa* de color rosa con etiquetas negras, mientras que los residuos correspondientes al triptófano 315 e histidina 344 se encuentran marcados de color fucsia.

B. Sobreposición de la enzima *Pblipasa* en *IsPETasa*, la triada catalítica de *Pblipasa* se encuentra de color verde con etiquetas negras, mientras que los residuos correspondientes al triptófano 186 e histidina 216 se encuentran marcados de color fucsia. La triada catalítica de *IsPETasa* esta etiquetada de color amarillo.

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, *RgPETasa* comparte tanto un alto porcentaje de similitud de secuencia como de identidad de estructura secundaria con *IsPETasa*. Ambas enzimas comparten características estructurales clave, como la conformación de la triada catalítica (que en el caso de *RgPETasa* corresponde a los residuos S158, D203 y H234) y un alto grado de similitud en su sitio de unión del sustrato (figura 14A). Similar a lo observado en otras enzimas homólogas de *IsPETasa*, el bucle de conexión extendido $\beta 8$ - $\alpha 6$ de *RgPETasa* presenta la sustitución serina por histidina (H211) con respecto al residuo S214 de *IsPETasa* (figura 14B). Como se mencionó anteriormente, las interacciones que ocurren entre la histidina y W183 limitan la oscilación de su cadena lateral

(Sagong et al., 2021). Con base en esta observación y considerando que *Is*PETasa y *Rg*PETasa tienen similar actividad, podría ser relevante investigar el efecto de la sustitución S214H en *Is*PETasa.

Cabe recalcar que para la sobreposición de esta enzima se empleó la estructura cristalina de la variante *Rg*PETasa_E186A debido a que es la que presenta mayor grado de homología con *Is*PETasa, sin embargo, de acuerdo con los estudios realizados por Sagong et al., (2021), esta mutación reduce en un 75% la actividad de degradación de la enzima. No obstante, también se determinó que generó una mayor flexibilidad en el bucle oscilante que contiene triptófano 183, por lo que se plantea la posibilidad de realizar esta variante en *Is*PETasa la cual en esta posición presenta un residuo S188 (figura 14C). También se podría estudiar el efecto que causaría el realizar una sustitución por ácido glutámico el cual es el aminoácido original de *Rg*PETasa, formando así la variante *Is*PETasa_S188E

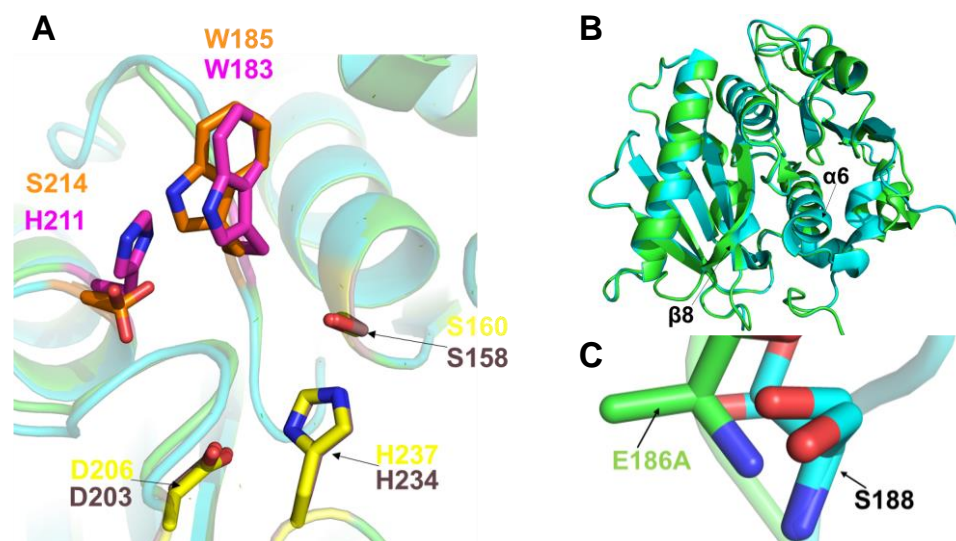


Figura 14. Sobreposición estructural de *Rg*PETasa_E186A (código PDB 7DZV) en *Is*PETasa.

A. Sitio activo de *Rg*PETasa e *Is*PETasa. La triada catalítica se muestra de color amarillo para *Is*PETasa y café para *Rg*PETasa. Los residuos W185 y S214 de *Is*PETasa son de color naranja, mientras que los residuos W186 y H216 de *Rg*PETasa son de color fucsia. **B.** Vista general del plegamiento de *Rg*PETasa en *Is*PETasa. El bucle de conexión extendido $\beta 8$ - $\alpha 6$ se sobrelapa perfectamente en ambas enzimas. **C.** Sobreposición de E186A en el residuo S188 de *Is*PETasa.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.4. Análisis de las variantes mutantes W159H, S238F, S121E, D186H, y R280A de *IsPETasa* con respecto a sus enzimas homólogas.

Para el análisis de las variantes mutantes W159H, S238F, S121E, D186H, y R280A de *IsPETasa* con respecto a las enzimas homólogas identificadas, se empleó el alineamiento múltiple de secuencias descrito en los anexos 1 y 2. En la figura 15 se muestra un fragmento de los alineamientos en donde se localizan las variantes W159H y S238F. En el caso del mutante W159H se observó que más de dos tercios de las secuencias presentan la substitución del triptófano por histidina. Este resultado sugiere que la prevalencia del residuo histidina en esta posición obedece a procesos de evolución que sufrieron gran parte de las enzimas homólogas a *IsPETasa* para maximizar su actividad catalítica y estabilidad. Además, la cutinasa de *Arenicella xantha* (Ax CUT) muestra en esta posición un resto de fenilalanina, un residuo aromático sin carga. Este resultado sugiere la posibilidad de ensayar la substitución W159F en *IsPETasa*. Con respecto a la mutación S238F, se identificó que la mayoría de las enzimas homólogas poseen el residuo fenilalanina (figura 15). Por otra parte, cinco enzimas homólogas poseen una tirosina en esta posición. En el caso de *PbLipasaT*, la cual comparte un alto grado de homología con *IsPETasa*, presenta una treonina en el lugar de S238, por lo que se podría desarrollar la variante *IsPETasa* S238T. Además, se reconocieron otros aminoácidos diferentes en esta posición tales como triptófano en las variantes de lipasa PET 2 enzima proveniente de un conjunto de datos metagenómicos marinos (*UbLipasaPET2* _F105R_E110K y *UbLipasaPET2*_R47C_G89C_F105R_E110K S156P G180A_T297P), leucina en la poliéster hidrolasa LEIPZIG 7 aislada de un metagenoma de compost (Poliester_Hidrolasa) y la enzima sintética Alfa / Beta hidrolasa (α _ β Hidrolasa); y una asparagina en la cutinasa de *Arenicella xantha* (Ax CUT). Virtualmente, es plausible ensayar todas estas substituciones con el fin de incrementar la actividad y/o estabilidad de la enzima *IsPETasa*.

Las variantes mutantes W159H/ S238F fueron ensayadas por **Austin et al., (2018)** como una mutante doble ya que, según el modelo de homología, se predijo que al introducir ambas mutaciones se estrecharía el sitio activo de *IsPETasa* de manera que el sitio de unión del sustrato se asemejaría al de las cutinasas. Como consecuencia,

esto permitió una despolimerización más eficiente del PET. En el presente estudio, se sugiere seguir este principio e introducir mutaciones diferentes a las ensayadas por **Austin et al., (2018)** tomando en consideración las sustituciones identificadas mediante los análisis de identidad de secuencia y homología estructural.

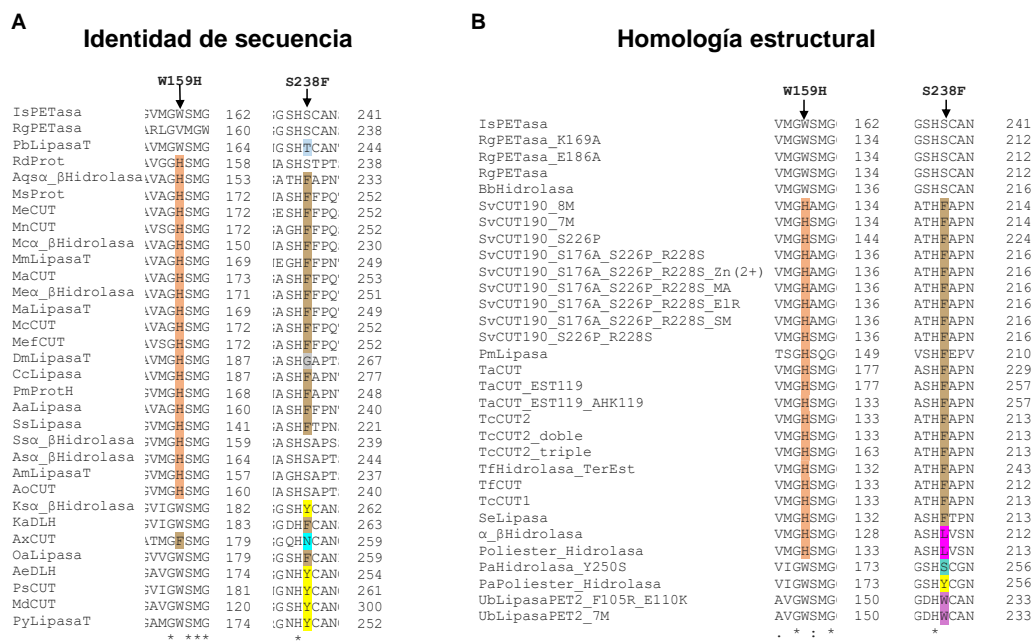


Figura 15. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencia correspondiente a las mutantes W159H y S238F.

A. Alineamiento por identidad de secuencia. **B.** Alineamiento múltiple de secuencias por homología estructural. En el alineamiento el nombre de las variantes mutantes se encuentra localizado en la parte superior de las secuencias. Los aminoácidos se encuentran coloreados de la siguiente manera: fenilalanina (marrón), histidina (naranja), asparagina (cian), tirosina (amarillo), treonina (celeste), leucina (fucsia), serina (turquesa), triptófano (lila).

Fuente: Elaboración propia

Por otra parte, al analizar la variante mutante S121E se identificó que en la mayoría de las enzimas homólogas en esta posición predominan los aminoácidos alanina, ácido aspártico y glicina. Sin embargo, también se observó que, en el caso de la *BbHidrolasa*, Hidrolasa PE-H Y250S mutante de *P. aestusnigri* (*PaHidrolasa_Y250S*), Poliéster hidrolasa PE-H de *P. aestusnigri* (*PaPolíester_Hidrolasa*), Proteína de *Alkalilimnicola ehrlichii* (*AeDLH*), Cutinasa de *Pseudomonas salegens* (*PsCUT*) y Triglicérol lipasa de *Pseudomonas yangmingensis* (*PyLipasaT*) presentan en esta posición una prolina (figura 16). De todas estas sustituciones, se conoce que la mutación S121D

incrementa significativamente la actividad de *IsPETasa* (Chen et al., 2018), por lo cual parecería que la enzima requiere un aminoácido polar en esta posición para despolimerizar el PET. No obstante, se debe considerar ensayar otras sustituciones, como S121A, S121G o S121P, para confirmar esta hipótesis.

En el caso de la variante mutante D186H se observó que la sustitución predominante es por asparagina, seguida de la histidina (figura 16). También se notó la presencia de otros aminoácidos, como alanina, tirosina, y treonina, por lo que existe la posibilidad de realizar sustituciones por todos estos aminoácidos. Cabe recalcar que en *RgPETasa*, la cual es la enzima que presenta un mayor porcentaje de homología tanto estructural como de secuencia con *IsPETasa*, en esta posición muestra una alanina.

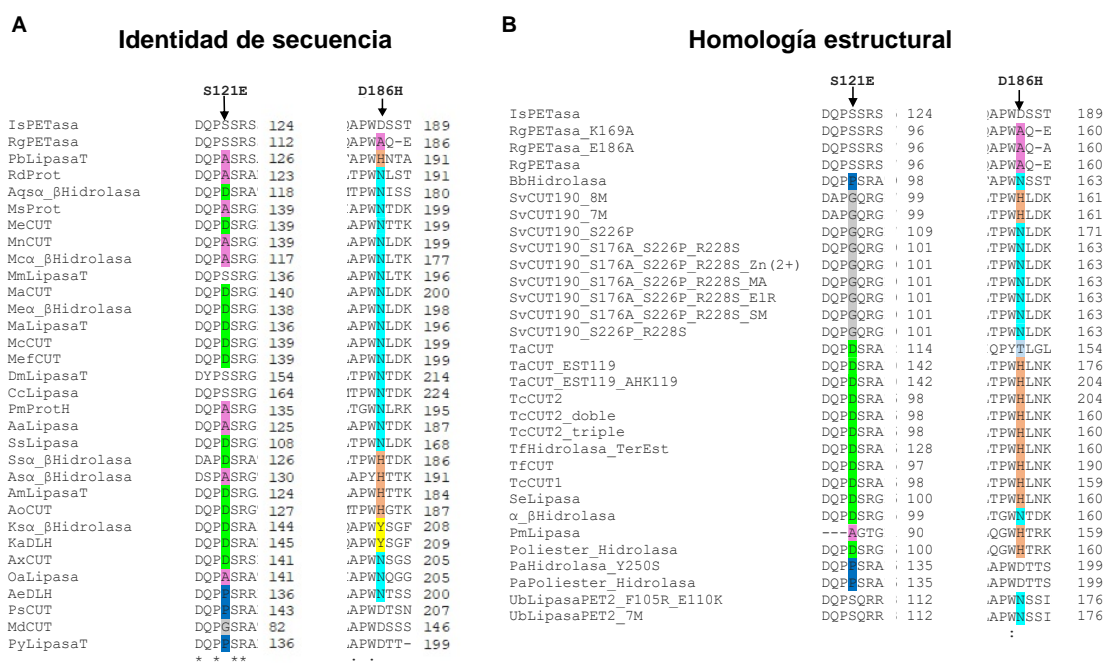


Figura 16. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencia correspondiente a las mutantes S121E y D186H

A. Alineamiento por identidad de secuencia. **B.** Alineamiento múltiple de secuencias por homología estructural. En el alineamiento el nombre de las variantes mutantes se encuentra localizado en la parte superior de las secuencias, los aminoácidos se encuentran coloreados de la siguiente manera: alanina (rosado), ácido aspártico (verde), prolina (azul), glicina (gris), histidina (naranja), asparagina (cian), tirosina (amarillo), treonina (celeste).

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, al analizar los alineamientos múltiples de secuencias para la mutación R280A, se identificó que de las enzimas analizadas únicamente *SvCUT190* presenta esta substitución. En las demás enzimas homólogas predominan los residuos leucina y el ácido aspártico. Además de estas substituciones se logró distinguir varios aminoácidos diferentes, como la glicina, tirosina, cisteína, fenilalanina y glutamina (figura 17). Cabe mencionar que varias enzimas cutinasas, lipasas e hidrolasas identificadas mediante el análisis de identidad de secuencia no contienen residuos equivalentes a R280. La variante R280A se encuentra localizada en el extremo C-terminal de *IsPETasa*, por lo que según **Son et al., (2019, 2020)** al alterar los residuos en esta zona se busca alterar la estructura de la enzima para aumentar la afinidad de unión al sustrato.

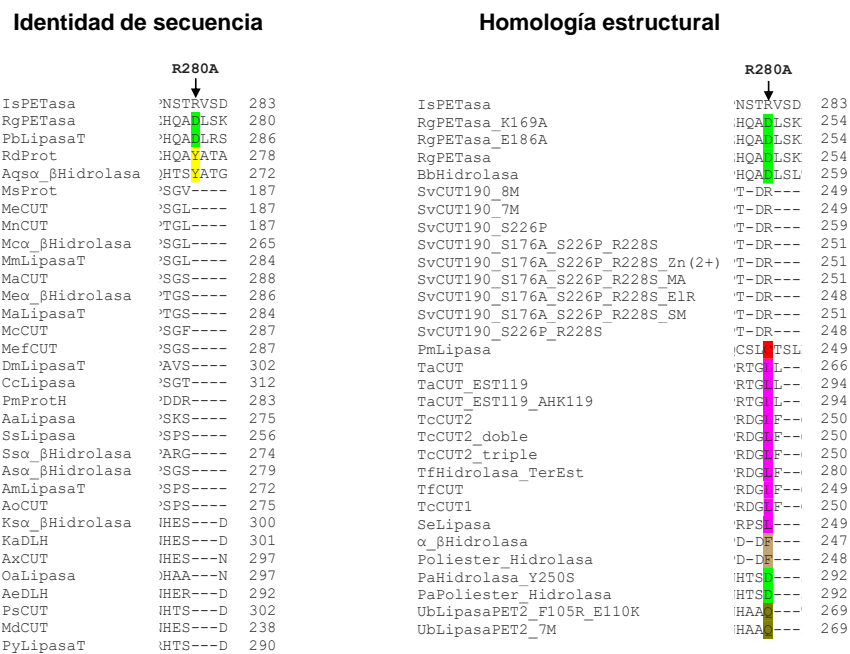


Figura 17. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencias correspondiente a la mutante variante R280A.

Los aminoácidos se encuentran coloreados de la siguiente manera: ácido aspártico (verde), fenilalanina (marrón), tirosina (amarillo), leucina (fucsia), cisteína (rojo), glutamina (oliva).

Fuente: Elaboración Propia

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Mediante el análisis estructural de la enzima *IsPETasa* y el de sus enzimas homólogas, se identificaron los sitios fundamentales para la hidrólisis del PET, así como los principales residuos involucrados en este proceso. A partir de estas premisas y al realizar la comparación estructural con distintas enzimas con un alto grado de homología se establecieron posibles modificaciones a la enzima *IsPETasa* de manera que se mejore su actividad catalítica y su estabilidad enzimática.
- A través del empleo de las bases de datos y herramientas virtuales se reconocieron las enzimas que comparten un alto grado de homología con *IsPETasa*, tomando en cuenta que para la compilación de las secuencias se consideró tanto la identidad de secuencia como el porcentaje de identidad de estructura secundaria. Las secuencias extraídas se analizaron principalmente tomando en cuenta sus valores de: E-value, Score, Distancia entre los átomos de los residuos emparejados (RMSD) y calidad de alineación (Q).
- De las enzimas analizadas se tomó en consideración para su análisis y comparación a la *PblipasaT*, *RgPETasa*, *BbHidrolasa* y, *SvCUT190* debido a que estas fueron las que poseían valores más significativos. A partir de los análisis realizados se establecieron posibles alteraciones en *IsPETasa* como: la inserción de iones metálicos en la enzima; el desarrollo de la variante N212S para mejorar la actividad y estabilidad enzimática. Además, se planteó la posibilidad de realizar las sustituciones S188E, S188A, S114H para estudiar el efecto que generarían en *IsPETasa*.
- Se comparó cinco diferentes variantes mutantes realizadas en *IsPETasa* (W159H, S238F, S121E, D186H, y R280A) con las enzimas que comparte mayor grado de homología, determinándose que existen diferentes

aminoácidos en las posiciones donde se realizaron las mutaciones, por lo tanto, los aminoácidos identificados en cada variante pueden ser utilizados para la elaboración de posibles nuevas variantes de *IsPETasa*.

4.2. Recomendaciones

- Ensayar el efecto de diferentes iones metálicos, como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+} en *IsPETasa* para identificar con el fin de observar si son capaces de mejorar la actividad y estabilidad de la enzima.
- Desarrollar las diferentes mutantes analizadas con los distintos aminoácidos encontrados en la misma posición para evaluar la estabilidad actividad enzimática que presentaría *IsPETasa* al realizar estas sustituciones.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

- Al-Sabagh, A. M., Yehia, F. Z., Eshaq, G., Rabie, A. M., & ElMetwally, A. E. (2016). Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/J.EJPE.2015.03.001>
- Anuar Sharuddin, S. D., Abnisa, F., Wan Daud, W. M. A., & Aroua, M. K. (2016). A review on pyrolysis of plastic wastes. *Energy Conversion and Management*, 115, 308–326. <https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2016.02.037>
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., Omari, K. el, Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Lee Woodcock, H., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4350–E4357. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115>
- BIOZETRUM. (2022). *Lipasa de triacilglicerol [Polyangio] brachysporum, A0A0G3BI90 (A0A0G3BI90_9BURK)*. <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/A0A0G3BI90?csm=5B7B9D00A30A3F7B>
- Carniel, A., Waldow, V. de A., & Castro, A. M. de. (2021). A comprehensive and critical review on key elements to implement enzymatic PET depolymerization for recycling purposes. *Biotechnology Advances*, 52, 107811. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107811>
- Carr, C. M., Clarke, D. J., & Dobson, A. D. W. (2020). Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2825. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.571265/BIBTEX>
- Chen, C. C., Han, X., Ko, T. P., Liu, W., & Guo, R. T. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. In *FEBS Journal* (Vol. 285, Issue 20, pp. 3717–3723). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14612>
- Chen, C. C., Han, X., Li, X., Jiang, P., Niu, D., Ma, L., Liu, W., Li, S., Qu, Y., Hu, H., Min, J., Yang, Y., Zhang, L., Zeng, W., Huang, J. W., Dai, L., & Guo, R. T. (2021a). General

- features to enhance enzymatic activity of poly(ethylene terephthalate) hydrolysis. *Nature Catalysis*, 4(5), 425–430. <https://doi.org/10.1038/S41929-021-00616-Y>
- Chen, C. C., Han, X., Li, X., Jiang, P., Niu, D., Ma, L., Liu, W., Li, S., Qu, Y., Hu, H., Min, J., Yang, Y., Zhang, L., Zeng, W., Huang, J. W., Dai, L., & Guo, R. T. (2021b). General features to enhance enzymatic activity of poly(ethylene terephthalate) hydrolysis. *Nature Catalysis*, 4(5), 425–430. <https://doi.org/10.1038/s41929-021-00616-y>
- Clustal Omega. (2021). *Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI*. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- Comăniță, E.-D., Hlihor, R. M., Ghinea, C., & Gavrilescu, M. (2016). *OCCURRENCE OF PLASTIC WASTE IN THE ENVIRONMENT: ECOLOGICAL AND HEALTH RISKS* (Vol. 15, Issue 3). <http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ/>
- Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). The contemporary history of plastics. In *Microplastic Pollutants* (pp. 19–37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809406-8.00002-5>
- Dai, L., Qu, Y., Huang, J. W., Hu, Y., Hu, H., Li, S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2021). Enhancing PET hydrolytic enzyme activity by fusion of the cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 334, 47–50. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2021.05.006>
- Damayanti, & Wu, H. S. (2021). Strategic possibility routes of recycled pet. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13091475>
- de Castro, A. M., Carniel, A., Nicomedes Junior, J., da Conceição Gomes, A., & Valoni, É. (2017). Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(6), 835–844. <https://doi.org/10.1007/S10295-017-1942-Z>
- Elamri, A., Zdiri, K., Harzallah, O., & Lallam, A. (2020). *Progress in Polyethylene Terephthalate Recycling*. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02953197>
- Ellis, L. D., Rorrer, N. A., Sullivan, K. P., Otto, M., McGeehan, J. E., Román-Leshkov, Y., Wierckx, N., & Beckham, G. T. (2021). Chemical and biological catalysis for plastics recycling and upcycling. *Nature Catalysis*, 4(7), 539–556. <https://doi.org/10.1038/S41929-021-00648-4>

- Espín, D., & García, M. (2021). *Cribado virtual de inhibidores de la enzima ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) del virus SARS-CoV-2, empleando librerías de compuestos y homología estructural con ARN polimerasas virales.*
- Furukawa, M., Kawakami, N., Oda, K., & Miyamoto, K. (2018). Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Surface Coating with Anionic Surfactants. *ChemSusChem*, 11(23), 4018–4025. <https://doi.org/10.1002/cssc.201802096>
- Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., Xu, L., Cheng, Y. S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>
- Hiraga, K., Taniguchi, I., Yoshida, S., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of waste PET. *EMBO Reports*, 20(11), e49365. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201949365>
- Issifu, I., & Sumaila, U. R. (2020). A review of the production, recycling and management of marine plastic pollution. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/JMSE8110945>
- Jabłńska, B., Kiełbasa, P., Korenko, M., & Drózd, T. (2019). Physical and chemical properties of waste from pET bottles washing as a component of solid fuels. *Energies*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/en12112197>
- Jakobsson, J. (2021). Utveckling av enzymatisk bioremediering av PET. *Linköpings Universitet.*
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Jha, B., Vyas, R., Bhushan, J., Sehgal, D., & Biswal, B. K. (2019). Structural insights into the substrate specificity of SP_0149, the substrate-binding protein of a methionine ABC transporter from *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 75, 520–528. <https://doi.org/10.1107/S2053230X19009038>
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene

- terephthalate) degradation. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>
- Kawabata, T., Oda, M., & Kawai, F. (2017). Mutational analysis of cutinase-like enzyme, Cut190, based on the 3D docking structure with model compounds of polyethylene terephthalate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.02.007>
- Kawai, F., Kawabata, T., & Oda, M. (2019). Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), 4253–4268. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09717-Y/TABLES/1>
- Khoonkari, M., Haghghi, A. H., Sefidbakht, Y., Shekoochi, K., & Ghaderian, A. (2015). Chemical Recycling of PET Wastes with Different Catalysts. *International Journal of Polymer Science*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/124524>
- Klinghoffer, N. B., & Castaldi, M. J. (2013). Gasification and pyrolysis of municipal solid waste (MSW). *Waste to Energy Conversion Technology*, 146–176. <https://doi.org/10.1533/9780857096364.2.146>
- Li, S., Cañete Vela, I., Järvinen, M., & Seemann, M. (2021). Polyethylene terephthalate (PET) recycling via steam gasification – The effect of operating conditions on gas and tar composition. *Waste Management*, 130, 117–126. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2021.05.023>
- Liebming, S., Eberl, A., Sousa, F., Heumann, S., Fischer-Colbrie, G., Cavaco-Paulo, A., & Guebitz, G. M. (2007). Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. *Biocatal. Biotransform.*, 25(2–4), 171–177. <https://doi.org/10.1080/10242420701379734>
- Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., Liu, H., Luo, Y., & Bao, R. (2018). Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(Ethylene terephthalate) hydrolase petase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*, 19(14), 1471–1475. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800097>
- Lopez, G., Artetxe, M., Amutio, M., Alvarez, J., Bilbao, J., & Olazar, M. (2018). Recent advances in the gasification of waste plastics. A critical overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 576–596. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.09.032>

- Miyakawa, T., Mizushima, H., Ohtsuka, J., Oda, M., Kawai, F., & Tanokura, M. (2015). Structural basis for the Ca²⁺-enhanced thermostability and activity of PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4297–4307. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6272-8>
- Narancic, T., & O'Connor, K. E. (2019). Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem? *Microbiology (Reading, England)*, 165(2), 129–137. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000749>
- Numoto, N., Kamiya, N., Bekker, G. J., Yamagami, Y., Inaba, S., Ishii, K., Uchiyama, S., Kawai, F., Ito, N., & Oda, M. (2018). Structural Dynamics of the PET-Degrading Cutinase-like Enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 in Substrate-Bound States Elucidates the Ca²⁺-Driven Catalytic Cycle. *Biochemistry*, 57(36), 5289–5300. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00624>
- Oda, M., Yamagami, Y., Inaba, S., Oida, T., Yamamoto, M., Kitajima, S., & Kawai, F. (2018). Enzymatic hydrolysis of PET: functional roles of three Ca²⁺ ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190*, and its engineering for improved activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 10067–10077. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9374-x>
- PDBeFold. (2021). *Protein Data Bank in Europe*. <https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>
- PDBeFold. (2022). *Protein Data Bank in Europe*. Bringing Structure to Biology. <https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/cgi-bin/ssmsserver>
- Pereira, E. G., da Silva, J. N., de Oliveira, J. L., & MacHado, C. S. (2012). Sustainable energy: A review of gasification technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(7), 4753–4762. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2012.04.023>
- Pérez, J., Rodríguez, A., & Rodríguez, M. (2020). *Biodegradation of polyethylene terephthalate: microorganisms, enzymes and future prospects*. <https://www.genengnews.com/news/molecular-scissors-for-plastic->
- PyMOL. (2021). *PyMOL | pymol.org*. <https://pymol.org/2/>
- Quito, R., & Villafuerte, E. (2011). *PLANTA DE RECICLADO POLIETILENTEREFTALATO*.
- RCSB PDB. (2021). *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB*. <https://www.rcsb.org/search>

- Ritchie, H., & Roser, M. (2018). Plastic Pollution . *Our World in Data*.
<https://ourworldindata.org/plastic-pollution>
- Roth, C., Wei, R., Oeser, T., Then, J., Föllner, C., Zimmermann, W., & Sträter, N. (2014). Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(18), 7815–7823. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5672-0>
- Sagong, H. Y., Son, H. F., Seo, H., Hong, H., Lee, D., & Kim, K. J. (2021). Implications for the PET decomposition mechanism through similarity and dissimilarity between PETases from *Rhizobacter gummiphilus* and *Ideonella sakaiensis*. *Journal of Hazardous Materials*, 416. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126075>
- Senga, A., Hantani, Y., Bekker, G. J., Kamiya, N., Kimura, Y., Kawai, F., & Oda, M. (2019). Metal binding to cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190 and its effects on enzyme activity and stability. *Journal of Biochemistry*, 166(2), 149–156. <https://doi.org/10.1093/JB/MVZ020>
- Senga, A., Numoto, N., Yamashita, M., Iida, A., Ito, N., Kawai, F., & Oda, M. (2021). Multiple structural states of Ca²⁺-regulated PET hydrolase, Cut190, and its correlation with activity and stability. *The Journal of Biochemistry*, 169(2), 207–213. <https://doi.org/10.1093/JB/MVAA102>
- Şimşek, B., Uygunoğlu, T., Korucu, H., & Kocakerim, M. M. (2019). Performance of dioctyl terephthalate concrete. In *Use of Recycled Plastics in Eco-efficient Concrete* (pp. 249–267). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102676-2.00011-6>
- Sinha, V., Patel, M. R., & Patel, J. v. (2008). Pet Waste Management by Chemical Recycling: A Review. *Journal of Polymers and the Environment* 2008 18:1, 18(1), 8–25. <https://doi.org/10.1007/S10924-008-0106-7>
- Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H. Y., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2019). Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for Highly Efficient PET Degradation. *ACS Catalysis*, 9(4), 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00568>
- Son, H. F., Joo, S., Seo, H., Sagong, H. Y., Lee, S. H., Hong, H., & Kim, K. J. (2020). Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 141, 109656. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2020.109656>

- Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2813–2818. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001058/CITE/REFWORKS>
- Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. *ACS Catalysis*, 9(5), 4089–4105. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b05171>
- UniProt. (2021a). *UniProt* . <https://www.uniprot.org/>
- UniProt. (2021b). *Universal Protein*. <https://www.uniprot.org/>
- Webb, H. K., Arnott, J., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2013). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). *Polymers*, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/polym5010001>
- Wei, R., Oeser, T., & Zimmermann, W. (2014). Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes. *Adv. Appl. Microbiol.*, 89, 267–305. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800259-9.00007-x>
- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1302–1307. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12714>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>

ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento múltiple de secuencias de enzimas que comparten similitud de secuencia con IsPETasa.

IsPETasa	-----MNFPRASRLMQ-----AAVLGGLMAVSAA	24
RgPETasa	-----MFGKLPFAR-----ASLAVGALLLSAA	22
PbLipasaT	-----MPPDC--VLPRRLAA-----AALLASATLVPLS	26
RdProt	-----MNFTTL--WRRHA---RACALAAS----V	20
Aqsα _β Hidrolasa	-----MKTT-V--S--RI---KALSLAAA----L	17
MsProt	-----MRNSTTTRPRSSISTLARLAVTAVLAGGA	29
MeCUT	-----MPSPTTIRPRSLVRAVAGLTTAVLLATGG	29
MnCUT	-----MRSPTTTRTHTLRSAVARFAVAAVLAAGG	29
Mcα _β Hidrolasa	-----MAAVLAAGG	9
MmLipasaT	-----MRSTTTTTRPRSL-TLLARLAMTAVLAAGG	28
MaCUT	-----MPVSTTTTRPRSVLSRIGRTAMA AVL VAGG	29
Meα _β Hidrolasa	-----MSSATTTTRTRPLAGRVARLALAATLSATA	29
MaLipasaT	-----MPTTIRSRTSVRALARLAVAALLATGG	27
McCUT	-----MRSPTTTRPRSAVRTVAGLAMA AVL VAGG	29
MefCUT	-----MSSPTTTRPRPAVRLAGLAVA AVL ATAG	29
DmLipasaT	-----MSGYSACPAPY-----DHRGMRKHASLLAALPV-LLAACGTTTSTLTTP	44
CcLipasa	MPLVATLGLALAAGSL-APSASAAAGDPATVETPPVV--SQRAI-DEHA--ATEPQLSLD	54
PmProtH	-----MVLRNPRS--PRWRR-ALGV--VVATLALTG	26
AaLipasa	-----MRKRL-----T----GA--AL-AIALGA	16
SsLipasa	-----	0
Ssα _β Hidrolasa	-----MR--LR--RLIP---SL--IPV--LALS	17
Asα _β Hidrolasa	-----MRNPVK--HLLT---AA--TLVATLVAA	21
AmLipasaT	-----MR--LR--ALFP---AM--AL--LAASA	17
AoCUT	-----MR--IR--SIFC---AL--ST--SALLL	17
RgUp	-----MKLNRLFQ-----VACLAAT---LV	17
Ksα _β Hidrolasa	-----ML-EGRYMKTVRFN TAAAVF---T-----SALLSSQ	27
KaDLH	-----MKLDILKPLIVTL---V-----AGMLSSA	21
AxCUT	-----MKTTTTLIKSTLCI---IS-----LSFSL	21
OaLipasa	-----MNKSILKK---LSFGTSVLLVSMN	21
AeDLH	-----MSSIIKRKLASL---FAFSA-AMLLSTS	24
PsCUT	-----MKTQSIGKTLFSV---VA-AS-ALLFSTS	24
MdCUT	-----	0
PyLipasaT	-----MKHNMHKLALS L---LA-TG-ALMFSSA	23

IsPETasa	-----ATAQTNPYARGPNPTAASLEA-SAGPFTVRSFTVSRP	60
RgDLH	-----AVAQTNPYQRGPDPTVSSLEA-TRGPFSTSSFTVSRP	58
PbLipasaT	-----AAAQTNPYQRGPDPTTRDLED-SRGPFRYASTNVRSP	62
RdProt	VL-----AMSATSGWAQQTGPDPTSASLNA-TAGPFAVSTATVT--	58
Aq α β Hidrolasa	-----AAATLATPALSQTSAPTSASLNA-SSGPLSVSTASVT--	53
MsProt	AL-----AVPAA-AQAADNPYERGPAPTSATLEA-SRGPFFATSSFSVSSL	72
MeCUT	VL-----AAASG-AQAADNPYERGPNPPTAILEA-SRGPFFATASQTVSSL	72
MnCUT	VL-----APSPA-AQAAANPYERGPAPTSAMLEA-SRGPFFATSSSTRVSSL	72
Mc α β Hidrolasa	VV-----ATSSA-AQ-AANPYERGPAPTHAILEA-SRGPFFATSSLNVSSL	51
MmLipasaT	VV-----ATSSA-AQ-AANPYERGPAPTNAILEA-SRGPFFATSSTTVSSL	70
MaCUT	AL-----AASSGPAQAADNPYERGPAPTVALLEA-SRGPFTTASQNVSSL	73
Me α β Hidrolasa	AV-----AAP-A-AAQAASPYERGPNPPTVALLEA-SRGPFFATSSQSVSSW	71
MaLipasaT	AL-----AVPVA--ANAASPYERGPAPTNAILEA-SRGPFFATSSINVSSL	69
McCUT	VL-----ATSPG-AQAANPYERGPAPTSAILLEA-SRGPFFATSSQSVSSW	72
MefCUT	AF-----AAPPAAQAANPYERGPAPTVALLEA-SRGPFFATASQSVSSL	72
DmLipasaT	AV-----TP-QTLSGAATNPYERGPAPTALLEA-ARGPYATASTTVPRS	87
CcLipasa	AP-----AA-LPPVTIAASPYERGPAPTVAIEA-ARGPFAVAQTTVSRF	97
PmProth	GL-----TG-QVAAAQDNPYQRGPDPTQESIEA-PRGPFVSAETRVSS	68
AaLipasa	AT-----FA-GPAASAAENPYERGPDPPTSSIEA-PTGPFSTAETTVSS	58
SsLipasa	-----LT-GPGARAADNPYERGPAPTTASIEA-SRGPYSVSETSVSSL	41
Ss α β Hidrolasa	-L-----AG-VTPATAAEAEYRRGPDPTTAGIEA-PRGPFTAETTTVSR	59
As α β Hidrolasa	LV-----AV-PAGPALAANPYERGPAPTTASIEA-SLGSFAIAQVTVAR	64
AmLipasaT	-V-----AA-PPAALAAASPYERGPAPTTASVEA-ARGPFATATATV--S	57
AoCUT	VG-----AT-APAAQAAANPYERGPAPTISSIQ-A-SRGPFFATASVTVAR	60
RgUp	-----TATAASAVQIGPAPTKASLEA-SRGPFTVATTRL-SA	52
Ks α β Hidrolasa	VFAITDDPVPDVPDPPS-----SGTVRGPDPPTLSALESTRSGPYSVRTENVSNL	78
KaDLH	AFAITPSPTPTPDPTPNPSPDPGSCSGAECYIRGNPTVRALEA-DDGPYSVRTTNVSSF	80
AxCUT	AFGGGS-GGGST---GDDLPLPDTCTSNCGYELGNPNSLSFVSA-AQGPQPVSTVSVSS	76
OaLipasa	ALSWTPSPTPNP---D-PIPDPTPCQDDCDFTRGNPTPSSLEA-STGPYSVATRSVASS	76
AeDLH	V--WSMNPGD-----VPDTCEGDCGYARGPDPTESFLEA-DSGPYTIATSNVSSL	71
PsCUT	V--MASNPTPPP---PPPPSEPTDPGAGSPYQRGNPTTSFLEG-SRQYRVATSNVSSF	78
MdCUT	-----ES-SSGPFVSVRTSNVSSF	17
PyLipasaT	A--LASNPAP-----DTGSGDGSQYQIGPDPTVVFLEA-SSGPFVSVRTSNVSSL	71
	. * :	
IsPETasa	--SGYGAGTVYYPTNA-GGTVGAIIVPGYTARQSSIKWWGPRLASHGFVVITIDTNSTL	117
RgDLH	--SGYGAGTVYYPTNA-GGKVGAIAVVPGYTARQSSINWWGPRLASHGFVVITIDTNSTL	115
PbLipasaT	--SGYGAGTIYYPTDV-SGSVGAVAVVPGYLARQSSIRWWGPRLASHGFVVITLDTRSTS	119
RdProt	SPVGFGGGTIYYPTI--AGQYGVVALSPGFATATQSSVAWLGRRIATHGFVVVTINTNSTL	116

Aqsa_βHidrolasa	LPRGFGGGTIIYYPTV--AAKYGVIAISPGFTATQSSIAWLGRRIATHGFVVITINTNTTL	111
MsProt	LVSGFGGGVVYYPTSTSEGTFGAVAIISPGFTASWSSLDWLGPRIASHGFVVIETNTRL	132
MeCUT	SVSGFGGGVIIYYPTSTSEGTFGAIAISPGFTAYWSSISWLGPRILASHGFVVIETNSTL	132
MnCUT	SVSGFGGGVIIYYPTSTSEGTFGAIAISPGYTASWSSIDWLGPRILASHGFVVIETNSRF	132
Mca_βHidrolasa	-VSGFGGGVIIYYPTSTSQGTFGAVAIISPGYTAAWSSIDWLGPRIASHGFVVIETNSRL	110
MmLipasaT	-VSGFGGGVIIYYPTTTTAGTFGAVAIISPGYTASWSSLDWLGPRIASHGFVVIDTITRL	129
MaCUT	SVTGFGGGVIIYYPTDTSQGTFGAIAISPGYTAAWSSISWLGPRIASHGFVVIETNSRL	133
Mea_βHidrolasa	SVTGFGGGVIIYYPTTTSEGTFGAVAIISPGYTASWSSISWLGPRILASHGFVVIETNSRF	131
MaLipasaT	SVTGFGGGVIIYYPTSTAEGTFGAVAIISPGYTASWSSLSWLGPRILASHGFVVIETNTRL	129
McCUT	SVTGFGGGVIIYYPTSTSEGTFGAIAISPGYTAAWSSISWLGPRILASHGFVVIETNSRL	132
MefCUT	SVTGFGGGVIIYYPTSTAEGTFGAVAIISPGYTAAWSSIDWLGPRIASHGFVVIETNTRL	132
DmLipasaT	SVSDFGGATIIYYPTSTADGTFGGVAISPGYTGTAQASVAWLGPRLASHGFVVIVIDLTLRY	147
CcLipasa	AASGFGGGTIIYYPTSTAEGTFGAVAIISPGYTAQSSISWLGPRILASQGFVVITIDTNSRY	157
PmProtH	LVSGFGGGTIIYYPTDTSQGTFGAVAIAPGYTADQSSMSWYGPRLASQGFVVFTIDTNSRY	128
AaLipasa	LVSGFGGGTVYYPTSTAEGTYGALAIISPGFTATQSSISWMMGRRLASQGFVVITIDTNTIY	118
SsLipasa	AVSGFGGGTIIYYPTSTADGTFGAVAVSPGYTGTQSSIAWLGPRLASQGFVVFTIDTLTTL	101
Ssa_βHidrolasa	SASGFGGGTIIYYPTSTAEGTFGAVAIISPGFTGTQSSISWYGPRLASHGFVVITIDTNSTL	119
Asa_βHidrolasa	SVSGFGGGTIIYYPTSTAEGTFGAVAASPGFTASQSSVAWYGPRLASQGFVVITIDTLSTL	124
AmLipasaT	SVSGFGGGTVYYPTSTAEGTFGAVAIISPGFTATQSSVAWLGPRLASQGFVVITINTLSTL	117
AoCUT	SVSGFGGGTIIYYPTSTAEGTFGAVAIISPGFTASQSSVWLGPRVASQGFVVITIDTLSTL	120
RgUp	--NGHGGGTIIYYPTNA-GAKVGVIAIVPGYLSYQSSIEWWGPRLASHGFVAVTIDTLTIY	109
Ksa_βHidrolasa	SASGFGGGTIIHYPTNA-GENMGAIAVIVPGYVSYESSIEWWGPRLASWGFVVITIDTNTIY	137
KaDLH	-VSGFGGGTIIHYVGT-EGKMGIAVIVPGYVSYESSIRWWSRLASWGFVVITIDTNTIY	138
AxCUT	-VDGFGGGTIIYYPSNI-SQEMAAISIAPGFTNTQSAIAWWGPLLASHGFVVITIDTNSRF	134
OaLipasa	-VSGFGGGTLHYPTNT-TGTMGIAIVVPGFLLQESSIDFWGPKLASHGFVVITISANSF	134
AeDLH	-VRGFGGGTIIYYPVNA-EGTMAAIVVIVPGYMSYQSSISFWGPRILASHGFVVMTIDTNRIS	129
PsCUT	-VSGFGGGTIIHYPSNA-SGSMAAIVVIVPGYVSESSIQWVGPKLASYGFFVVMTIDTNSGF	136
MdCUT	-VSGFGGGTIIHYPTGT-TGTMAAIVVIVPGFASAESSIAWWGPKLASHGFVVMTIDTNSGF	75
PyLipasaT	-VSGFGGGTIIHYPTGV-NRPMAAIVVIVPGFVSAESSIDWVGPKLASYGFFVVMTIGTNSGF	129
	..*...: ** . : **: ::: : * :*: **.*. : :	

	S121E		W159H	
	↓		↓	
IsPETasa	DQPSSRSSQQAALRQVASLNGTSSSPIYKVDTARMGVMGWSMGGGGSLISAANNPSLK	177		
RgPETasa	DQPSSRSSQQAALRQVSLAGTSSSPIYKVDTARLGMGWSMGGGGSLISAKNNPSLR	175		
PbLipasaT	DQPAASRSAQQAALRQVVALSETRSSPIYKVDPNRLAVMGWSMGGGGTLISARDNPSLK	179		
RdProt	DQPAASRANQLIAALNYVANS---ASTTVRSRVDASRRVGGHSMGGGGSLIAAQNNSPK	173		
Aqsa_βHidrolasa	DQPSRATQLVAALNHVLS---SGTAVRSRIDPARLAVAGHSMGGGGSLIAARDNPTLK	168		

MsProt	DQPA	SRGRQLLAALDWLTQR-----SSVRGRIDATRLAVAGHS	MGGGGSLEAAVSRPSLQ	187
MeCUT	DQP	SRGRQLLAALDYLVR-----SSVTRIDGTRLAVAGHS	MGGGGSLEASVSRPSLQ	187
MnCUT	DQPA	SRGRQLLAALDYLVER-----SSVRSRVDGSRLAVAGHS	MGGGGSLEAAAERPQLQ	187
Mca_βHidrolasa	DQPA	SRGRQLLAALDYLVER-----SSVRSRVDGSRLAVAGHS	MGGGGSLEAAAERPQLQ	165
MmLipasaT	DQPSS	SRGRQLLAALDYLTER-----SSVRSRIDSSRLAVAGHS	MGGGGSLEAAAERPQLQ	184
MaCUT	DQP	SRGRQLLAALDYLVER-----SSVTRIDGTRLAVAGHS	MGGGGSLEAAAERPQLQ	188
Mea_βHidrolasa	DQP	SRGRQLLAALDYLTER-----SSVTRIDGTRLAVAGHS	MGGGGSLEAASSERPQLQ	186
MaLipasaT	DQP	SRGRQLLAALDYLTER-----SSVTRIDGTRLAVAGHS	MGGGGSLEAAAERPQLQ	184
McCUT	DQP	SRGRQLLAALDYLVER-----SSVTRIDGTRLAVAGHS	MGGGGSLEAAVARPSLQ	187
MefCUT	DQP	SRGRQLLAALDYLTER-----SSVTRIDGTRLAVAGHS	MGGGGSLEAAVARPSLQ	187
DmLipasaT	DYPSS	SRGDQLRAALRYLTTS-----SAVRTRVDATRLAVMGHS	MGGGGALEAAKDNPALK	202
CcLipasa	DQPSS	SRGDQLRAALAYLTGS-----SSVTRIDGTRLAVMGHS	MGGGGALEAAKDNPALQ	212
PmProth	DQPA	SRGDQLLAALDYLVR-----SSVDRIDGTRLAVMGHS	MGGGGSLEAADDRPGLQ	183
AaLipasa	DQPA	SRGDQLLAALDYLTTQ---SPSTVRSKIDPSRLAVAGHS	MGGGGSLEASVKRPSLQ	175
SsLipasa	DQP	SRGRQLLAALDYLTTTR-----SSVTRVDSTRLGVMGHS	MGGGGSLEAAKSRPSLQ	156
Ssa_βHidrolasa	DAP	SRATQLLAALDYLTER-----STVTRIDASRLGVMGHS	MGGGGSLEAAEQRPALQ	174
Asa_βHidrolasa	DSPA	SRGTQLLAALDYLTTTS-----SAVRTRIDATRLGVMGHS	MGGGGSLEAASRTRPALQ	179
AmLipasaT	DQP	SRGAQLLAALDYLTTTS-----SSVTRIDASRLGVMGHS	MGGGGSLEAATVSRPSLQ	172
AoCUT	DQP	SRGTQLLAALDYLVTNS-----SSVTRVDATRLGVMGHS	MGGGGSLEASRTRPTLQ	175
Ksa_βHidrolasa	DQP	SRADQLSAALDHLIDESGSSSPISGLVDASRLGVI	WSMGGGGTLKLATE-RNLK	196
KaDLH	DQP	SRANQLSAALDYVIAQNSNRNSSISGMVDSNRLGVI	WSMGGGSLKLSTQ-RTLK	197
AxCUT	DQP	SRSRQLDSALSYLISQSDSSSSISGLVDENRLATMG	FSMGGGSLQSASR-NRLS	193
OaLipasa	DQPA	SRATQLGRALDYVINQSNNSPISGMVDTTRLGVV	WSMGGGALQLASG-DRLS	193
AeDLH	DQP	SRRDQIEAALEYLVDQNSNRSPINGMVDPNRLGAV	WSMGGGTLRLAAD-DGIQ	188
PsCUT	DQP	SRARQINSALDYLVDQNSNRSPVRGBMIDTQRLGVI	WSMGGGTIRVAGE-GRIK	195
MdCUT	DQP	SRARQINNALDYLIDQNSNRSPINGMVDTSRLGAV	WSMGGGTLRVAAE-GRLK	134
PyLipasaT	DQP	SRARQINNALDYLVAQNTNSRSPVNGMIDTNRLGAM	WSMGGGTLRVAAE-GRIK	188

* * * * * : : : * * . . * * * * * : : :

D186H



IsPETasa	AAAPQAPWDS	SST-NFSSVTVPTLIFACENDSIAPVNSSALPIYDSMSR-NAKQFLEINGG	235
RgPETasa	AAAPQAPWAQ	-E-SFSSVTVPTLIVSCENDSIAPNSSHSFPFYNQMTR-NKKANLVINGG	232
PbLipasaT	AAVPFAPWHNTA	-NFSGVQVPTLVIACENDTVAPISRHASSFYNSFSSSLAKAYLEINNG	238
RdProt	AAILPLTPWNL	LST-NFSGVQVPTLIVGADGDAVAPVASHARPFYASLPSTVTRKAYGELNMA	232
Aqsa_βHidrolasa	ASYPMTPWNI	ISS-NFSTVRVPTMIIGADGDTVAPVGTTHARPFYASLPSTFKAYGELNGA	227
MsProt	AAVPIAPWNTD	K-TWGDVRVPTLIVGGESDSVAPVSSHAVPFYNSIPAASEKAYLELNNA	246

MeCUT	AAIPLAPWNTTK-SWSSVRVPTLIIGGEYD	TVAPVSSHSEPFYSSIPAASEKAYLELNGE	246
MnCUT	AAVPLAPWNLDK-TWSGLRVPTLIVGGETD	TIAPVSSHSEPFYNSIPASSEKAYLELNGA	246
Mca α _ β Hidrolasa	AAVPLAPWNLTK-NWSNLRVPTLIIGGESD	TVAPVSSHSEPFYNSIPASAEKAYLELNNA	224
MmLipasaT	AAVPLAPWNLTK-NWSNLRVPTLIIGGESD	SVASVATHSEPFYNSIPASAEKAYLELNNE	243
MaCUT	AAVPLAPWNLDK-TWNTLQVPTLIIGGEND	SVAPVATHSIPFYNSIPASAEKAYLELNGA	247
Mea α _ β Hidrolasa	AAVPLAPWNLDK-SWSELRVPTLIIGGESD	SVASVSSH SIPFYNSIPASAEKAYLELNGA	245
MaLipasaT	AAVPLAPWNLDK-TWSDVRVPTLIIGGESD	SVAPVASHSIPFYNSIPASSEKAYLELNGA	243
McCUT	AAVPLAPWNLDK-TWSDVRVPTLIIGGESD	SIAPVSSHSEPFYSSIPASSEKAYLELNGA	246
MefCUT	AAVPLAPWNLDK-TWSDVRVPTLIIGGESD	SIAPVSSHSEPFYNSIPASSEKAYLELNGA	246
DmLipasaT	AAIPLTPWNTDK-SWPELTPPTLIIFGAQND	SVAPVSSHAI PFYTSLASTLPKAYLELRGA	261
CcLipasa	AAIPMTPWNTDK-TWPEVQTPPTLIIGAQND	SVASVTTHAEPFYENLPGLDKAYLELRGA	271
PmProtH	AAIPLTGWNLRK-NFSSVRVPTLVVGAEND	SVAPVSSHSEPFYASLPSTLTKAYLELDNA	242
AaLipasa	AAIPLAPWNTDK-TWNTDQVPTFIIGGESD	SVAPVSSHAE PFYTSLSAPDKAYLELNNA	234
SsLipasa	AAIPLTPWNLDK-SWPEVTPPTLIVGADGD	SIAPVSSHAE PFYGLRSSLDKAYLELNGA	215
Ssa α _ β Hidrolasa	AAIPLTPWHTDK-TWPGVQTPPTLIVIGAEND	STAPVSSHSEPFYTSMPSTMDKAYLELNGA	233
Asa α _ β Hidrolasa	AAIPLAPYHTTK-NWSTDTVPTLIIGAEND	SVAPVSSHAE PFYTSLPASSDKAYLELNNA	238
AmLipasaT	AAIPLAPWHTTK-NWSSTRVPTMIIGAESD	STAPVSSHSEPFYTSMTSAPDKAYLELNNA	231
AoCUT	AAIPMTPWHGDK-SWTTDRVPTMIIGAEND	TVAPVSSHAE PFYTSLTAAPDKAYLELNNA	234
Ksa α _ β Hidrolasa	AIIPQAPWYSGFNDFRITTPPTMI IACESD	AIAPVQGHASPFYNDIPNSTAKAFLEINGG	256
KaDLH	AAIPQAPWYSGFNDFNRITTPPTLI IACELD	VVAPVQGHASPFYNRIPSSAKAFLEINGG	257
AxCUT	AAVPLAPWNSGSNSFNQIAVPTMIMACEND	STANVSSHASPFYNTIPTSTDKAFMEISGG	253
OaLipasa	AAIPIAPWNSGGNRFQIETPTLVIACEND	VVASVNSHASPFYNRIPSTTDKAYLEINGG	253
AeDLH	AAIGLAPWNTSSLGFRSIEPTLIFACERDS	SIAPVRSHASPFYNAIPSSDKAYFEISGG	248
PsCUT	AAIPLAPWDTSNFPSRQVAAPTLLIFACESD	TVARVGHASPFYNSISGSIDKAFVELDNG	255
MdCUT	AAIPLAPWDSSSTQFRSITAPTLIFACEND	AIAPVRSHADPFYNAIPSSDKAFFELNGG	194
PyLipasaT	AAIPLAPWDTT--SFRSNRTPPTLIFACGSD	SIAPVRTHASPFYNQIPTSTPKIFIEINRG	246

* : : .**::.. * * : :* : :

	S238F		R280A		
IsPETasa	SHSCANS	SGNS---	NQALIGKKGVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTRVSDF----	RTAN	
RgPETasa	SHSCANS	SGNS---	DAGLIGKYGVAWMKRFMDDDTRYSKFLCGAEHQAL	LSKRAVEAYKEN	
PbLipasaT	SH	T	CANTGNS---	NQALIGKYGVAWIKRFVDNDTRYSPFLCGAPHQA	LRSSRLSEYRES
RdProt	SH	STPTSGV-----	NTPIGRYGVTWKRFVDGDTRYSTFLCGAEHQAY	ATATVFD RYSQN	
Aqsa α _ β Hidrolasa	TH	F	APNT-T-----	STPIGRYAVAWMKRFVDGDTRYSPFLCGAQHTSY	ATGLVFD RYNQN
MsProt	SH	F	FPQT-T-----	NTPLAQMQVSWLKRFDNDTRYDQFLCPGPGSV-----	AIQEYRNT

MeCUT	SHFFPQS-A-----DALVGKQMVSWLKRFDNDTRYEPFLCPGPSGL-----DVEEYRNT	295
MnCUT	GHFFPQS-V-----NTPTAKQMVSWLKRFDNDTRYEQFLCPGPTGL-----AIEEYRDT	295
Mca β Hidrolasa	SHFFPQS-V-----NTPTAKQMVSWLKRFDNDTRYEQFLCPGPSGL-----AIEEYRNT	273
MmLipasaT	GHFFPNT-V-----NTPTAKQMVAVLKRFDNDTRYDQFLCPGPSGL-----AVEEYRNT	292
MaCUT	SHFFPQT-V-----NTPTARQAVAWLKRFDNDTRYEQFLCPGPSGS-----AIEEYRNT	296
Mea β Hidrolasa	SHFFPQT-T-----NTPTARQMVAWLKRFDNDTRYEQFLCPGPTGS-----AIEEYRNT	294
MaLipasaT	SHFFPQT-V-----NTPTAKQTVAWLKRFDNDTRYEQFLCPGPTGS-----AIEEYRNT	292
McCUT	SHFFPQT-V-----NTPTAKQMVAVLKRFDNDTRYEQFLCPGPSGF-----EIQEYRNT	295
MefCUT	SHFFPQT-V-----NTPTARQAVAWLKRFDNDTRYEQFLCPGPSGS-----AVQEYRNT	295
DmLipasaT	SHGAPTS-T-----NTTIAKYAVAWLKRFDADRRYDPFLCPTPAVS-----TLLSDARST	311
CcLipasa	SHFAPNT-S-----NTTIARQSIAWLKRFDNDTRYAQLCPPPSGT-----AISEYRST	320
PmProtH	SHFAPNV-S-----NTTIAKYSISWLKLFIDNDTRYAQLCPAPDDR-----EISEYRET	291
AaLipasa	SHFFPNT-P-----NTTQAKYMI SWLKRFDNDTRYEQFLCPGPSKS-----TLVEEFRST	284
SsLipasa	SHFTPNS-S-----NTTIAKYSISVSWLKRFDNDTRYEQFLCPLPSPS-----LTIEEYRGN	265
Ssa β Hidrolasa	SHSAPSS-S-----NTTIAKYSISAWLKRFDNDTRYEQFLCPAPARG-----TLIEEYRDT	283
Asa β Hidrolasa	SHSAPTS-T-----NVTIAKYSISWLKRFDNDTRYEQFLCPAPSGS-----TIQEYRDT	287
AmLipasaT	GHSAPTS-A-----NTTVAKYSISWLKRFDNDTRYDQFLCPAPSPS-----SLIEEYRAT	281
AoCUT	SHSAPTS-A-----NTTVAQYSISWLKRFDNDTRYDQFLCPAPSPS-----TLIQEYRDT	284
Ksa β Hidrolasa	SHYCANSYGYS---DEDILGKYGISWWMKRFMDNDTRYEQFLCGPNHES---DRSISEYRDT	310
KaDLH	DHFCANSGYF---NEDILGKYGVSWMKRFIDGDRYDQFLCGPNHES---DRSISDYRET	311
AxCUT	QHNCANGSNS---NNALLATYGVSWMKRFLDKDHRYNQFLCGPNHES---NSRISEFRDT	307
OaLipasa	SHFCANDGGS---IGLLGKYGVSWMKRFIDNDLRYDAFLCGPDHAA---NRSVSEYRDT	307
AeDLH	NHYCANGSNR---YDALLGKYGVAWMKLHLDQDQRYAPFLCGPNHER---DRQISEHRST	302
PsCUT	NHYCANGGNDRGRYDAVLGRMGVSWMKRFLDEDTRYEQFLCGPNHTS---DRQISEYRGN	312
MdCUT	SHYCANGGNS---YNDEL SRLGVSWMKLHLDKQRYNQFLCGPNHES---DWNISEYRGT	248
PyLipasaT	NHYCANGGNS---NNATLGR LGVAVWMKRFLDEDRRYSQFLCGPRHTS---DRNISESRDT	300

* . :*: * . * * * * * *

IsPETasa	CS---	290
RgDLH	CPY--	292
PbLipasaT	CPY--	298
RdProt	CPY--	290
Aqsa β Hidrolasa	CPY--	284
MsProt	CPHA-	299
MeCUT	CPSS-	299
MnCUT	CPHS-	299
Mca β Hidrolasa	CPH--	276

MmLipasaT	CPH--	295
MaCUT	CPSA-	300
Me α _ β Hidrolasa	CPSS-	298
MaLipasaT	CPSS-	296
McCUT	CPSY-	299
MefCUT	CPSA-	299
DmLipasaT	CPFN-	315
CcLipasa	CPY--	323
PmProth	CPYSP	296
AaLipasa	CPNG-	288
SsLipasa	CPHTS	270
Ss α _ β Hidrolasa	CPHTA	288
As α _ β Hidrolasa	CPHS-	291
AmLipasaT	CPHS-	285
AoCUT	CPHS-	288
RgUp	CS---	279
Ks α _ β Hidrolasa	CNY--	313
KaDLH	CNY--	314
AxCUT	CDFT-	311
OaLipasa	CNY--	310
AeDLH	CPF--	305
PsCUT	CPY--	315
MdCUT	CPY--	251
PyLipasaT	CNF--	303

*

* (.) = Existe una conservación débil (<50%); (:)= Conservación fuerte (>50%); (*) = Existe una conservación exacta.

Los aminoácidos correspondientes a la triada catalítica se encuentran resaltados de color blanco con un fondo violeta. Mientras que las variantes mutantes de IsPETasa se encuentran coloreadas de la siguiente manera: fenilalanina (marrón), histidina (naranja), asparagina (cian), tirosina (amarillo), treonina (celeste), leucina (fucsia), serina (turquesa), triptófano (lila), alanina (rosado), ácido aspártico (verde), prolina (azul), glicina (gris), histidina (naranja), cisteína (rojo), glutamina (oliva).

Fuente: (UniProt, 2021)

Anexo 2. Alineamiento múltiple de secuencias de enzimas que comparten similitud estructural con IsPETasa

IsPETasa	-----MN----FPRASRLMQAAVLGGLMA-----VSAAATAQTNPYARGPNPTA	40
RgPETasa_K169A	-----TNPYQRGPDPTV	12
RgPETasa_E186A	-----TNPYQRGPDPTV	12
RgPETasa	-----TNPYQRGPDPTV	12
BbHidrolasa	-----MNPFEKGPDPK	12
SvCUT190_8M	-----GPNPYERGPDPTE	13
SvCUT190_7M	-----GPNPYERGPDPTE	13
SvCUT190_S226P	-----MRGS---HHH-----HHHGSNPYERGPDPTE	23
SvCUT190_S176A_S226P_R228S	-----GPQDNPYERGPDPTE	15
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_Zn(2+)	-----GPQDNPYERGPDPTE	15
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_MA	-----GPQDNPYERGPDPTE	15
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_E1R	-----GPQDNPYERGPDPTE	15
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_SM	-----GPQDNPYERGPDPTE	15
SvCUT190_S226P_R228S	-----GPQDNPYERGPDPTE	15
TaCUT	-----MRGS---HHHHHGSAPAQAANPYERGNPTE	29
TaCUT_EST119	HHHHHMSVTTPRRETSLLSRALRATAAAATA---VVATVALAAPAQAANPYERGNPTE	57
TaCUT_EST119_AHK119	HHHHHMSVTTPRRETSLLSRALRATAAAATA---VVATVALAAPAQAANPYERGNPTE	57
TcCUT2	-----MANPYERGNPTD	13
TcCUT2_doble	-----MANPYERGNPTD	13
TcCUT2_triple	-----MANPYERGNPTD	13
TfHidrolasa_TerEst	-----MKYLLPTAAAGLLLLA-----AQ---PAMAMDIGINSDPANPYERGNPTD	43
TfCUT	-----ANPYERGNPTD	12
TcCUT1	-----MANPYERGNPTD	13
SeLipasa	-----AANPYERGPAPT	13
PmLipasa	-----APLPDTP-----GAPFPV	14
α β Hidrolasa	-----ANPYERGPDPTE	12
Poliester_Hidrolasa	-----MANPYERGPDPTE	13
PaHidrolasa_Y250S	-----MP----FNKKSVLALCGAGALLFMSALANNPAPTDPGDSGGGSAYQRGPDPSV	50
PaPoliester_Hidrolasa	-----MP----FNKKSVLALCGAGALLFMSALANNPAPTDPGDSGGGSAYQRGPDPSV	50
UbLipasaPET2_F105R_E110K	-----ANPPGGDPDPCQTDNYQRGPDPTD	26
UbLipasaPET2_7M	-----ANPPGGDPDPCQTDNYQCGPDPTD	26

. * * :

IsPETasa	ASLEASAGPFTVRSFTVS--RPSGYGAGTVYYPTNAG-GTVGAIIVPGY--TARQSSIK	95
RgPETasa_K169A	SSLEATRGPFFSTSSFTVS--RPSGYGAGTVYYPTNAG-GKVGAIIVPGY--TARQSSIN	67
RgPETasa_E186A	SSLEATRGPFFSTSSFTVS--RPSGYGAGTVYYPTNAG-GKVGAIIVPGY--TARQSSIN	67
RgPETasa	SSLEATRGPFFSTSSFTVS--RPSGYGAGTVYYPTNAG-GKVGAIIVPGY--TARQSSIN	67
BbHidrolasa	TMLEASTGPFTYTTTTVSSTTASGYRQGTIYHPTNVT-GPFAAVAVPGY--LASQSSIN	69
SvCUT190_8M	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	70
SvCUT190_7M	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	70
SvCUT190_S226P	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	80
SvCUT190_S176A_S226P_R228S	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	72
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_Zn(2+)	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	72
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_MA	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	72
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_E1R	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	72
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_SM	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	72
SvCUT190_S226P_R228S	DSIEAIRGPFFSVATERVSS-FASGFGGGTIYYPRETDEGTFGAVAVAPGF--TASQGSMS	72
TaCUT	SMLEARSGPFFSVSEERASRFADGFGGGTIYYPREN--NTYGAIIVSPGY--TGTQSSIA	85
TaCUT_EST119	SMLEARSGPFFSVSEERASRFADGFGGGTIYYPREN--NTYGAIIVSPGY--TGTQSSIA	113
TaCUT_EST119_AHK119	SMLEARSGPFFSVSEERASRFADGFGGGTIYYPREN--NTYGAIIVSPGY--TGTQSSIA	113
TcCUT2	ALLEARSGPFFSVSEERASRFADGFGGGTIYYPREN--NTYGAVIIVSPGY--TGTQASVA	69
TcCUT2_doble	ALLEARSGPFFSVSEENVSRFGADGFGGGTIYYPREN--NTYGAVIIVSPGY--TGTQASVA	69
TcCUT2_triple	ALLEASSGPFFSVSEENVSRFGADGFGGGTIYYPREN--NTYGAVIIVSPGY--TGTQASVA	69
TfHidrolasa_TerEst	ALLEARSGPFFSVSEENVSRLSASGFGGGTIYYPREN--NTYGAVIIVSPGY--TGTEASIA	99
TfCUT	ALLEASSGPFFSVSEENVSRLSASGFGGGTIYYPREN--NTYGAVIIVSPGY--TGTEASIA	68
TcCUT1	ALLEASSGPFFSVSEENVSRLSASGFGGGTIYYPREN--NTYGAVIIVSPGY--TGTEASIA	69
SeLipasa	ASIEASRGPYATSQTSVSSLVASGFGGGTIYYPTSTADGTFGAVVISPFGF--TAYQSSIA	71
α _ β Hidrolasa	SSIEAVRGPFAVAQTTVSRLQADGFGGGTIYYPTDTSQGTFGAVIIVSPGF--TAGQESIA	70
PmLipasa	AN-FDRSGPYTVSSQSEG-----PSCRIYRPRDLGQGGVRHPVILWNGTGTGAGPSTYA	66
Poliester_Hidrolasa	SSIEAVRGPFAVAQTTVSRLQADGFGGGTIYYPTDTSQGTFGAVIIVSPGF--TAGQESIA	71
PaHidrolasa_Y250S	SFLEADRGQYSVRSSRVSS-LVSGFGGGTIYYPTGTT-GTMGAVVIVIPGF--VSAESSID	106
PaPoliester_Hidrolasa	SFLEADRGQYSVRSSRVSS-LVSGFGGGTIYYPTGTT-GTMGAVVIVIPGF--VSAESSID	106
UbLipasaPET2_F105R_E110K	AYLEAASGPYTVSTIRVSS-LVPGFGGGTIHYPTNAGGKMGIVVIVIPGY--LSRESSIK	83
UbLipasaPET2_7M	AYLEAASGPYTVSTIRVSS-LVPGFGGGTIHYPTNACGGKMGIVVIVIPGY--LSRESSIK	83

* :: . :: * . : *

S121E



IsPETasa	WWGPR LASHGFVVITIDTNSTLDQPSSRSSQQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVDTARMG	155
RgPETasa_K169A	WWGPR LASHGFVVITIDTNSTLDQPSSRSSQQMAALRQVVS LAGTSSSPIYNKVDTARLG	127
RgPETasa_E186A	WWGPR LASHGFVVITIDTNSTLDQPSSRSSQQMAALRQVVS LAGTSSSPIYNKVDTARLG	127
RgPETasa	WWGPR LASHGFVVITIDTNSTLDQPSSRSSQQMAALRQVVS LAGTSSSPIYNKVDTARLG	127
BbHidrolasa	WWGPR LASHGFVVITIDTNSTSDQPE SRATQLMAALNQLKTF SNTSSHPIYRKVDPNRLG	129
SvCUT190_8M	WYGERVASHGFIVFTIDTNR L DAPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	127
SvCUT190_7M	WYGERVASHGFIVFTIDTNR L DAPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	127
SvCUT190_S226P	WYGERVASQGFIVFTIDTNR L DQPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	137
SvCUT190_S176A_S226P_R228S	WYGERVASQGFIVFTIDTNR L DQPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	129
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_Zn(2+)	WYGERVASQGFIVFTIDTNR L DQPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	129
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_MA	WYGERVASQGFIVFTIDTNR L DQPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	129
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_E1R	WYGERVASQGFIVFTIDTNR L DQPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	129
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_SM	WYGERVASQGFIVFTIDTNR L DQPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	129
SvCUT190_S226P_R228S	WYGERVASQGFIVFTIDTNR L DQPGQRGRQLLAALDY LVER---SDRKVRERLDPNRLA	129
TaCUT	WLGERIASHGFVVIAIDTNT TLDQPE SRARQLNAALDYMLTD---ASSAVRNRIDASRLA	142
TaCUT_EST119	WLGERIASHGFVVIAIDTNT TLDQPE SRARQLNAALDYMLTD---ASSAVRNRIDASRLA	170
TaCUT_EST119_AHK119	WLGERIASHGFVVIAIDTNT TLDQPE SRARQLNAALDYMLTD---ASSAVRNRIDASRLA	170
TcCUT2	WLGERIASHGFVVITIDTNT TLDQPE SRARQLNAALDYMIND---ASSAVRSRIDSSRLA	126
TcCUT2_doble	WLGERIASHGFVVITIDTNT TLDQPE SRARQLNAALDYMIND---ASSAVRSRIDSSRLA	126
TcCUT2_triple	WLGERIASHGFVVITIDTNT TLDQPE SRARQLNAALDYMIND---ASSAVRSRIDSSRLA	126
TfHidrolasa_TerEst	WLGERIASHGFVVITIDTIT TLDQPE SRAEQLNAALNHMINR---ASSTVRSRIDSSRLA	156
TfCUT	WLGERIASHGFVVITIDTIT TLDQPE SRAEQLNAALNHMINR---ASSTVRSRIDSSRLA	125
TcCUT1	WLGERIASHGFVVITIDTIT TLDQPE SRAEQLNAALNHMINR---ASSTVRSRIDSSRLA	126
SeLipasa	WLGPR LASHGFVVFTIDTNT TLDQPE SRGRQLLSALDYLTQR---S--SVRTRVDATRLG	126
α_βHidrolasa	WLGPR IASQGFVVITIDTIT RLDQPE SRGRQLQAALDHLRTN---S--VVRNRIDPNRMA	125
PmLipasa	GLLSHWASHGFVVAAAETS N-----AGTGREMLACLDYLVRENDTPYGTYSGKLNTGRVG	121
Poliester_Hidrolasa	WLGPR IASQGFVVITIDTIT RLDQPE SRGRQLQAALDHLRTN---S--VVRNRIDPNRMA	126
PaHidrolasa_Y250S	WWGPK LASYGFVVM TIDTNTGFDQPE SRARQINNALDYLV SQNSRSSSPV RGMIDTNRLG	166
PaPoliester_Hidrolasa	WWGPK LASYGFVVM TIDTNTGFDQPE SRARQINNALDYLV SQNSRSSSPV RGMIDTNRLG	166
UbLipasaPET2_F105R_E110K	WWGPR LASHGFVVMTIDTNT IYDQPSQR RDQIEAALQYL VNQSNSSSSPISGMVDSSRLA	143
UbLipasaPET2_7M	WWGPR LASHGFVVMTIDTNT IYDQPSQR RDQIEAALQYL VNQSNSSPSPISGMVDSSRLA	143
	: ** **:* : :* . : .* : :: *..	

	W159H	D186H	
IsPETasa	↓	↓	VMGWSMGGGGSLISAANNPSLKAAAPQAPWDSSTN-----FSSVTVPTLIIFACENDSIAP 210
RgPETasa_K169A			VMGWSMGGGGSLISAANNPSLRAAAPQAPWAQ-ES-----FSSVTVPTLIVSCENDSIAP 181
RgPETasa_E186A			VMGWSMGGGGSLISAKNNPSLRAAAPQAPWAQ-AS-----FSSVTVPTLIVSCENDSIAP 181
RgPETasa			VMGWSMGGGGSLISAKNNPSLRAAAPQAPWAQ-ES-----FSSVTVPTLIVSCENDSIAP 181
BbHidrolasa			VMGWSMGGGGTLIAARDNPTLKAAIPFAPWNSSTN-----FSTVSVPTLIIACESDSTAP 184
SvCUT190_8M			VMGHAMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 182
SvCUT190_7M			VMGHSMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 182
SvCUT190_S226P			VMGHSMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 192
SvCUT190_S176A_S226P_R228S			VMGHAMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 184
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_Zn(2+)			VMGHAMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 184
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_MA			VMGHAMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 184
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_E1R			VMGHAMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 184
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_SM			VMGHAMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 184
SvCUT190_S226P_R228S			VMGHSMGGGGSLEATVMRPSLKASIP LTPWHLDKT-----WGQVQVPTFII GAELDTIAP 184
PmLipasa			TSGHSQGGGGSIMAGQD-TRVRTTAPIQPYTLGLGHDSASQRRQGGPMFLMSGGGDTIAP 180
TaCUT			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKS-----WRDITVPTLII GAEYDTIAS 197
TaCUT_EST119			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKS-----WRDITVPTLII GAEYDTIAS 225
TaCUT_EST119_AHK119			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKS-----WRDITVPTLII GAEYDTIAS 225
TcCUT2			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKN-----WSSVRVPTLII GADLDTIAP 181
TcCUT2_doble			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKN-----WSSVRVPTLII GADLDTIAP 181
TcCUT2_triple			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKN-----WSSVRVPTLII GADLDTIAP 181
TfHidrolasa_TerEst			VMGHSMGGGGSRLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKN-----WSSVTVPTLII GADLDTIAP 211
TfCUT			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKN-----WSSVTVPTLII GADLDTIAP 180
TcCUT1			VMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIP LTPWHLNKN-----WSSVTVPTLII GADLDTIAP 181
SeLipasa			VMGHSMGGGGSLEAAKSR TSLKAAIP LTPGWN TDKT-----WPELRTPTLVVGADGDTVAP 181
α_βHidrolasa			VMGHSMGGGGALSAAANNTSLEAAIP LQGWHTRKN-----WSSVRTPTLVVGAQLDTIAP 180
Poliester_Hidrolasa			VMGHSMGGGGALSAAANNTSLEAAIP LQGWHTRKN-----WSSVRTPTLVVGAQLDTIAP 181
PaHidrolasa_Y250S			VIGWSMGGGGTLRVASE-GRIKAAIPLAPWDTTSY----YASRSQAPT LIFACESDVIAP 221
PaPoliester_Hidrolasa			VIGWSMGGGGTLRVASE-GRIKAAIPLAPWDTTSY----YASRSQAPT LIFACESDVIAP 221
UbLipasaPET2_F105R_E110K			AVGWSMGGGGTLQLAAD-GGIKAAIALAPWNS SIN----DFNRIQVPT LIFACQLDAIAP 198
UbLipasaPET2_7M			AVGWSMGGGATLQLAAD-GGIKAAIALAPWNS SIN----DFNRIQVPT LIFACQLDAIAP 198
	.	*	* : *** : : : : : : : : : : * : : : * *

	S238F	
IsPETasa	VNSSALPIYDSMSR-NAKQFLEINGGSH	SCANSNGNSQALIGKKGVAMKRFMDNDTRYST 269
RgPETasa_K169A	NSSHSFPFYNQMTR-NKKANLVINGGSH	SCANSNGNSDAGLIGKYGVAMKRFMDDDTRYST 240
RgPETasa_E186A	NSSHSFPFYNQMTR-NKKANLVINGGSH	SCANSNGNSDAGLIGKYGVAMKRFMDDDTRYST 240
RgPETasa	NSSHSFPFYNQMTR-NKKANLVINGGSH	SCANSNGNSDAGLIGKYGVAMKRFMDDDTRYST 240
BbHidrolasa	VNSHASPFYNSLPSTTKKAYLEMNNGSH	SCANSNGNSNAGLIGKYGVSWMKRFMDNDTRFST 244
SvCUT190_8M	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELCGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 239
SvCUT190_7M	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELCGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 239
SvCUT190_S226P	VRTHAKPFYESLPSSLPKAYMELDGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 249
SvCUT190_S176A_S226P_R228S	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELDGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 241
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_Zn(2+)	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELDGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 241
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_MA	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELDGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 241
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_E1R	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELDGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 241
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_SM	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELDGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 241
SvCUT190_S226P_R228S	VSTHAKPFYESLPSSLPKAYMELDGATH	FAPN---IPNTTIAKYVISWLKRFVDEDTRYST 241
PmLipasa	PYLNQPVYRRANVP--VFWGERRYVSH	EPVGS---GGAYRGPSTAWFRFQLMDDQDAR 235
TaCUT	VTLHSKPFYNSIPSPTDKAYLELDGASH	FAPN---ITNKTIGMYSVAWLKRFVDEDTRYT 254
TaCUT_EST119	VTLHSKPFYNSIPSPTDKAYLELDGASH	FAPN---ITNKTIGMYSVAWLKRFVDEDTRYT 282
TaCUT_EST119_AHK119	VTLHSKPFYNSIPSPTDKAYLELDGASH	FAPN---ITNKTIGMYSVAWLKRFVDEDTRYT 282
TcCUT2	VLTHARPFYNSLPTSISKAYLELDGATH	FAPN---IPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYT 238
TcCUT2_doble	VLTHARPFYNSLPTSISKAYLELDGATH	FAPN---IPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYT 238
TcCUT2_triple	VLTHARPFYNSLPTSISKAYLELDGATH	FAPN---IPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYT 238
TfHidrolasa_TerEst	VATHAKPFYNSLPSSISKAYLELDGATH	FAPN---IPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYT 268
TfCUT	VATHAKPFYNSLPSSISKAYLELDGATH	FAPN---IPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYT 237
TcCUT1	VATHAKPFYNSLPSSISKAYLELDGATH	FAPN---IPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYT 238
SeLipasa	VATHSKPFYESLPGSLDKAYLELRGASH	FTPN---TSDTTIAKYSISWLKRFIDSDTRYE 238
α_βHidrolasa	VSSHSEAFYNSLPDDLKAYMELRGASH	IVSN---TPDTTTAKYSIAWLKRFVDDDLRYE 237
Poliester_Hidrolasa	VSSHSEAFYNSLPDDLKAYMELRGASH	IVSN---TPDTTTAKYSIAWLKRFVDDDLRYE 238
PaHidrolasa_Y250S	VLQHASPFIYNSLPSSIDKAFVEINGGSH	SCGNGGSIYNDVLSRFGVSWMKLHLDEDSRYK 281
PaPoliester_Hidrolasa	VLQHASPFIYNSLPSSIDKAFVEINGGSH	YCGNGGSIYNDVLSRFGVSWMKLHLDEDSRYK 281
UbLipasaPET2_F105R_E110K	VALHASPFYNRIPNTTPKAFFEMTGGD	HWCANGGNIYSALLGKYGVSWMKLHLDQDTRYA 258
UbLipasaPET2_7M	VALHASPFYNRIPNTTPKAFFEMTGGD	HWCANGGNIYSALLGKYGVSWMKLHLDQDTRYA 258

: . * * * * : * : . *

	R280A	
IsPETasa	↓	TFACENPNSTRVSDF----RTANCS----- 290
RgPETasa_K169A	A	KFLCGAEHQADLSKRAVEAYKENCPLYE----- 268
RgPETasa_E186A	A	KFLCGAEHQADLSKRAVEAYKENCPLYE----- 268
RgPETasa	A	KFLCGAEHQADLSKRAVEAYKENCPLYE----- 268
BbHidrolasa	A	PYLCGAPHQADLSLTAIDEYRENCPY----- 270
SvCUT190_8M	A	QFLCPNPT-DR----AICEYRSTCPYKLN----- 263
SvCUT190_7M	A	QFLCPNPT-DR----AICEYRSTCPYKLN----- 263
SvCUT190_S226P	A	QFLCPNPT-DR----AIEEYRSTCPYKLN----- 273
SvCUT190_S176A_S226P_R228S	A	QFLCPNPT-DR----AIEEYRSTCPYKLN----- 265
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_Zn(2+)	A	QFLCPNPT-DR----AIEEYRSTCPYKLN----- 265
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_MA	A	QFLCPNPT-DR----AIEEYRSTCPYKLN----- 265
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_E1R	A	QFLCPNPT-DR----AIEEYRSTCPY----- 262
SvCUT190_S176A_S226P_R228S_SM	A	QFLCPNPT-DR----AIEEYRSTCPYKLN----- 265
SvCUT190_S226P_R228S	A	QFLCPNPT-DR----AIEEYRSTCPY----- 262
PmLipasa	S	ATFYGAQCSLSTSLLSVVERRGL----- 258
TaCUT	S	QFLCPGPRTGILL--SDVEEYRSTCPF----- 278
TaCUT_EST119	S	QFLCPGPRTGILL--SDVEEYRSTCPF----- 306
TaCUT_EST119_AHK119	S	QFLCPGPRTGILL--SDVEEYRSTCPF----- 306
TcCUT2	S	QFLCPGPRDGLF--GEVEEYRSTCPFAL----- 265
TcCUT2_doble	S	QFLCPGPRDGLF--GEVEEYRSTCPFAL----- 265
TcCUT2_triple	S	QFLCPGPRDGLF--GEVEEYRSTCPFAL----- 265
TfHidrolasa_TerEst	S	QFLCPGPRDGLF--GEVEEYRSTCPFYPNSSVVDKLAALAEHHHHHH 313
TfCUT	S	QFLCPGPRDGLF--GEVEEYRSTCPF----- 261
TcCUT1	S	QFLCPGPRDGLF--GEVEEYRSTCPFAL----- 265
SeLipasa	S	QFLCPIPRPSL----TIAEYRGTCPHTS----- 262
α_βHidrolasa	S	QFLCPAPD-DF----AISEYRSTCPF----- 258
Poliester_Hidrolasa	S	QFLCPAPD-DF----AISEYRSTCPFLEHHH-----HHH 267
PaHidrolasa_Y250S	S	QFLCGPNHTSD---SQISDYRGNCPLYEHHHH-----HH----- 312
PaPoliester_Hidrolasa	S	QFLCGPNHTSD---SQISDYRGNCPLYEHHHH-----HH----- 312
UbLipasaPET2_F105R_E110K	S	PFLCGPNHAAQ---TLISEYRGNCPLYENLYFQ-----GHHHHHH 294
UbLipasaPET2_7M	S	PFLCGPNHAAQ---PLISEYRGNCPLYENLYFQ-----GHHHHHH 294

* (.) = Existe una conservación débil (<50%); (:) = Conservación fuerte (>50%); (*) = Existe una conservación exacta.

Los aminoácidos correspondientes a la triada catalítica se encuentran resaltados de color blanco con un fondo violeta. Mientras que las variantes mutantes de IsPETasa se encuentran coloreadas de la siguiente manera: fenilalanina (marrón), histidina (naranja), asparagina (cian), tirosina (amarillo), treonina (celeste), leucina (fucsia), serina (turquesa), triptófano (lila), alanina (rosado), ácido aspártico (verde), prolina (azul), glicina (gris), histidina (naranja), cisteína (rojo), glutamina (oliva).

Fuente: (PDBeFold, 2022)