
ESTUDIO RACIONAL DEL MECANISMO DE UNIÓN Y CATALÍTICO DE
ALCOHOL VERATRÍLICO EN LIGNINO PEROXIDASA H8 DE *Phanerochaete*
chrysosporium: UNA ESTRATEGIA *IN-SILICO*/EXPERIMENTAL

JEFFERSON ONEIVER ROMERO MARULANDA
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE
PRODUCTOS BIOACTIVOS

RESUMEN

La enzima lignino peroxidasa (LiP) y el alcohol veratrílico (AV) desempeñan un papel clave en el proceso de degradación de la lignina llevado a cabo por hongos de la podredumbre blanca. Su aplicación tiene un potencial uso en procesos industriales y biotecnológicos, sin embargo, su uso a gran escala y a nivel industrial requiere de la optimización de la catálisis y estabilidad de esta enzima. Esta problemática requiere ser estudiada y solucionada empleando ingeniería de proteínas, la cual adapta e implementa metodologías experimentales y computacionales para el diseño racional de enzimas con afinidad específica por un sustrato. Considerando la problemática anteriormente descrita, en **esta tesis se planteó como objetivo general**: caracterizar y racionalizar el rol de los aminoácidos cercanos al residuo Trp171 en el ciclo catalítico de LiPH8 mediante análisis de mutagénesis sitio dirigida y técnicas de modelado y simulación computacional. Para llevar a cabo el objetivo general, e implementar una solución factible, fue propuesta una estrategia multidisciplinaria, que involucró la sinergia entre las áreas de bioinformática, química y biotecnología. **La metodología de investigación implementada consistió en**: (1) estudiar las interacciones intermoleculares entre AV y LiPH8 por medio de herramientas de modelado y simulación computacional, (2) generar y caracterizar las mutantes de LiPH8 y evaluar sus parámetros cinéticos, y (3) finalmente, estudiar en detalle la función de cada uno de los residuos del microambiente ácido alrededor del residuo Trp171 en la catálisis de LiPH8. **Como resultados finales de esta tesis** se obtuvieron 19 enzimas mutantes de LiPH8; entre las cuales las mutantes simples E168Q y E250Q permitieron identificar como residuos cruciales para la unión de AV y la catálisis enzimática a E168 y E250, respectivamente. Estos resultados experimentales se racionalizaron a través del cálculo de las energías de interacción enzima-sustrato (a un nivel mecánico cuántico semiempírico) y la deslocalización de la densidad de espín obtenida a través de cálculos QM/MM.

Palabras claves: Lignino peroxidasa, alcohol veratrílico, densidad de espín, ingeniería de proteínas, mutagénesis sitio dirigida, modelado y simulación computacional.

ABSTRACT

The lignin peroxidase (LiP) enzyme and its substrate veratryl alcohol (VA) play a key role in the degradation process of lignin that is carried out by white rot fungi. This enzymatic system has a potential application in industrial and biotechnological processes. However, its use on a large scale and at an industrial level requires the optimization of the catalysis and stability of LiP enzyme. This problem could be studied and solved using protein engineering, which adapts and implements experimental and computational methodologies to rationally design enzymes with specific affinity for a substrate. Considering the abovementioned issue, **this doctoral thesis aims to** characterize and rationalize the role of the amino acids close to Trp171 in the catalytic cycle of LiPH8 using site-directed mutagenesis analysis, computational modeling and simulations. In order to carry out the main goal and to find out a potential solution, a multidisciplinary strategy was proposed, which involved the synergy between the areas of bioinformatics, chemistry and biotechnology. **The implemented research methodology consisted in:** (1) To study the intermolecular interactions between VA and LiPH8 by means of computational modeling and simulation tools, (2) To generate and characterize the LiPH8 mutants and to evaluate their kinetic parameters, and (3) to study in detail the role of each residue around the acid microenvironment of Trp171 in the catalysis of LiPH8. **As final results of this thesis,** 19 mutant enzymes of LiPH8 were obtained; from which E168Q and E250Q mutants permitted to identify as crucial residues for the binding of VA and the LiP enzyme catalysis to the residues E168 and E250, respectively. These latter experimental results were rationalized through the estimation of enzyme-substrate interaction energies (at a semi-empirical quantum mechanical level) and the delocalization of the spin density obtained through the QM / MM calculations. **Key words:** Lignin peroxidase, veratryl alcohol, spin density, protein engineering, sitedirected mutagénesis, modeling and computational simulation.