

Universidad Icesi

**DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE CIANURO POR LA ENZIMA CIANURO
DIHIDRATASA *DE BACILLUS PUMILUS* PRODUCIDA DE FORMA RECOMBINANTE
EN CÉLULAS DE *E. COLI***

Claudia Liliana Vargas Serna

Universidad Icesi
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias-Biotecnología
Cali, Colombia
2017

**DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE CIANURO POR LA ENZIMA CIANURO
DIHIDRATASA DE *BACILLUS PUMILUS* PRODUCIDA DE FORMA RECOMBINANTE
EN CÉLULAS DE *E. COLI***

Claudia Liliana Vargas Serna

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Biotecnología

Director (a):

Aram Joel Panay Escobar, Ph.D

Línea de Investigación:

Biotecnología industrial y ambiental

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias-Biotecnología

Cali, Colombia

2017

A María Elena y Marco Tulio Serna que me cuidan desde el cielo.

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional.

A Juan pablo Benítez por ser mi compañía en el camino.

A mi familia

Agradecimientos

Al profesor Aram Joel Panay por su guía durante el proceso.

A la universidad ICESI.

A la Sociedad minera del sur por su apoyo para la recolección de muestras

A Lorena Carmona y Catalina Mosquera por su apoyo en la etapa experimental.

Resumen

El cianuro es un compuesto altamente tóxico que se puede encontrar en la naturaleza de forma orgánica e inorgánica. Muchas industrias como la textil, la papelera, y la minera, entre otras, usan cianuro para sus diferentes procesos. Debido a la alta toxicidad del compuesto todo residuo industrial debe ser sometido a algún tipo de tratamiento que permita degradar el cianuro a compuestos menos tóxicos antes de ser desechados. Los tratamientos más comunes son de origen químico como la clorinación alcalina, oxidación con peróxido de hidrogeno y precipitación con hierro férrico, los cuales generan altos costos y desechos igualmente tóxicos. Como una alternativa biológica de degradación se han propuesto microorganismos y enzimas. La degradación por microorganismos es un reto por las altas concentraciones de cianuro que se pueden encontrar en desechos industriales (≥ 5000 ppm) y el elevado pH que se usa para prevenir la formación de ácido cianhídrico. La enzima cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* ha sido estudiada como una alternativa para degradar cianuro en aguas provenientes de la industria. Sin embargo, su baja solubilidad, baja tolerancia a pH básico y a altas temperaturas reducen las posibilidades de que esta enzima sea usada a nivel industrial. En este trabajo se evaluaron diferentes metodologías para purificar la enzima, así como la capacidad de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con un plásmido recombinante que expresa la enzima cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* (CynD) para degradar cianuro. Se encontró que la enzima presenta bajos niveles de solubilidad. Además, la enzima no se pudo recuperar de cuerpos de inclusión y en general se obtuvieron bajos rendimientos de purificación. Se probó la capacidad de las células completas de degradar cianuro a diferentes valores de pH, diferentes temperaturas y se retó el sistema a aguas residuales provenientes de la cianuración minera. Se encontró que CynD en las células completas tienen una mayor resistencia al pH, la temperatura, la concentración de cianuro y la concentración de metales que lo reportado para la enzima purificada. Además, se encontró que la enzima presente en células completas logra degradar hasta el 70% del cianuro que se encuentra en una solución de cianuración minera en 30 minutos.

Palabras clave: Cianuro, Biorremediación, Cianuro dihidratasa, Cianuración minera, *Bacillus pumilus*

Abstract

Cyanide is a highly toxic compound that can be found in nature in organic and inorganic form. Many industries such as textiles, paper, and mining, among others, use cyanide for their different processes. Due to the high toxicity of the compound, all industrial waste must be subjected to some type of treatment that allows degrading the cyanide to less toxic compounds before being discarded. The most common treatments are of chemical origin such as alkaline chlorination, oxidation with hydrogen peroxide, precipitation with ferric iron etc, which generate high costs and equally toxic waste. As a biological degradation alternative, microorganisms and enzymes have been proposed. The degradation by microorganisms is a challenge due to the high concentrations of cyanide that can be found in industrial waste (≥ 5000 ppm) and the high pH used to prevent the formation of hydrocyanic acid. The enzyme cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* has been studied as an alternative to degrade cyanide in industrial waters. However, its low solubility, low tolerance to basic pH and high temperatures reduce the chances that this enzyme is used industrially. In this work, was evaluated different methodologies to purify the enzyme as well as the capacity of *E. coli* BL21 (DE3) cells transformed with a recombinant plasmid that expresses the enzyme cyanide dihydratase (CynD) of *Bacillus pumilus* to degrade cyanide. It was found that the enzyme has low levels of solubility. In addition, the enzyme could not be recovered from inclusion bodies and in general low purification yields were obtained. The ability of whole cells to degrade cyanide at different pH values, different temperatures was tested and the system was challenged to wastewater from mining cyanidation. It was found that CynD in the whole cells have a higher resistance to pH, temperature, cyanide concentration and metal concentration than the purified isolated enzyme. In addition, it was found that the enzyme present in whole cells has the capacity to degrade up to 70% of the cyanide found in a mining cyanide solution.

Keywords: Cyanide, Bioremediation, Cyanide dihydratase, Mining cyanide, *Bacillus pumilus*

Contenido

1. Introducción	1
2. Análisis bioinformático de secuencias de enzimas con posible actividad degradadora de cianuro.....	7
2.1 Introducción.....	7
2.2 Metodología	8
2.2.1 Secuencias de posibles enzimas degradadoras de cianuro	8
2.2.2 Análisis de secuencias.....	9
2.2.3 Modelamiento de la estructura tridimensional proteica.....	9
2.3 Resultados y discusión.....	9
2.3.1 Secuencia 1.....	9
2.3.2 Secuencia C2 y C4.....	11
2.3.3 Secuencia C3	15
3. Degradación enzimática de cianuro.....	19
3.1 Introducción.....	19
3.2 Metodología.	22
3.2.1 Células competentes	22
3.2.2 Clonación del gen que codifica por CynD	23
3.2.3 Producción de la enzima recombinante	24
3.2.4 Pruebas de solubilidad.....	25
3.2.5 Optimización de la solubilidad de la enzima.....	25
3.2.6 Purificación	26
3.2.7 Cuantificación de cianuro.....	27
3.2.8 Degradación de cianuro por células completas de <i>E.coli</i> expresando CynD ..	28
3.2.9 Estabilidad de <i>E. coli CynD</i> frente al pH	29
3.2.10 Estabilidad de <i>E. coli CynD</i> frente a la temperatura	29
3.2.11 Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática de <i>E. coli CynD</i> ..	30
3.2.12 Efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad de <i>E. coli CynD</i>	30
3.2.13 Pruebas de actividad de <i>E.coli-CynD</i> en aguas residuales de cianuración minera.....	30
3.2.14 Medición de metales en la solución Barren.....	31
3.2.15 Efecto de la presencia de metales sobre la actividad de <i>E.coli-CynD</i>	32
3.2.16 Pruebas de viabilidad celular	32
3.2.17 Análisis estadístico y controles	33
3.3 Resultados y discusión.....	33
3.3.1 Producción de la enzima recombinante	33
3.3.2 Pruebas de solubilidad.....	34
3.3.3 Purificación	37
3.3.4 Degradación de cianuro por células completas de <i>E.coli</i> que expresan CynD ..	40
3.3.5 Estabilidad de <i>E.coli-CynD</i> frente al pH	42
3.3.6 Termoestabilida de <i>E. coli CynD</i>	43

XII **DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE CIANURO POR LA ENZIMA CIANURO
DIHIDRATASA DE *BACILLUS PUMILUS* PRODUCIDA DE FORMA
RECOMBINANTE EN CÉLULAS DE *E. COLI***

3.3.7	Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática de <i>E.coli-Cynd</i>	44
3.3.8	Efecto de la concentración de cianuro	46
3.3.9	Pruebas de actividad de <i>E.coli-CynD</i> en aguas residuales de cianuración minera	47
3.3.10	Efecto de metales en solución sobre la actividad de <i>E.coli-CynD</i>	48
3.3.11	Pruebas de viabilidad	51
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	54
4.1	Conclusiones.....	54
4.2	Recomendaciones.....	54
5.	Anexos	55
5.1	Anexo A: secuencias analizadas	55
5.2	Anexo B	56

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. BLAST de secuencias C1	9
Figura 2: alineamiento de secuencia C1 con nitrilasa de <i>Acetobacter orientalis</i>	10
Figura 3. Estructura Modelada de la Cianuro hidratasa de <i>Acetobacter Orientalis</i>	11
Figura 4 BLAST secuencia C2	11
Figura 5 BLAST secuencia C4.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6 alineamiento C2 contra hidrolasa carbono-nitrógeno <i>Acetobacter papayae</i>	12
Figura 7 Alineamiento C4 contra hidrolasa carbono-nitrógeno de <i>Acetobacter papayae</i>	12
Figura 8. Alineamiento secuencia consenso de C2 y C4 contra secuencias con porcentaje de identidad mayor al 60%.	13
Figura 9 alineamiento entre secuencia consenso contra secuencia semilla (C2+C4)	14
Figura 10. Estructura modelada de hidrolasa carbono nitrógeno de <i>Acetobacter papayae</i>	15
Figura 11. BLAST secuencia C3	15
Figura 12. Alineamiento secuencia C3 contra nitrilasa de <i>acetobacter papayae</i>	16
Figura 13 Estructura de Nitrilasa de <i>Acetobacter Papayae</i>	17
Figura 14 prueba de inducción de CynD a diferentes tiempos.....	34
Figura 15 prueba de solubilidad con diferentes buffers: BB: Bug buster Buff 1: Tris pH 8, NaCl 150mM, EDTA 1mM, triton X100 0,1%, Lisozima 0,25mg/mL, MgSO ₄ 20mM, Benzonaza 25 unidades. Buff 2: NaH ₂ PO ₄ 50mM, NaCl 300mM Imidazol 10mM Benzonaza 25 unidades. Sol: fracción soluble. Insol: fracción insoluble	35
Figura 16. Gel Electroforesis SDS page para purificación de la proteína soluble.....	37
Figura 17 Gel de electroforesis SDS paga para la purificación de la fracción soluble desnaturalizada.	39
Figura 18 . Efecto del pH sobre el porcentaje de degradación de cianuro por <i>E.coli</i> -CynD.	43
Figura 19. Actividad enzimática de la cianuro dihidratasa en aguas de cianuración minera. Tratamiento A: Pruebas en solución barren sin Dilución. Tratamiento B pruebas en solución barren diluida 1:30 tratamiento C. pruebas en solución barren diluida 1:30 con una proporción de 700µL de solución barren y 300 de suspensión celular. La reacción se llevó a cabo por 30min.	47
Figura 20 Efecto de la adición de metales en soluciones con 5mM de cianuro, pH 8 y temperatura ambiente sobre la actividad relativa de <i>E.coli</i> - CynD	50

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Diseño experimental solubilidad de la enzima	26
Tabla 2. Diseño factorial para la purificación de la proteína.....	26
Tabla 3. Parámetros de medición de metales en solución.....	31
Tabla 4. Efecto de la solución de re-suspensión sobre la actividad de E.coli- CynD.....	41
Tabla 5. Efecto de la temperatura de incubación de las células sobre el porcentaje de cianuro removido.....	44
Tabla 6. Efecto de la temperatura de reacción sobre el porcentaje de cianuro removido.	45
Tabla 7. Efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad de la enzima.....	46
Tabla 8. Análisis de metales totales en la solución barren por el método de ICP-MS.....	49

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

CynD	Cianuro Dihidratasa
CN-	Cianuro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Min	<i>minutos</i>
UFC	<i>Unidades formadoras de colonia</i>
<i>ppm</i>	<i>Partes por millón</i>

1. Introducción

El cianuro es un compuesto químico que se forma por la unión, mediante un triple enlace, entre un átomo de carbono y un átomo de nitrógeno. Generalmente se conocen como cianuros a sustancias que tienen dentro de su composición química un grupo CN^- ; técnicamente la definición de cianuro es una molécula unida por un triple enlace con una carga negativa de -1, en la cual están unidos un átomo de carbono en estado de oxidación +2 y un átomo de nitrógeno en el estado de oxidación -3(1).

Los cianuros se encuentran en la naturaleza en pequeñas cantidades ya que algunas bacterias, hongos, algas y plantas tienen la capacidad de producirlos, sin embargo, también se puede encontrar de forma inorgánica el cual es sintetizado químicamente(2). Este compuesto en concentraciones muy bajas, como las encontradas en algunos alimentos, no suele generar ningún riesgo para la salud humana ni animal. Sin embargo, a concentraciones medianamente altas es considerado como un compuesto altamente tóxico. En humanos su inhalación, consumo, o contacto con la piel puede causar intoxicación, esto se debe a que el cianuro se une al centro activo de la citocromo oxidasa evitando que se dé la fosforilación oxidativa, causando hipoxia celular o hipoxia citotóxica(2). En el caso de los humanos, concentraciones de cianuro superiores a 0,5 mg por kg de peso podrían causar la muerte(3).

A pesar de su toxicidad el cianuro es utilizado en diferentes procesos industriales como la manufactura de hierro o acero, extracción minera, la fabricación de pesticidas(2). revelado de fotografías, manufactura de plásticos, fumigación de barcos entre otras(4).

En la minería el cianuro se usa para la extracción de oro y plata, debido a la facilidad que presenta el CN^- para crear complejos con estos metales(5). El oro y la plata son metales cuya extracción es compleja debido a que requieren diferentes tratamientos que permitan separarlos de otros metales. En general el mayor atractivo del oro es que es inmune a la acción de una gran variedad de químicos, sin embargo, no lo es con respecto al cianuro,

este compuesto tiene la capacidad de acomplejarse con el oro y separarlo de otros minerales(6). Los procesos de lixiviación de oro pueden realizarse con cianuro o con mercurio. No obstante, a nivel mundial, el proceso de recuperación de oro con cianuro ha relevado los procesos que utilizan amalgama de mercurio como agente lixivante ya que este último es más económico y menos contaminante(6).

El proceso de cianuración consiste en el uso de soluciones de cianuro de entre 10000 a 20000 ppm, en condiciones oxidantes; con el fin de lixiviar el metal de interés separándolo de otros compuestos minerales. Posteriormente, a la solución que contiene el oro se le adiciona zinc o carbón activado los cuales permiten la recuperación del metal. Al final del proceso se genera una solución cianurada libre de oro que puede ser reutilizada en el proceso, sin embargo, debido a la alta concentración de otros minerales muchas de las soluciones de cianuro usadas deben ser enviadas a plantas de tratamiento para retirar contaminantes y poder ser vertidas a cuerpos de agua(6).

En Latinoamérica la minería de oro se encuentra en crecimiento, para el 2010 la región produjo el 19% de la producción total mundial siendo liderado por países como Perú, Méjico y Brasil. El crecimiento en la demanda mundial de metales ha aumentado el crecimiento de la industria minera en América latina, siendo en la actualidad la región con mayor cantidad de recursos invertidos en exploración minera. Actualmente Colombia ocupa el quinto puesto en términos del aumento de la exploración minera en la región(7).

En el 2015 en Colombia hubo una producción de 59,2 toneladas de oro(8). Tradicionalmente en Colombia la extracción de oro se ha realizado con mercurio el cual es un compuesto altamente toxico, regiones como Antioquia y Bolívar presentan niveles de mercurio muy por encima de los estándares aceptables causando problemas de salud en la población. Para mitigar la contaminación con mercurio y siguiendo las estrategias mundiales, a partir del 2010 se sanciono la ley 1382 la cual dentro de sus reformas más importantes incluye la eliminación del de mercurio en la minería, lo cual impulsa el uso de estrategias como la cianuración para la recuperación del oro(9). Actualmente no se presentan reportes oficiales sobre contaminación con cianuro, esto en parte debido a que la eliminación del mercurio ha sido gradual y muchas industrias aun lo utilizan, por otra parte, los procesos de cianuración se llevan a cabo en grandes piscinas de cianuro donde en teoría no se deberían presentar fugas. A pesar de la menor toxicidad del cianuro, en comparación con el mercurio, se ha demostrado que la llegada de cianuro, así como otros

metales pesados, a efluentes acuíferos tiene un efecto letal en la biodiversidad tanto microbiana como de la flora y la fauna del lugar(10,11).

En Colombia se encuentran regulados los valores mínimos permisibles de cianuro, el agua de consumo humano y domestico no debe contener más de 0,2 ppm. Para asegurar la preservación de la flora y fauna los efluentes no deben de contener más de 0,05 ppm, el agua considerada potable debe tener niveles máximos de 0,1 ppm y los residuos sólidos no deben exceder 1 ppm(12).

Los tratamientos para la eliminación de cianuro buscan degradar el compuesto hacia formas menos tóxicas, esto se logra ya sea por proceso de oxidación o de precipitación. Algunos procedimientos buscan remover cianuro y otros tienen como finalidad recuperarlo. Existen una gran variedad de tratamientos que van desde los más simples que solo requieren el uso de agua hasta otros más complejos como la cloración alcalina, precipitación con hierro y las que incluyen el uso de dióxido de azufre, peróxido de hidrogeno y, ácido peroxosulfúrico(1,13).

Cloración alcalina.

Este proceso destruye casi todas las formas del cianuro exceptuando el cianuro férrico, la reacción se lleva a cabo en condiciones alcalinas y en presencia de cloro, donde se propicia una reacción de oxidación en la cual el cianuro es convertido en N_2 y CO_2 . El proceso se da en dos pasos básicos, inicialmente el cianuro se oxida e hidroliza para convertirse en cianato, esta reacción se lleva a cabo a un pH de 11, en el segundo proceso el cianato se oxida para convertirse en nitrógeno y bicarbonato, esta reacción se da a un pH de 8,5. Sin embargo, debido a que controlar el pH se torna bastante costoso y complicado en muchas ocasiones solo se realiza el proceso hasta la primera reacción dado que el cianato es considerablemente menos toxico que el cianuro(1,13).

Dióxido de azufre (INCO)

En principio esta técnica se basa en el uso de SO_2 , aire y cobre como catalizador, la reacción se lleva a cabo en condiciones controladas de pH. Este tratamiento permite la oxidación del cianuro libre y cianuro complejado y lo convierte en cianato, además se da una precipitación del ferrocianuro el cual no se oxida a cianato como las demás especies, este precipitado es bastante estable a diferentes condiciones de pH por lo cual hace fácil su remoción. Esta técnica es una de las más usadas y eficientes para la remoción de

cianuro en la industria minera debido a su alta eficiencia en cuanto eliminación de cianuro(1,13).

Peróxido de hidrogeno

En este caso el principio para la destrucción del cianuro es el mismo que mediante SO_2 , pero a diferencia de este se utiliza como agente oxidante el peróxido de hidrogeno. La reacción es catalizada igualmente por cobre y se obtiene como producto final cianato y agua, generalmente este método se usa precipitación para lograr concentraciones finales muy bajas de cianuro hasta (1mg/L). Generalmente las aguas resultantes de este proceso pueden ser descargadas después de remover el cianuro férrico y los metales que se precipitan en el proceso(1,13).

Ácido peroximonosulfúrico

Este método obedece al mismo principio que el método de oxidación con peróxido de hidrogeno y dióxido de azufre, se diferencia de estos porque este método evita el uso de cobre y solo es aplicado en casos en que los otros dos métodos no son viables(1,13).

Precipitación de ferrocianuro

La adición de hierro férrico en presencia de cianuro permite que este forme un complejo y se forme ferrocianuro el cual puede ser fácilmente precipitado, este proceso se lleva cabo adicionando sulfato ferroso y entre pH 5 y 6. Generalmente es muy útil cuando en la solución hay presente gran cantidad de cianuro libre. La reacción del cianuro con el hierro permite disminuir la toxicidad del cianuro y disminuir las concentraciones de la solución en un rango entre 1 y 5 mg /L(1,13).

Métodos biológicos

Uno de los principales inconvenientes de los métodos físicos y químicos para descontaminar aguas con cianuro es que estos son solo efectivos cuando el cianuro se encuentra de forma libre o débilmente unido a metales. El uso de grandes cantidades de reactivos no solo representa un alto costo de proceso, sino que además acarrea el pago de una gran cantidad de impuestos, sumado a esto muchos de los químicos usados para degradar cianuro también presentan una alta toxicidad(14).

Muchos organismos como bacterias y hongos tienen la capacidad de degradar cianuro y usarlo como fuente de carbono y nitrógeno, esta capacidad los presenta como una alternativa para el uso de ellos como fuente de biorremediación. Las reacciones para degradar cianuro mediadas por microorganismos se pueden dar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y se puede ver afectada por condiciones de pH, temperatura, presencia de otros nutrientes y oxígeno(1).

Generalmente la biorremediación se realiza en biorreactores que pueden ser activos, es decir totalmente controlados, o pasivos donde se deja que el proceso ocurra sin intervención. Los biorreactores pasivos tienden a ser más rentables, de fácil manejo y mayor durabilidad. No obstante, con el tiempo es difícil mantener la integridad de la comunidad degradadora.

Varios estudios han mostrado la capacidad de diferentes tipos de microorganismos para degradar cianuro, entre estos se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *klebsiella*, *Corynebacterium nitrophilus*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*(15)

La degradación del cianuro por parte de los microorganismos se basa principalmente en rutas metabólicas en las cuales se encuentran involucradas una gran variedad de enzimas con diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran la hidrólisis, la oxidación, la reducción, la sustitución y transferencia, y la síntesis. Entre las enzimas con capacidad para usar cianuro como sustrato se encuentran las nitrilasas, cianuro hidratasa, cianuro monooxigenasa, dioxigenasa y nitrogenasa, entre otras(14). Todas estas enzimas son de bastante interés para ser usadas independientemente para tratamiento de aguas contaminadas con cianuro, sin embargo, debido a su naturaleza y sus mecanismos de acción se pueden ver afectadas por diferentes factores como el pH, la concentración de cianuro o la presencia de metales(14).

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de la enzima cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* producida de forma recombinante en *E.coli* para degradar el cianuro presente en soluciones acuosas.

2. Análisis bioinformático de secuencias de enzimas con posible actividad degradadora de cianuro

2.1 Introducción

Los microorganismos cumplen una función vital en todos los ecosistemas, por lo cual su caracterización y el estudio de sus funciones son de especial interés para la comunidad científica en general. Sin embargo, las técnicas microbiológicas tradicionales solo logran conocer y caracterizar las especies cultivables, las cuales son tan solo una pequeña porción de toda la diversidad presente en un ecosistema. Por lo que en la actualidad se han propuesto metodologías de estudio que permitan caracterizar tanto especies cultivables como no cultivables. Los estudios metagenómicos permiten no solo conocer estos dos tipos de especies sino caracterizar sus genes y las funciones de estos a través del análisis de las secuencias de ADN presentes en un ambiente específico. Esta perspectiva ha sido de especial interés en el análisis de ambientes altamente contaminados donde las especies microbianas presentes tienen potencial para procesos de biorremediación(16–19).

Los estudios metagenómicos se han convertido en una herramienta clave para la explotación de la biodiversidad microbiana, por medio del estudio de nuevos microorganismos y la creación de librerías de enzimas con gran potencial e interés en diferentes procesos(17). Uno de los microambientes de más interés son los procesos de fermentaciones artesanales, ya que, en estos se encuentra una amplia diversidad microbiana que exhibe diversas actividades enzimáticas con posibles aplicaciones de interés industrial o en biorremediación.

Un ejemplo de estos procesos artesanales basados en fermentación es la obtención de almidón de yuca partir de yuca amarga. La yuca (*Manihot esculenta*) es una de las plantas que produce compuestos cianurados de manera natural. La yuca se clasifica de acuerdo a su producción de cianuro en dulce y amarga, siendo esta última la que tiene contenido de cianuro más alto y cuyo consumo sin tratamiento puede ser tóxico para humanos y animales(20,21). En Colombia, y Brasil el almidón producido a partir de esta variedad de yuca es usado en productos tradicionales como el pandebono, pan de yuca entre otros(22).

Para la obtención de almidón agrio de yuca se realiza un proceso de fermentación de la yuca. Generalmente, este proceso se hace de forma artesanal en lugares conocidos como rayanderías. En general, el proceso es poco tecnificado y las condiciones del inóculo no son establecidas. El objetivo de estos procesos de fermentación es la obtención del almidón. Sin embargo, en el proceso también se elimina el cianuro presente en la yuca(12). Por este motivo, los microorganismos presentes en este proceso de fermentación son de gran interés por su capacidad de sobrevivir en ambientes con altos contenidos de cianuro, y sus enzimas son candidatas potenciales para usarse en procesos de biorremediación de aguas de cianuración.

Con el objetivo de evaluar la presencia de enzimas con actividad degradadora de cianuro presentes en los microorganismos implicados en el proceso de fermentación de almidón de yuca Soto et al han realizado estudios metagenómicos de un tanque de fermentación de yuca del departamento del Cauca (Trabajo en proceso de publicación). Los datos obtenidos por Soto y colaboradores en su investigación fueron usados como base para realizar un análisis bioinformático de secuencias que permitiera determinar identidades de las enzimas encontradas.

2.2 Metodología

2.2.1 Secuencias de posibles enzimas degradadoras de cianuro

Los datos de secuencias metagenómicas se analizaron usando el programa Protein BLAST (23) del NCBI para identificar posibles proteínas anotadas como degradadoras de cianuro. Este análisis arrojó 4 con posible identidad de enzimas capaces de degradar

cianuro. Estas secuencias se codificaron como (C1, C2, C3 y C4). Las secuencias originales se encuentran en el anexo A.

2.2.2 Análisis de secuencias

La identidad de las secuencias se analizó por medio del algoritmo de búsqueda BLAST usando como plataforma estándar Protein BLAST de la base de datos NCBI(23). Se tomó como criterio de selección el porcentaje de identidad de las secuencias resultado de la búsqueda con la secuencia usada para realizar la búsqueda.

Por medio del programa Mega7(24) y el algoritmo Muscle (25–28) se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas por BLAST y se obtuvo una secuencia consenso para cada una de las secuencias analizadas.

Las secuencias en las cuales no existía cubrimiento total con la secuencia semilla fueron alineadas con múltiples secuencias las cuales se seleccionaron por presentar una identidad mayor al 60%

2.2.3 Modelamiento de la estructura tridimensional proteica

La estructura se modelo por medio del programa Swiss-Model(29,30), usando como template la estructura con mayor identidad, según el resultado arrojado por BLAST.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Secuencia 1.

El análisis por medio de BLAST de la secuencia C1 arrojó como resultado un porcentaje de identidad del 99% con nitrilasas de *acetobacter orientalis*. Como se muestra en la figura 1. Esta proteína se encuentra dentro de la super familia de las nitrilasas específicamente se relaciona con las cianuro hidratatas.

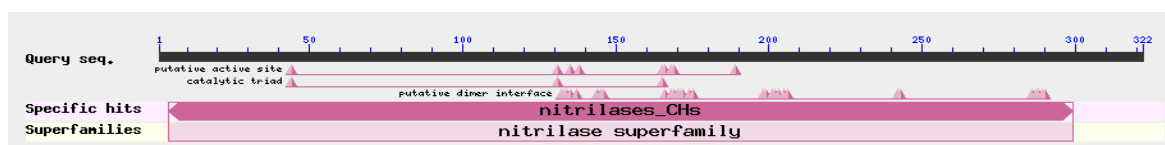


Figura 1. BLAST de secuencias C1

El alineamiento de la secuencia C1 con la reportada para la nitrilasas de *acetobacter orientalis* se puede observar que no existen gaps entre las dos secuencias analizadas, ni cambios de aminoácidos (figura 2)



CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

gene_id_38134          MTPLRVAVVQAGTSLFDTPKTLERMQAHCIAAAALGVKLVVFPPEAYIGGYPKGLTFGAVM
gi|889751459|ref|WP_048841512.1| MTPLRVAVVQAGTSLFDTPKTLERMQAHCIAAAALGVKLVVFPPEAYIGGYPKGLTFGAVM
*****

gene_id_38134          GSRFPFEGREEYLRWKSAIMVPGPETVQIGSFAATMKAHIVVGVIEKEGATLYCKALFFG
gi|889751459|ref|WP_048841512.1| GSRFPFEGREEYLRWKSAIMVPGPETVQIGSFAATMKAHIVVGVIEKEGATLYCTALFFG
*****

gene_id_38134          PDGALLGKHRKLMPTATERLWVGQGDGSLPVFETEAGRLGAICWENYMPALRQSLYAQ
gi|889751459|ref|WP_048841512.1| PDGALLGKHRKLMPTATERLWVGQGDGSLPVFETEAGRLGAICWENYMPALRQSLYAQ
*****

gene_id_38134          GINWVCAPTVDERDIWQASMRHIAYEGRTFVLSACQYMRADAPQYEQHGHNPETVLI
gi|889751459|ref|WP_048841512.1| GINWVCAPTVDERDIWQASMRHIAYEGRTFVLSACQYMRADAPQYEQHGHNPETVLI
*****

gene_id_38134          KGGSVIVNPFGEIAGPVYDREAILTADIDLDDVIRAKYDLVAGHYARPDVFSLQVDTT
gi|889751459|ref|WP_048841512.1| KGGSVIVNPFGEIAGPVYDREAILTADIDLDDVIRAKYDLVAGHYARPDVFSLQVDTT
*****

gene_id_38134          AKTPVAFTTQETGPLSLPDAIE
gi|889751459|ref|WP_048841512.1| AKTPVAFTTQETGPLSLPDAIE
*****
  
```

Figura 2: Alineamiento de la secuencia C1 con la reportada para la nitrilasa de *Acetobacter orientalis*.

La cepa *Acetobacter orientalis* se encuentra principalmente en alimentos fermentados como yogurt, tofu y Tempe, así como en algunas frutas como coco, y carambolo (31,32).

Las nitrilasas de tipo cianuro hidratasa se caracterizan por hidrolizar nitrilos en amonio y su correspondiente ácido carboxílico(31,32).

Esta enzima ha sido aislada de diferentes tipos de hongos y de acuerdo a su origen tiene mayor o menor actividad, su principal limitación es que no degrada efectivamente cianuro complejo con metales(14).

La estructura tridimensional de la proteína correspondiente a la secuencia C1 se modeló usando como *template* la estructura de la enzima nitrilasa de *Syechocystis sp.* (PDB ID: 3wuy), determinada mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 3.1 Å (33) ,

con la que comparte una identidad del 33,11%. El modelo obtenido fue un monómero que se identifica dentro de la familia de las nitrilasas (Figura 3.), La estructura obtenida tiene un QMEAN mayor a -4 por lo cual se considera que el modelo obtenido se acerca al de una estructura obtenida experimentalmente(24).

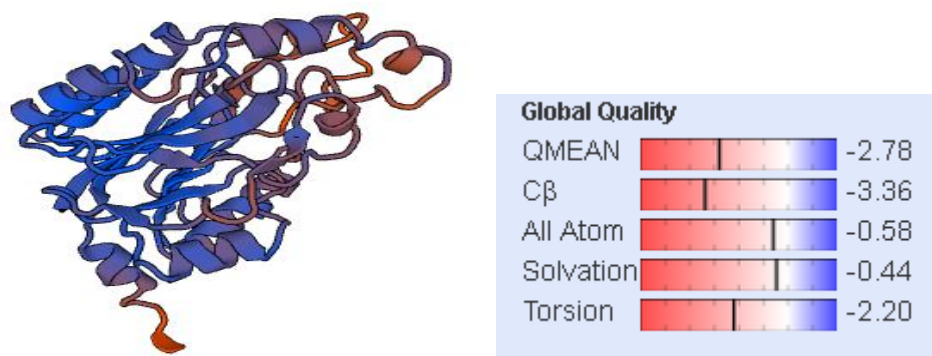
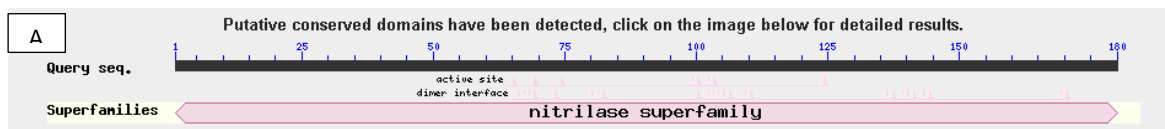


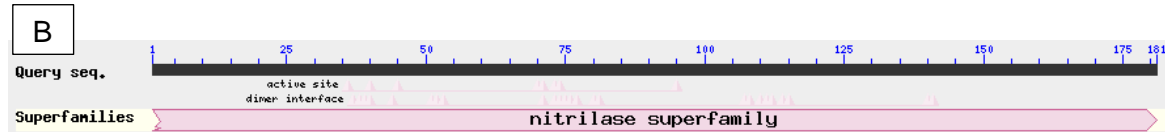
Figura 3. Estructura Modelada por homología de la Cianuro hidratasa de *Acetobacter Orientalis*.

2.3.2 Secuencia C2 y C4

El análisis por medio de BLAST de las secuencias C2 y C4 dio como resultado alta identidad con la hidrolasa carbono-nitrogeno proveniente de *Acetobacter papayae*, enzima que se encuentra dentro de la superfamilia de las nitrilasas (figura 4).



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> carbon-nitrogen hydrolase [<i>Acetobacter papayae</i>]	355	355	99%	9e-121	96%	WP_025861073.1



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> carbon-nitrogen hydrolase [<i>Acetobacter papayae</i>]	369	369	100%	1e-127	98%	WP_025861073.1

1 DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE CIANURO POR LA ENZIMA CIANURO
 2 DIHIDRATASA DE *BACILLUS PUMILUS* PRODUCIDA DE FORMA
 RECOMBINANTE EN CÉLULAS DE *E. COLI*

Figura 4 BLAST secuencia C2 (a) y C4 (b)

Los alineamientos respectivos de las secuencias C2 y C4 con la secuencia de *Acetobacter papayae* (figuras 5 y 6) revelaron que las secuencias encontradas en el metagenoma pertenecen a una misma proteína, sin embargo, no se encuentran completas.

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

gene_id_59541
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| -----GAPD
MTQPLRLGLVLAWEVARIGTIEDYAAHLDRLLVAQGAADADLLLMPEYACMEVASALVDAPD
.***

gene_id_59541
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| PAAELEAVCAQSDALLAIMRDTAMRHGVWLMPTLPRPEVEGVRNRAPLIAPDGRIMFQD
PGAELAVCAHSDALLEIMRGAAMRHGVWLMPTLPRPEAQGVRNRAPLIAPDGRIMFQD
*.*****.***** **.:*****.*****.*****

gene_id_59541
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| KHVMTRFENESWGVVAGNPPGVFETPWGLIGAAVCYDSEFPMLTRRQIEAGAWLILVPTC
KHVMTRFENESWGVVAGNPPGVFETPWGLIGAAVCYDSEFPMLTRRQIEAGAWLILVPTC
*****.*****.*****

gene_id_59541
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| TDSLHGFNRVRIISAQARALENQCFVAVAPTVDAPWLATLDENHGCAGVYGPVDRG----
TDSLHGFNRVRIISAQARALENQCFVAVAPTVDAPWLATLDENHGCAGVYGPVDRGFPAD
*****.*****.*****

gene_id_59541
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| -----
GIMGEGKLDQGGWVFTLNPETLDAVRENGAVRNCRDWPAQVPAAEPLPVEV
  
```

Figura 5 alineamiento C2 contra hidrolasa carbono-nitrógeno *Acetobacter papayae*

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

gene_id_96025
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| -----
MTQPLRLGLVLAWEVARIGTIEDYAAHLDRLLVAQGAADADLLLMPEYACMEVASALVDAPD

gene_id_96025
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| -----HGVLMPGTLPRPEAEGVRNRAPLIAPDGRIMFQD
PGAELAVCAHSDALLEIMRGAAMRHGVWLMPTLPRPEAQGVRNRAPLIAPDGRIMFQD
*****.*****.*****

gene_id_96025
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| KHVMTRFENESWGVVAGNPPGVFETPWGLIGTAVCYDSEFPMLTRRQIEAGAWLILVPTC
KHVMTRFENESWGVVAGNPPGVFETPWGLIGAAVCYDSEFPMLTRRQIEAGAWLILVPTC
*****.*****.*****

gene_id_96025
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| TDSLHGFNRVRIISAQARALENQCFVAVAPTVDAPWLATLDENHGCAGVYGPVDRGFPAD
TDSLHGFNRVRIISAQARALENQCFVAVAPTVDAPWLATLDENHGCAGVYGPVDRGFPAD
*****.*****.*****

gene_id_96025
gi|647583511|ref|WP_025861073.1| GIMAEGRLDQGGWVFTLNPETLDAV-----
GIMGEGKLDQGGWVFTLNPETLDAVRENGAVRNCRDWPAQVPAAEPLPVEV
***.*****.*****
  
```

Figura 6 Alineamiento C4 contra hidrolasa carbono-nitrógeno de *Acetobacter papayae*


```

Consenso      MMTPLRLGVLAWEVARIAGIEDYAAHLDRRLVAEAAADGADLLLMPYACME AASALSGVD
semilla      MTQPLRLGVLAWEVARIIGTIEDYAAHLDRRLVAQGAAD-ADLLLMPYACMEVASAL--VD
* *****, *****,*** *****,**** **

Consenso      APDPAAELEAMVAHADAILAAMRGAAMRHGWLMPGSLPMP EADGRVRRAPLIAPDGRLL
semilla      APDPAAELEAVCAHSDALLAIMRDAAMRHGWLMPGTLPRPEAEG-VRNRAPLIAPDGRI
*****: **:**:** **.******:*** **: * *****:

Consenso      AFQDKHVMTRFEAESWGVSAAGAPPGVFETPWGLIGASVCYDSEFPKLVRAQVEAGAWLIL
semilla      MFQDKHVMTRFENESWGVRAAGNPPGVFETPWGLIGAAVCYDSEFPMLTRRQIEAGAWLIL
***** ***** ** *****:***** * * *:*****

Consenso      VPTCTDSLHGFNRVRI SAQARALENQC FVAVAPT VGDAPW SATLDENHGCAGVYGPVDRG
semilla      VPTCTDSLHGFNRVRI SAQARALENQC FVAVAPT VGDAPW LATLDENHGCAGVYGPVDRG
*****

Consenso      FPADGVLAE GALDQGGWVFATLDPATLEAVRENGAVRNHRDINPAQVPVAPPLPAEFA
semilla      FPADGIMAEGLDQGGWVFVTLNPETLDAVRENGAVRNCRDINPAQVPAAEPLPVEV-
*****:*** *****. **: * **:***** *****.* **.*
  
```

Figura 8 alineamiento entre secuencia consenso contra secuencia semilla (C2+C4)

La secuencia consenso se analizó por medio del programa BLAST y se determinó que mantuvo su identidad con la hidrolasa carbono nitrógeno de *Acetobacter papayae*.

La estructura tridimensional que corresponde a las secuencias C2 y C4 fue modelada usando como *template* , la estructura de la enzima nitrilasa de Nit-fragile histidine triad fusión protein (PDB ID: 1ems.1.A), determinada mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 2.8 Å (34). El modelo en general presenta un buen ajuste con la estructura de una proteína obtenida experimentalmente, QMEAN mayor a -4, la estructura es un homo tetrámero (figura 10) con un porcentaje de identidad con el templete de 22,56%(24).

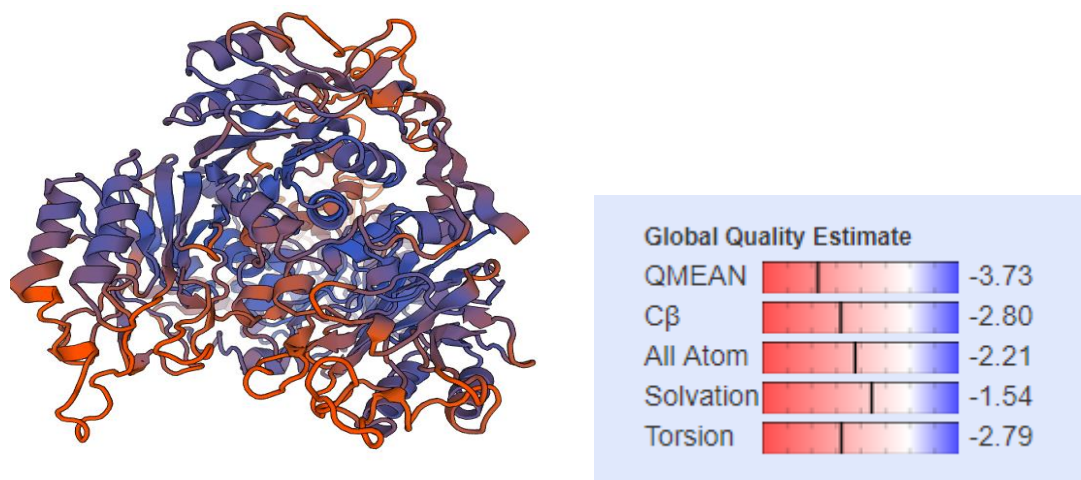


Figura 9. Estructura modelada por homología de hidrolasa carbono nitrógeno de *Acetobacter papayae*

2.3.3 Secuencia C3

La comparación de la secuencia C3 frente a los repositorios de secuencias demostró que la proteína C3 tiene una identidad de nitrilasa del microorganismo *Acetobacter papayae*, esta enzima también pertenece a la super familia de las nitrilasa (figura 11)

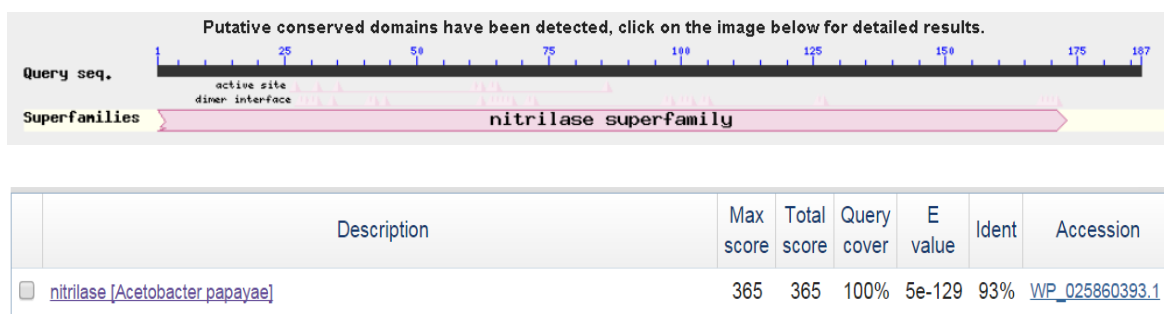


Figura 10. BLAST secuencia C3

El alineamiento de ambas secuencias se presenta en la figura 12

1 DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE CIANURO POR LA ENZIMA CIANURO
 6 DIHIDRATASA DE *BACILLUS PUMILUS* PRODUCIDA DE FORMA
 RECOMBINANTE EN CÉLULAS DE *E. COLI*

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

gene_id_66932
gi|647582798|ref|WP_025860393.1| -----
MRIAGLQTAGTPGRVDANLTELGQAVVRRARQDNVQLLVTPLELFTVGYDIGESLRDLARFD

gene_id_66932
gi|647582798|ref|WP_025860393.1| -----AEHTPQGLYNAATLVDAQGHTVLHYRKHLEFGALDRAFFL
PLPAIRMAAAAHGVAILVGYAEHTEQGLYNSATLVDAEGHTLLHYRKHLEFGELDRAFFL
*****;*****;***;***** *****

gene_id_66932
gi|647582798|ref|WP_025860393.1| PGSAPQPEVVSFQGMRVASMICYDVEFPEYVRATALAGCELLLVPTAQMEPFTFVAREVIR
PGSAPPEVITYQGMRLASMICYDVEFPEYVRATALAGCELLLVPTAQMEPFTFIAREVIR
**** *::;****;*****;*****;*****;*****;*****

gene_id_66932
gi|647582798|ref|WP_025860393.1| TRAWENQIYIAYINHGGQEGQTHYVGNISQIVAPDATVLRARIEQGTGLITADVSAQVVARA
TRAWENQIYIAYINHGGQEGQTRYVGNISQIVAPDASVLRARIEQGTGLITADVSAQVVARA
*****;*****;*****;*****;*****;*****

gene_id_66932
gi|647582798|ref|WP_025860393.1| QHANPYLQDRRPAASYQSLVAAFEKDTF
QHANPYLQDRRPAASYQSLVAAFEKDMF
***** *
  
```

Figura 11. Alineamiento de la secuencia C3 contra la secuencia reportada para la nitrilasa de *acetobacter papayae*.

Se encontró que la secuencia C3 corresponde a una porción de la secuencia de la nitrilasa de *acetobacter papayae* menos el extremo N-terminal. Para la obtención de la secuencia completa se tomó la sección inicial de la secuencia reportada para la nitrilasa de *A. papayae* y se unió con la secuencia obtenida del metagenoma.

La predicción de la estructura tridimensional para esta proteína se modeló usando como *template* la estructura de la enzima amidasa alifática (PDB ID: 5JQN), la cual fue determinada mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 1.19 Å(34) las secuencias comparten una identidad del 36,58%. La dio como resultado un homo-dímero figura 13. El valor QMEAN se encuentra entre los valores de ajuste aceptables (figura 13)

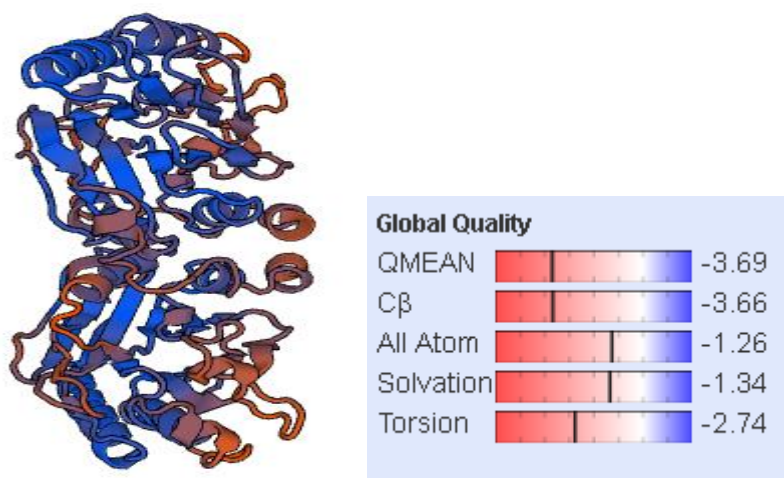


Figura 12 Estructura de Nitrilasa de *Acetobacter Papayae*

Las amidasas se caracterizan por catalizar la reacción:



Estas enzimas son las encargadas de permitir que los organismos usen acetamida como fuente de carbono y nitrógeno(35,36). Esta enzima se encuentra dentro de la familia de las nitrilasas(37).

La superfamilia de las nitrilasas son un grupo de enzimas que se caracterizan por hidrolizar enlaces no peptídicos de carbono y nitrógeno, cuentan con similitudes en sus secuencias y están presentes en organismos tanto procariontas como eucariotas, sin embargo, tienen actividad en diferentes sustratos y su actividad metabólica varía entre unas y otras(38).

A pesar de su gran variedad estructural, las enzimas pertenecientes a esta super familia tienen como característica una triada catalítica compuesta por ácido glutámico, lisina y cisteína y una formación $\alpha\beta\beta\alpha$ y sus estructuras secundarias consisten en su mayoría en hélices α . A pesar de esto, su especificidad varía entre unas y otras. Las nitrilasas alifáticas actúan sobre nitrilos alifáticos, las nitrilasas aromáticas o heterocíclicas actúan sobre nitrilos aromáticos y heterocíclicos y las arilacetoneitrilasas actúan sobre arilacetoneitrilos tales como fenilacetoneitrilo y fenilpropionitrilo(37).

Ese tipo de enzimas se han encontrado en bacterias, hongos filamentosos, levaduras y plantas, y su importancia en los organismos varía desde el uso de nitrilos como fuente de carbono y nitrógeno hasta como mecanismo de defensa ante situaciones de estrés(37,39).

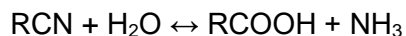
Entre las secuencias analizadas, la cianuro hidratasa de *Acetobacter orientalis* es la enzima que se reporta en la literatura como la que mayor afinidad puede mostrar frente al cianuro, ya que otras especies de nitrilasas muestran especificidad para otras especies de nitrilos(15).

Las secuencias aquí analizadas se encuentran en estudio por el grupo de investigación en biocatalizadores de la Universidad Icesi, sin embargo, para el presente trabajo se eligió estudiar la enzima cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* la cual había sido reportada previamente en la literatura y a la que se le había analizado su expresión en *E.coli* como sistema heterólogo recombinante (40–43).

3. Degradación enzimática de cianuro

3.1 Introducción.

Dada la importancia del tratamiento de aguas contaminadas con cianuro varios grupos de investigación se encuentran interesados en trabajar con enzimas que tengan la capacidad de degradar este compuesto. En la naturaleza existen una gran variedad de enzimas capaces de degradar cianuro entre las que se destaca la cianuro dihidratasa la cual se encarga de catalizar la formación de amoníaco y formiato a partir de cianuro (6).



A pesar de que esta enzima lleva más de veinte años de haber sido reportada por primera vez, tan solo en los últimos años han aparecido reportes de estudios realizados con el objetivo de entender y explotar su potencial.

La primera identificación de cianuro dihidratasa en *Bacillus pumilus* fue reportada por Meyers y colaboradores en 1993, el grupo de trabajo logró aislar la enzima responsable de la capacidad de *Bacillus pumilus* para degradar cianuro. La enzima fue aislada y caracterizada cinéticamente y se encontró que su actividad podría verse mejorada por la presencia de algunos metales como Sc^{3+} , Cr^+ , Fe^{3+} , and Th^{3+} (44)

Posteriormente esta misma enzima fue identificada en otro microorganismo, Watanabe y colaboradores (1998) lograron aislar una cepa bacteriana de aguas residuales de una planta de revestimiento de metales la cual tenía capacidad para degradar cianuro. Esta cepa fue analizada con técnicas estándar para su identificación microbiológica. Esta identificación dio como resultado a *Pseudomonas stutzeri*, a la cual se le realizó un aislamiento y caracterización de la enzima encargada de degradar cianuro. Esta enzima fue identificada como una proteína polipéptica de 38KDa, cercana a la familia de las cianidasas e identificada como cianuro dihidratasa, esta enzima presento un Km de 1.7

mM para cianuro, una actividad específica de 54,6 pMol de amonio producido por minuto, y una actividad óptima a 30 grados y pH 7.5(45)

En un trabajo posterior, este mismo grupo estudió el posible sitio activo de la cianuro dihidratasa proveniente de *Pseudomonas stutzeri* AK61, para ello se realizó un análisis comparativo de la secuencia de esta enzima con otras enzimas de la familia de las nitrilasas. Se encontró que la secuencia de aminoácidos de la cianuro dihidratasa tiene alta homología con nitrilasas provenientes de diferentes especies y con la enzima cianuro hidratasa. Adicionalmente, se identificaron tres regiones homologas en todas las enzimas analizadas. Con el fin de investigar la funcionalidad de estas regiones homologas se realizaron mutaciones dirigidas hacia los residuos que podrían afectar la actividad catalítica de la enzima, esto permitió encontrar que el cambio de la cisteína en la posición 163 ocasiona que la enzima pierda su actividad catalítica por lo cual se estableció que este residuo juega un papel fundamental para el correcto funcionamiento de la enzima. Resultados similares se encontraron en nitrilasas de *Rhodococcus rhodochrous* K22 *Alcaligenis faecalis* JM3 y *Rhodococcus rhodochrous* J1(46).

La enzima cianuro dihidratasa también ha sido producida de forma recombinante. Jandhyala y colaboradores (2003), clonaron el gen de cianuro dihidratasa proveniente de *Bacillus pumilus* en un vector de expresión en *E. coli* con el objetivo de estudiar estructuralmente esta enzima. La enzima purificada de *Bacillus pumilus* fue analizada por microscopia electrónica y se realizó una reconstrucción tridimensional de la estructura de la proteína, análisis por electroforesis y análisis por Maldi-Tof. La proteína producida en *E.coli* fue purificada de la fracción soluble usando una cola de histidina y se le realizaron análisis de degradación de cianuro y cinéticos. Los investigadores reportaron que la proteína tiene una estructura irregular con dos espirales simétricas, con una separación aproximada de 8nm, una longitud total de 18,5nm y un diámetro total de 9,5nm. A pesar que la proteína fue producida en *E.coli* BL21(DE3), la proteína producida mostró problemas de solubilidad por lo cual los autores no lograron purificarla en altas cantidades. La proteína purificada mostró una actividad total de 2.3 U y una actividad específica de 135 U/mg(43).

Posterior a estos estudios se han realizado diferentes análisis que permiten entender la función de diferentes regiones de la enzima. Uno de estos estudios fue realizado en el 2015 por Crum y colaboradores quienes investigaron el efecto de la hibridación de la Porción C- terminal de la proteína sobre su resistencia a la temperatura y al pH. Para ello crearon una cianuro dihidratasa quimérica la cual en su porción C-terminal contenía residuos tanto de la enzima proveniente de *Bacillus pumilus* como de *Pseudomonas stutzeri*. A esta enzima mutada se le realizaron mediciones cinéticas, de estabilidad térmica, resistencia al pH y de actividad. Los autores encontraron que el extremo C-terminal de la proteína es fundamental para la estabilidad térmica de la misma ya que está involucrado en la formación de una interfaz que es crucial para mantener la actividad y la estabilidad de la enzima. Además, encontraron que la enzima quimérica aumenta el rango de pH en el cual la enzima se encuentra activa, logrando retener la actividad enzimática hasta pH 9,5 en el cual generalmente la enzima nativa no presenta actividad(42).

Este mismo grupo en 2016, evaluó el efecto de mutaciones al azar sobre la termo estabilidad, tolerancia al pH y cinéticas de degradación. Para ello se usó la técnica de error-prone PCR con el fin de crear mutantes de cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus*. Se generaron cuatro enzimas (K93R, D172N, A202T y E327K) cada una con una mutación aleatoria diferente. Se encontró que ninguna de las cuatro mutaciones mejoró la tolerancia al pH; dos de las mutaciones (K93R y D172N) aumentaron significativamente la termo estabilidad de la enzima; mientras que la mutación A202T ubicada en la dimerización desestabiliza la proteína y hace que esta pierda su actividad catalítica. Estos resultados confirman la conformación de la enzima propuesta por otros autores(41).

Otros estudios estructurales se han llevado a cabo para buscar residuos claves en el sitio activo de la enzima. Park y colaboradores (2016) identificaron residuos a lo largo de la formación dimérica de la enzima, los cuales pudieran alterar su conformación o la actividad, para ello usaron un escaneo de cisteínas a lo largo de la región de interés, este análisis les permitió encontrar que existen dos secuencias en la interface de formación del dímero que están directamente involucradas con la actividad de la proteína, además que existe dentro de esa misma región un residuo de glutamato el cual está unido por puentes de hidrogeno a un posible sitio activo de lisina(47).

A pesar de los diferentes estudios que se han realizado sobre la enzima, no se han encontrado formas nativas ni mutantes que le permitan a la enzima aumentar

considerablemente su resistencia al pH, a la temperatura y resistencia a metales lo cual impide que esta sea usada en procesos industriales donde las condiciones de pH y concentración de metales suelen ser altas y adversas para el correcto funcionamiento de la enzima.

Uno de los sectores industriales donde existe un mayor potencial para el uso de enzimas que degradan cianuro es la minería, en la cual se realizan piscinas de cianuración para acomplejar metales como oro y plata y facilitar su extracción. Sin embargo estos sistemas retan la capacidad de las enzimas para degradar cianuro por sus pH básicos(10-12), altos contenidos de cianuro (9000-15000 ppm), y presencia de otros metales(6).

El oro puede ser separado de otros metales presentes en la tierra de varias formas, una de ellas es la lixiviación con soluciones alcalinas de cianuro. El oro forma complejos con el cianuro permitiendo su separación de otros metales y posterior recuperación. La solución resultante después de la lixiviación se conoce como solución barren y tiene altas concentraciones de cianuro y otros metales. Normalmente, parte de la solución barren es reutilizada en el proceso de lixiviación y otra parte debe ser tratada para remover el cianuro y posteriormente verterla al ambiente(48) .

En este trabajo se produjo la enzima cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* de forma recombinante en *E.coli*, se evaluó su solubilidad, condiciones de purificación, y se evaluó el uso de células completas de *E.coli* transformadas con la enzima para degradar cianuro en condiciones de pH básicos, altas temperatura, diferentes concentraciones de cianuro y presencia de metales pesados. Además, se retó la enzima en aguas de cianuración minera y se evaluó su capacidad para degradar cianuro en ellas y su viabilidad en el tiempo.

3.2 Metodología.

3.2.1 Células competentes

Se usaron cepas de *E. coli* DH5 α y *E.coli* BL21(DE3) que se encuentran en el stock de cepas del laboratorio de bioquímica de la universidad ICESI. Las células se hicieron competentes mediante un tratamiento con CaCl₂ 0.1M y glicerol. Para ello, una colonia se

inoculó en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación (300 rpm). Un mililitro (1mL) del cultivo se inoculó en 100mL de caldo LB. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación (300rpm) hasta obtener una densidad óptica a 600nm de 0,3. El medio se enfrió por 15 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó por 10 min a 4°C a 6000 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet obtenido se re-suspendió en 70 mL de solución de CaCl₂ 0,1M frío durante 30 min. Las células re-suspendidas se centrifugaron nuevamente y el sobrenadante se removió, el pellet resultante se re-suspendió en 12 mL de CaCl₂ 0,1 M y 15% de glicerol. La suspensión fue dividida en alícuotas de 0,5mL en tubos eppendorf, congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso.

3.2.2 síntesis del gen que codifica por CynD

La secuencia del gen de la enzima cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* codifica por la siguiente secuencia de aminoácidos:

MTSIYPKFRAAAVQAAPIYLNLEASVEKSCSELIDEAASNGAKLVAFPEAFPLPGYPWFAPFIG
HPEYTRKFYHELYKNAVEIPSLAIQKISEAAKRNETYVCISCSEKDGGSLYLAQLWFNPNG
DLIGKHRKMRASVAERLIWGDGSGSMMPVFQTEIGNLGGLMCWEHQVPLDLMAMNAQ
NEQVHVASWPGYFDDEISSRYAIATQTFVLMTSSIYTEEMKEMICLTQEQRDYFETFKS
GHTCIYGPDGEPISDMVPAETEGIAYAEIDVERVIDYKYYIDPAGHYSNQSLSMNFNQQP
TPVVKHLNHQKNEVFTYEDIQYQHGILEEKVHHHHHH

Para la producción recombinante, los codones correspondientes fueron optimizados para la producción de la proteína en *E. coli*, y se adiciono una cola de histidina en el extremo C-terminal para facilitar su purificación. El plásmido fue adquirido comercialmente a la empresa DNA 2.0, el plásmido corresponde a un PD451 con resistencia a kanamicina y promotor lac. El plásmido se nombró BpumC1CynD.

El plásmido BpumC1CynD se replicó en cepas de DH5 α . Para transformar las células se adicionaron 100 μ L de células competentes con 1 μ L de plásmido, a una concentración de 100ng/ μ L, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se dejaron incubar por 5 minutos y posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por 30 segundos. Inmediatamente, se adicionaron 250 μ L de caldo LB y se dejó en un periodo de recuperación por 1 hora a 37°C con agitación constante. Posteriormente se adicionaron 80 μ l del cultivo a una placa con agar LB suplementada con kanamicina (1 μ l/mL) y se incubó por 16 horas a 37°C. Se

realizaron dos controles: el control positivo, *E. coli* DH5 α en una placa con Agar LB, el crecimiento de la cepa indica que las células aún son viables, y la misma cepa en una placa con agar LB y kanamicina, la ausencia de crecimiento demostró que las células sin el plásmido no tienen ninguna resistencia al antibiótico.

El plásmido BpumC1CynD fue obtenido mediante miniprep usando el Kit E.Z.N.A plasmid miniprep Kit, siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.2.3 Producción de la enzima recombinante

La producción de la proteína CynD recombinante se llevó a cabo en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido BpumC1CynD por choque térmico.

Una colonia de células transformadas con el plásmido fue inoculada en 5mL de caldo LB suplementada con 5 μ L de kanamicina 50 mg/mL para una concentración final de 50 μ g/mL. El medio de cultivo fue incubado por 16 h a 37°C con agitación constante (300 rpm). Luego del periodo de crecimiento inicial, 1mL del cultivo fueron inoculados en 100mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 μ g/mL), el medio se incubó a 37°C y una agitación constante de 300 rpm hasta una OD₆₀₀ de 0,5. La producción de proteína se indujo mediante la adición de IPTG 0,4mM y se incubó a una temperatura de 37°C durante 6 horas. Al cabo de este tiempo, el cultivo celular se centrifugó a 5000 rpm en una centrifuga Eppendorf modelo 5804R, usando un rotor de ángulo fijo F-34-6-38. Los pellets celulares se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

Para determinar la expresión de CynD Se tomó 1mL de muestra cada hora empezando desde la hora 0 hasta la hora la hora 6. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue descartado, los pellets obtenidos se guardaron a -20C para análisis posterior. Para analizar el contenido proteico de las alícuotas los pellets bacterianos se re-suspendieron en 100 μ L de buffer Laemmli de carga 1X(43). Las muestras se calentaron a 90 °C durante 5 min y se centrifugaron a 11000rpm por 10 min. 10 a 20 μ L de cada muestra fueron usados para analizar por electroforesis SDS-PAGE usando geles al 15%.

3.2.4 Pruebas de solubilidad.

Para determinar la solubilidad de la enzima CynD producida de forma recombinante en *E.coli* se realizó una prueba de solubilidad usando tres soluciones diferentes: BugBuster protein extraction reagent (Novagen). Buffer 1: Tris pH 8, NaCl 150mM, EDTA 1mM, triton X100 0,1%, Lisozima 0,25mg/mL, MgSO₄ 20mM, Benzonaza 25 unidades. Buffer 2: NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM Imidazol 10mM Benzonaza 25 unidades.

En el caso del BugBuster, se siguieron las instrucciones del proveedor(49).El pellet bacteriano de 1 mL de cultivo fue re-suspendido en 50µL de BugBuster con aproximadamente 2 unidades de benzonaza, se realizó una incubación a temperatura ambiente con agitación por 20 minutos. Posteriormente, se realizó centrifugación a 11000 rpm por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf donde se mezcló por partes iguales con buffer de carga 2X. El pellet se re-suspendió en 100 µL de buffer de carga 1X. Ambas fracciones fueron analizadas por electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida 15%.

Para las demás soluciones de re-suspensión se realizó el mismo protocolo que para BugBuster y las muestras fueron analizadas por electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida 15%.

3.2.5 Optimización de la solubilidad de la enzima

Con el fin de determinar si existe una condición en la cual se mejore la solubilidad de la enzima se evaluó el efecto de la temperatura y la concentración de IPTG en la inducción así como la concentración de dos detergentes y de NaCl en la lisis celular sobre la solubilidad de la enzima(50). Para este último se usó un diseño factorial como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental solubilidad de la enzima

Factor	Niveles	Respuesta
Detergente	Tween, triton X100	Solubilidad de la proteína.
Concentración del detergente (%)	0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2	
Concentración de sal (mM)	100, 250, 400, 500	

Cada uno de los tratamientos fue realizado usando alícuotas de 500 μ L con una concentración de proteína de 4,3 g/mL a pH 7.

Las muestras se trataron de una manera similar a la descrita para el tratamiento con Bugbuster. El análisis de las fracciones soluble e insoluble de las muestras se realizó por electroforesis SDS page en gel de poliacrilamida al 15%.

3.2.6 Purificación

Para la purificación de las proteínas se realizó un diseño unifactorial con dos niveles

Tabla 2. Diseño factorial para la purificación de la proteína

Factor	Niveles	Respuesta
Metodología de purificación	Purificación por cuerpos de inclusión	Proteína purificada
	Purificación por fracción soluble	

La purificación de la fracción soluble se realizó en columna de cromatografía líquida con resina de níquel. El pellet celular fue re-suspendido en buffer lisis con Tris 50mM a pH 8, 150mM NaCl, EDTA 1mM, Triton X-100 0,1%, Lisozima 0,25mg/mL, MgSO₄, 20 mM. y sonificado durante 2 minutos con pulsos constantes de 15 y 10 segundos de relajación. La solución fue centrifugada durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante fue cargado en la columna pre-equilibrada con buffer de lisis con 10 mM imidazol, se realizó un lavado con

buffer tris pH 8 50mM, 300mM NaCl y 20mM de imidazol. La elución de la proteína se realizó con buffer Tris pH 8 50mM, 300mM de NaCl y 250mM de imidazol.

Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis SDS con un gel de poliacrilamida al 15%.

Para la purificación de CynD de los cuerpos de inclusión, el pellet celular obtenido luego de la expresión fue lavado con NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM Imidazol 10mM Benzonaza 25 unidades. El pellet obtenido después del lavado fue re-suspendido en 50mM de buffer tris pH 8, 150 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, desnaturalizado con urea 8 M, y sonificado durante 2 minutos con pulsos constantes de 15 y 10 segundos de relajación. La solución fue centrifugada y el sobrenadante obtenido se cargó en la columna de níquel, el lavado y la elución se realizaron con buffer de tris pH8, 2 mM de NaCl, variando la concentración de imidazol para el lavado desde 20mM hasta 200mM y para la elución se usó una concentración de imidazol de 250mM.

3.2.7 Cuantificación de cianuro

La cuantificación de cianuro se realizó por el método del ácido pícrico (51) en el cual, se mezclaron 500 µL de carbonato de sodio a 0.5 M, 500 µL de la solución de cianuro y 500 µL de ácido pícrico al 1%. Esta solución se calentó en agua en ebullición durante 5 minutos, y la reacción se detuvo con 3,5 mL de agua destilada(51). La coloración de la solución resultante se determinó a 520 nm usando un espectrofotómetro GENESYS 10S (Thermo Scientific).

El contenido de cianuro fue calculado basado en una curva de calibración realizada con las mismas condiciones explicadas anteriormente, usando soluciones con concentraciones de cianuro de 0, 1 5, 10 20 50 y 500ppm.

Para cuantificar la actividad de CynD, el porcentaje de cianuro removido se calculó de acuerdo a la ecuación 1.

$$\% \text{ de cianuro removido} = \frac{(\text{contenido de cianuro inicial} - \text{contenido de cianuro final})}{\text{contenido de cianuro inicial}} \times 100$$

Ecuación 1

El contenido de cianuro inicial se tomó como el de una solución control la cual fue mantenida a las mismas condiciones que aquellas a las que se adicionó enzima. Esta

solución control permite corregir la posible pérdida de cianuro por evaporación como ácido cianhídrico.

3.2.8 Degradación de cianuro por células completas de *E.coli* expresando CynD

Una colonia de células *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformadas con el plásmido BpumC1CynD se inoculó en 5 ml de caldo LB suplementado con kanamicina y se incubó durante 16 horas a 37°C y 300 rpm. El mismo procedimiento sin adición de antibiótico se realizó con una colonia de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar. Este último cultivo serviría como control negativo de degradación de cianuro.

Para la producción de la proteína, se diluyó el cultivo inicial 100 veces en medio fresco con antibiótico. Una vez alcanzado un OD₆₀₀ de 0,5 se realizó inducción a 37° C con IPTG 0,4mM y se dejó crecer durante 3 horas antes de recolectar como pellet celular. A esta cepa se le denomina *E.coli CynD* en el resto del manuscrito.

Los cultivos de *E. coli* BL21(DE3) sin el plásmido se incubaron en las mismas condiciones sin la adición de IPTG ni antibiótico.

Las células se recolectaron mediante centrifugación a 20 °C y 5800 rpm durante 30 minutos, los pellets celulares fueron usados de inmediato o guardados a -80 °C para uso posterior.

Para las pruebas de degradación de cianuro usando células completas *E. coli CynD*, los pellets celulares fueron llevados a un OD₆₀₀ de 1.1.

Se probaron tres soluciones para la re-suspensión de las células: caldo LB, Buffer tris pH 8 (20mM) y buffer tris pH 8 (20mM) con 5% de tolueno y 1mM de EDTA.

. Las pruebas de degradación de cianuro se realizaron en tubos Eppendorf con 20 mM buffer tris pH 8.0, 100 µl de re-suspensión celular, 5 mM de cianuro de sodio y se completó con agua hasta 1 mL. La reacción se llevó a cabo a 25 °C y con agitación constante.

La actividad de las células fue monitoreada durante 1 hora tomando muestras a 0,10,20, 4, 60 min y el contenido de cianuro se midió por el método del ácido pícrico.

Como controles de la degradación enzimática se usaron células de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar, y para monitorear la evaporación de cianuro se realizó el mismo tratamiento a una solución sin adición de células.

Todos los resultados son el promedio de tres ensayos independientes.

3.2.9 Estabilidad de *E. coli CynD* frente al pH

Para evaluar la estabilidad de la enzima en las células completas a diferentes valores de pH se realizó la reacción en un rango de pH entre 8 y 10. Los buffers usados fueron 20mM buffer tris (pH 8), 50mM buffer glicina (pH 9 y 10). La reacción se realizó con 5mM de cianuro y 100 μ L de una solución de células resuspendidas en caldo LB hasta un OD₆₀₀ de 1.1. En un volumen total de 1mL a una temperatura de 25 °C, con agitación constante. La reacción se monitoreo por 1 hora tomando alícuotas cada 0, 10, 20, 40 y 60 min. El cianuro en las soluciones se midió por el método del ácido pícrico. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

Como controles de la reacción se usaron células de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar, y para monitorear la evaporación de cianuro el mismo tratamiento se realizó sin la adición de células.

3.2.10 Estabilidad de *E. coli CynD* frente a la temperatura

La termoestabilidad de la enzima en las células completas fue determinada incubando 1mL de resuspensión celular en un baño seco a 42, 50 y 60 °C por 10 minutos. Posteriormente 100 μ l de las células incubadas se mezclaron con 20mM de buffer tris pH 8 y 5mM de cianuro de sodio y agua hasta un volumen de 1 mL, la reacción se llevó a cabo por 10 min a temperatura ambiente en cabina de extracción con agitación constante.

La concentración final de cianuro fue determinada por el método del ácido pícrico.

3.2.11 Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática de *E. coli CynD*

El efecto de la temperatura de reacción se determinó usando reacciones de 1mL compuestas por 100µl de células resuspendidas en caldo LB hasta un OD₆₀₀ de 1.1, 20mM buffer tris pH 8 y 5mM de cianuro de sodio en un baño seco a 25, 30, 37, 42, 50, 60, 70, 80 °C y 4°C durante 10 min. Después de este tiempo el contenido de cianuro de la solución fue medido por el método del ácido pícrico.

3.2.12 Efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad de *E. coli CynD*

Para medir el efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad de *E.coli CynD* se llevaron a cabo reacciones en un volumen total de 1 mL. La solución de reacción estaba compuesta por 100µl de células resuspendidas en caldo LB hasta un OD₆₀₀ de 1.1, buffer tris 20mM (pH 8.0) y concentraciones de cianuro en un rango de 1, 3, 5 10, 15 y 20 mM. La reacción se llevó a cabo con agitación constante a 25° C por 10 min. La cantidad de cianuro restante en la solución fue determinada por el método del ácido pícrico y comparada con la de un control incubado de manera similar, pero sin adición de células.

3.2.13 Pruebas de actividad de *E.coli-CynD* en aguas residuales de cianuración minera.

Las aguas residuales de cianuración minera, denominadas solución barren, fueron obtenidas de una mina de oro ubicada en el municipio de Buenos aires cauca Colombia, perteneciente a la sociedad minera del sur S.A.S. el 1 de junio del 2017.

El cianuro presente en la solución fue medido por el método del ácido pícrico descrito anteriormente.

La actividad de *E.coli-CynD* en la solución barren fue determinada usando células resuspendidas en caldo LB hasta un OD₆₀₀ de 1.1. Todas Las reacciones fueron llevadas a cabo por 30 minutos, con agitación constante y a temperatura ambiente. Las reacciones

con solución barren sin diluir se llevaron a cabo adicionando 100 µl o 300 µl de células a un volumen de solución barren adecuado para mantener un volumen de reacción de 1 mL.

También se realizaron ensayos con solución barren diluida 1:30 en buffer tris 20mM (pH 8.0). La reacción se llevó a cabo usando 100 µl o 300 µl de resuspensión celular en un volumen total de 1 mL.

Como control se realizó la medición de actividad en solución barren diluida 1:30 en agua, Adicionalmente, la actividad de la enzima fue determinada usando solución barren diluida en agua y 300µL de células, los cuales estaban conformados por 200 µL de células BL21(DE3) sin transformar, y 100 µL de células *E.coli-CynD*.

En todos los casos el contenido de cianuro se determinó por el método del ácido pícrico para la reacción enzimática y para un control sin adición de agente biológico. El porcentaje de remoción de cianuro fue determinado usando estos dos valores y la ecuación 1.

3.2.14 Medición de metales en la solución Barren

La determinación del contenido de metales en la solución barren de la minera se realizó por ICP-MS de acuerdo al método epa 200.8(43) por el laboratorio SGS de la ciudad de Bogotá con número de orden 306040.

Los parámetros del análisis se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de medición de metales en solución

Parametro	Unidad	LC	MB	DUP %RPD	LCS % recovery	Ms % recovery	MSD % RPD
Plata total	mg metal/L	0,007	<0,0070		96%		
Aluminio total	mg metal/L	0,159	<0,1590	2%	99%	103%	0%
Arsenico Total	mg metal/L	0,0045	<0,00450		94%		
Cadmio Total	mg metal/L	0,0048	<0,00480		97%		
Cobalto Total	mg metal/L	0,0046	<0,00460		91%		
Cromo total	mg metal/L	0,0046	<0,00460		96%		
Cobre total	mg metal/L	0,0088	<0,00880		96%		
Hierro total	mg metal/L	0,149	<0,1490	2%	107%	106%	3%
Mercurio total	mg metal/L	0,0006	<0,00060		104%		

Níquel total	mg metal/L	0,0045	<0,00450		103%		
Plomo total	mg metal/L	0,0054	<0,00540		97%		
Estaño total	mg metal/L	0,0099	<0,00990		95%		

3.2.15 Efecto de la presencia de metales sobre la actividad de *E.coli Cynd*.

Se evaluó el efecto de hierro (FeSO₄), mercurio (HgCl₂), níquel (Ni(NO₃)₂) y cobre (CuSO₄) sobre la actividad enzimática de *E.coli Cynd*. Para ello se realizaron reacciones en 1 mL de buffer tris 20mM (pH 8) con 5mM de cianuro de sodio y 100µL de células *E.coli Cynd* resuspendidas en caldo LB hasta un OD₆₀₀ de 1.1. Las reacciones se llevaron a cabo adicionando 0, 1,10 y 200µM de cada una de las sales metálicas. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en agitación constante por 10 min. La actividad relativa en presencia del metal se calculó por comparación con la solución sin metal usando la ecuación 2.

$$\% \text{ Actividad relativa} = (\text{actividad con el metal} / \text{actividad del control}) * 100 \text{ Ecuación 2}$$

3.2.16 Pruebas de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad de las células *E.coli Cynd* en la solución barren se realizó una dilución 1:10 de células, en estado de crecimiento (resuspendidas en buffer LB) y células permeabilizadas (resuspendidas en buffer tris pH 8, 5% de tolueno y 1mM EDTA), en solución barren. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente sin agitación durante 3 días. Cada día, 10µL de la muestra fueron mezclados con 90µL de caldo LB y se realizó siembra en placas con agar LB, con y sin adición de kanamicina, e incubadas a temperatura ambiente. Después de 48 horas de realizada la siembra se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

Como control de crecimiento, se diluyeron células en crecimiento y permeabilizadas en relación 1:10 en caldo LB. Estos cultivos crecieron durante 3 días y se contaron las UFC obtenidas en placa para para cada día cultivo.

La esterilidad del caldo LB y de la solución barren se determinó sembrando 100µL de cada una en placa con agar LB e incubando a 37 grados durante 24 horas.

Además, después de 3 días de incubación en la solución barren las células permeabilizadas fueron incubadas a 37 °C con agitación constante en caldo LB durante 16 horas, posteriormente se tomaron 100µL de solución y se realizó siembra en placa con agar LB. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C, al cabo de este tiempo se realizó el conteo de UFC en las placas.

3.2.17 Análisis estadístico y controles

El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 18, con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Como control de la pérdida de cianuro por evaporación se incluyó una solución en cada uno de los experimentos a la cual no se adicionaron células. La concentración de cianuro medida para esta solución al cabo de la incubación se tomó como la concentración de cianuro total contra la que se comparó la degradación enzimática. Como control de la degradación enzimática contra la biológica que pudiera ser ocasionada por reacciones del cianuro con las proteínas celulares de *E. coli* se realizaron pruebas con la adición de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar y por tanto sin expresar CynD.

Todos los valores reportados presentan la corrección debido a evaporación y la adición de otras proteínas celulares.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Producción de la enzima recombinante

En la figura 14 se observa la prueba de inducción de CynD durante 6 horas. La secuencia genética de CynD predice un polipéptido de 38,2 kDa. Se puede apreciar una banda de aproximadamente este peso molecular que aparece luego de la primera hora luego de la inducción con IPTG. Se encontró que 3 horas después de la inducción la concentración de proteína recombinante se mantiene constante, por lo cual se determinó que este tiempo era óptimo para la producción de la proteína

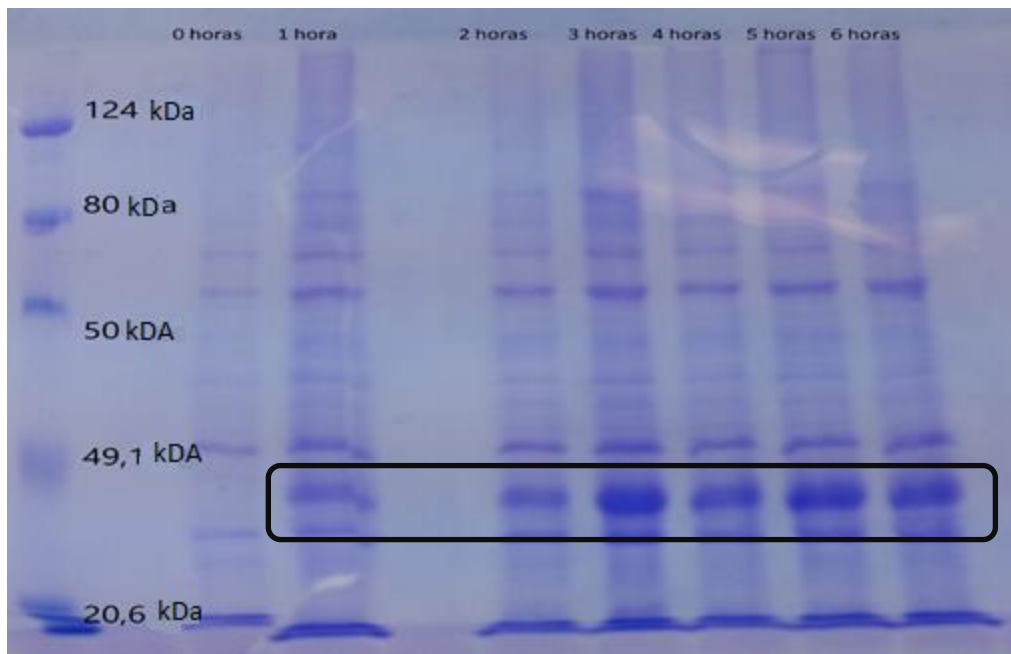


Figura 13 prueba de producción de de CynD a diferentes tiempos de inducción.

Otros autores han reportado que el tiempo óptimo de producción de esta enzima es de 4 horas, sin embargo se reportan temperaturas de incubación inferiores (30°C)(43). Al disminuir la temperatura de incubación el proceso de producción de la proteína es más lento debido a que el metabolismo del organismo se ve afectado disminuyendo la velocidad de las reacciones(52).

3.3.2 Pruebas de solubilidad

BugBuster protein extracción reagent es un reactivo formulado para el rompimiento de las paredes celulares de *E.coli*, este rompimiento permite la salida de las proteína solubles. Debido a su formulación con diferentes tipos de detergentes, este reactivo permite realizar pruebas de solubilidad a pequeña escala sin usar otros elementos como sonicadores o prensas francesas(43) .

Al realizar la prueba de solubilidad con BugBuster se observó que CynD no se enriquecía en la fracción soluble del lisado celular, sin embargo se quiso probar si este mismo resultado se obtenía con otros buffer con diferente composición y adición de lisozima la cual es conocida por su capacidad para degradar la pared bacteriana debido al

rompimiento de enlaces glucosídicos del peptidoglicano(43). Por lo cual se realizó una prueba de solubilidad con 3 Buffer diferentes (figura 15).

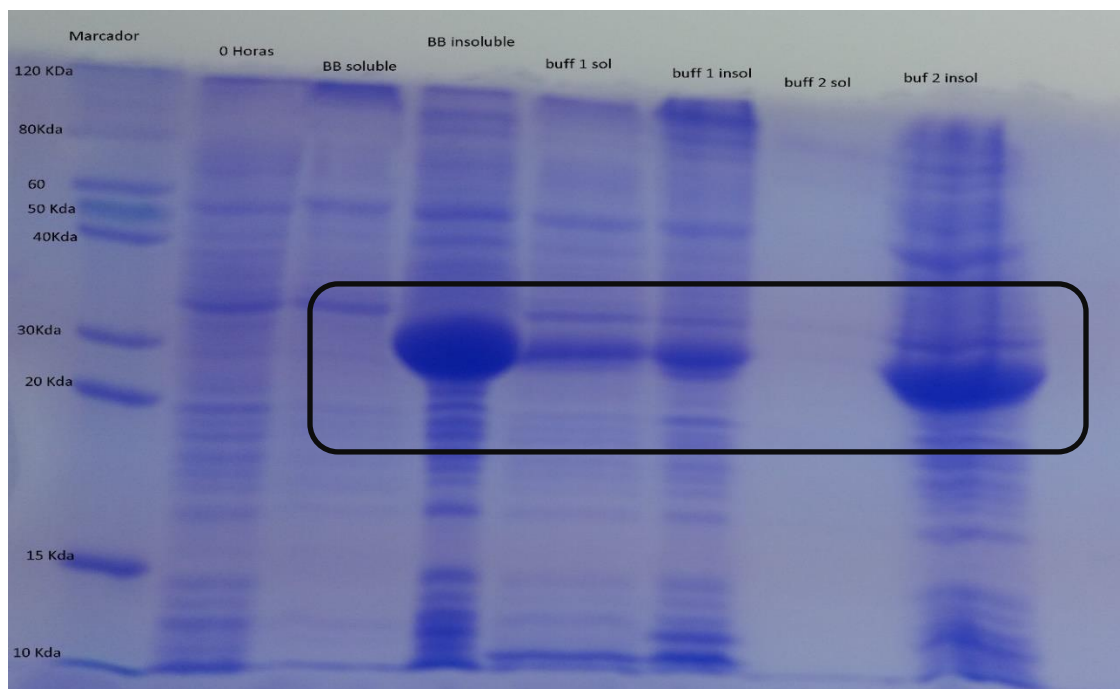


Figura 14 prueba de solubilidad con diferentes buffers: BB: Bug buster Buff 1: Tris pH 8, NaCl 150mM, EDTA 1mM, triton X100 0,1%, Lisozima 0,25mg/mL, MgSO₄ 20mM, Benzonaza 25 unidades. Buff 2: NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM Imidazol 10mM Benzonaza 25 unidades. Sol: fracción soluble. Insol: fracción insoluble

Se encontró que el buffer 1 logra solubilizar parcialmente la enzima, sin embargo, gran parte de la misma se encuentra agregadas junto con las membranas, estas formaciones se conocen como cuerpos de inclusión y son comunes en procedimientos en los cuales se producen proteínas de forma recombinante en *E.coli*, este tipo de comportamientos se debe a que la célula tiene respuesta de estrés metabólico frente a este tipo de procedimiento(53). En el caso de CynD, otros autores ya han reportado que la enzima presenta insolubilidad lo que limita su recuperación(43).

Las condiciones de temperatura y concentración de IPTG se variaron con el fin de aumentar la solubilidad de la enzima, varios estudios han demostrado que la disminución de la temperatura de inducción de las proteínas disminuye la insolubilidad de las mismas, esto se debe a que a medida que se aumenta la temperatura se favorece las interacciones hidrofóbicas las cuales son las responsables de las reacciones de agregación(53). En este

estudio se encontró que la disminución de la temperatura no tuvo efecto sobre la solubilidad de la enzima, ya que al disminuir la temperatura de inducción no se observó un aumento en la forma soluble de CynD. La concentración de IPTG se varió entre 1 mM y 0,4 mM, se ha demostrado que altas concentraciones de IPTG tienen un efecto adverso en los sistemas de expresión de *E.coli* ya que disminuyen el rendimiento de la enzima y aumenta su insolubilidad(54). El IPTG tiene un efecto sobre el sistema ya que durante la fase previa a la inducción el promotor lac se encuentra en un estado de represión, con la adición del análogo IPTG, el represor se libera dejando libre el promotor para iniciar la expresión de la proteína. Sin embargo, el exceso de IPTG tiene un efecto adverso ya que la célula tiende a desperdiciar recursos lo cual disminuye su tasa de crecimiento y aumenta las reacciones de estrés(43). Para el caso de CynD no se encontró que la disminución de IPTG tuviera un efecto positivo en la solubilidad de la enzima, sin embargo, debido a que a una concentración de IPTG de 0,4mM se logró expresar la proteína correctamente se escogió esta concentración para el resto del estudio.

La solubilización de las proteínas recombinantes es uno de los pasos más críticos durante la expresión por lo cual se deben buscar diferentes alternativas que permitan la recuperación de la fracción soluble de la enzima. Como estrategia alterna a la disminución de la temperatura y la concentración de IPTG, se usaron diferentes tipos de detergentes para probar su efecto sobre la solubilización de CynD. Los detergentes actúan sobre la membrana lipídica extrayendo las proteínas de membrana hacia un ambiente acuoso, el efecto de los detergentes consiste en la destrucción de la capa lipídica incorporando tanto los lípidos como las proteínas en micelas del detergente. Cuando la solubilización es eficiente, se logran romper las interacciones lípido-proteína y proteína -proteína lo que permite la separación y posterior solubilización de las mismas(50).

Para evaluar la capacidad de dos detergentes para solubilizar la enzima CynD se realizaron pruebas con diferentes condiciones y se encontró que los detergentes probados (Tween 20 y Tritón X-100) no lograron solubilizar la enzima por lo cual esta metodología fue descartada (datos no mostrados).

3.3.3 Purificación

Una vez establecido el tiempo de crecimiento luego de inducción óptimo para CynD se procedió a intentar realizar la purificación. Se propuso aprovechar la cola de histidina adicionada al gen y realizar una purificación por cromatografía líquida con resina de níquel de la fracción soluble que se obtenía al usar el buffer 1. Para este fin el pellet celular fue tratado con este buffer y la fracción soluble se separó de la insoluble. La fracción soluble se pasó por la columna y se realizó electroforesis SDS_PAGE para evaluar el proceso de purificación, (figura 16).

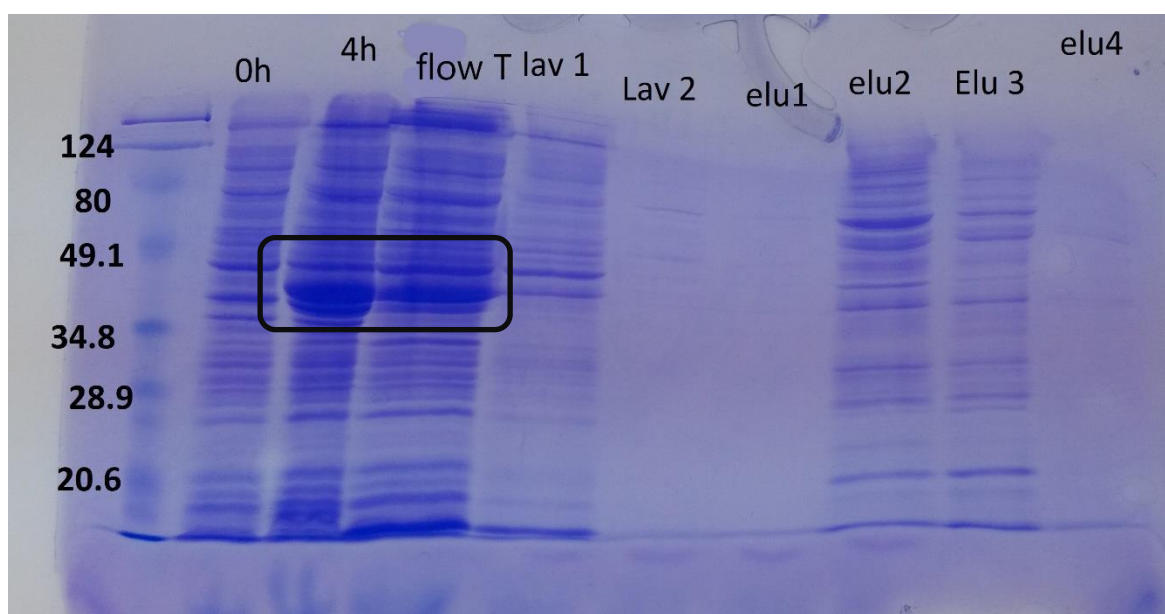


Figura 15. Gel de electroforesis SDS-PAGE para purificación de la fracción soluble de CynD

A pesar de que el buffer 1 permite recuperar aproximadamente un 40% de la proteína recombinante en la fracción soluble (figura 15), Al intentar realizar la purificación de la fracción soluble de la proteína se observó que esta parece no unirse a la resina de níquel provocando que la proteína salga de la columna y no se logre hacer una purificación. Esto se puede apreciar por la banda que aparece en el pozo correspondiente a Flow T en el gel de la figura 16. Acorde con esta hipótesis no se observa ninguna banda en la elución de la columna, correspondiente al peso de CynD (38,2 kDa). Las bandas inespecíficas que se observan en la elución corresponden a la unión no específica y débil de proteínas de *E.coli*

que en un proceso de purificación efectivo hubieran sido fácilmente desplazadas por la enzima con la cola de histidina.

Los sistemas de purificación en los cuales se utiliza cola de histidina suelen ser eficaces ya que este aminoácido tiene la capacidad de ligarse a iones metálicos inmovilizados como el níquel. A medida que se aumenta la concentración de imidazol esta interacción se ve debilitada permitiendo que la proteína eluya(55). Los resultados obtenidos suponen que la cola de histidina agregada a la proteína no está interactuando de manera correcta con la resina de níquel impidiendo la purificación de la proteína, estos comportamientos son propios de situaciones en donde la cola de histidina no se encuentra suficientemente expuesta. En estos casos una alternativa es realizar una desnaturalización de la proteína agregando urea y purificar la proteína desnaturalizada para luego intentar renaturalizarla(56).

Se intentó purificar la proteína desnaturalizada de cuerpos de inclusión, para esto se usó buffer con adición de urea (8M), al pellet celular y se siguieron protocolos reportados en la literatura. No obstante, este procedimiento no mostró resultados positivos y todo parece indicar que la proteína seguía agregada dentro de los cuerpos de inclusión o la cola de histidina no estaba disponible para interactuar con el níquel. Como una estrategia alternativa se procedió a desnaturalizar, adicionando urea 8 M, a la fracción soluble de la proteína obtenida con el buffer 1 y posteriormente, intentar purificar la proteína desnaturalizada con la columna de níquel. Para intentar evitar la acumulación de proteínas en la resina se realizaron lavados con gradiente de imidazol y concentraciones de NaCl elevadas (2 M), los resultados se muestran en la figura 17(56).

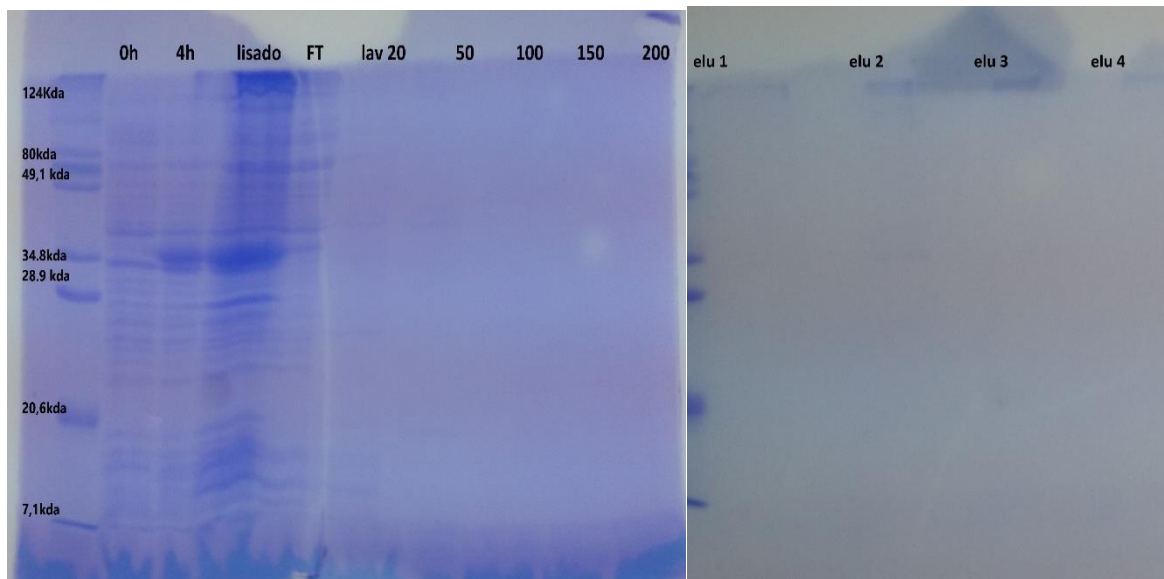


Figura 16 Gel de electroforesis SDS-PAGE para la purificación de la fracción soluble de CynD obtenida con el buffer 1 desnaturalizada con urea

La desnaturalización de la proteína soluble obtenida con buffer 1 permitió la interacción entre la proteína y la resina. Esto se observa en la desaparición de la banda correspondiente en el pozo FT del gel mostrado en la Figura 17. Esto supone que se logró exponer la cola de histidina de CynD lo que le permite unirse a la resina de níquel para su purificación. Sin embargo, la purificación no presentó rendimientos altos (bandas imperceptibles en la imagen) lo que supone que este procedimiento a pesar de lograr purificar la enzima requiere de grandes cantidades de cultivo para obtener una cantidad razonable de la enzima. Además, se requeriría de un proceso de renaturalización de la proteína desnaturalizada esperando recuperar su actividad.

Uno de los inconvenientes más comunes en el uso de bacterias para la producción de proteínas recombinantes es la agregación en cuerpos de inclusión, este comportamiento depende directamente de cada proteína(56) y sus causas pueden ser variadas. Sin embargo, generalmente se debe al estrés térmico al que se somete la célula durante la producción de proteína, presencia de intermediarios agregados dentro del sistema, y proteínas parcialmente plegadas. Esta condición puede ser reversible, es decir, la proteína puede ser recuperada de los cuerpos de inclusión(57), pero estos procesos además de generar altos costos debido a que la proteína debe ser nuevamente plegada pueden causar pérdidas de actividad y de selectividad a las enzimas(52,56,57).

Debido a todos los inconvenientes encontrados para la obtención de la enzima CynD purificada, se decidió realizar pruebas de degradación de cianuro con células completas. Se ha reportado que estos procesos generan menores costos, además estas enzimas muestran una mayor resistencia a condiciones adversas como pH y temperatura, debido a la protección que brindan las membranas celulares (58).

3.3.4 Degradación de cianuro por células completas de *E.coli* que expresan CynD

El uso de células completas como biocatalizadores ha sido ampliamente estudiado ya que estas a diferencia de las enzimas purificadas tienen la capacidad de regenerar cofactores y proteger las enzimas de condiciones adversas(58). En general, las soluciones resultantes de la cianuración del oro representan un reto para el uso de enzimas o microorganismos para su biorremediación por el alto contenido de cianuro, lo que las hace tóxicas para las células. Además, estas soluciones son mantenidas a valores altos de pH requeridos para evitar la formación del muy volátil y tóxico ácido cianhídrico(1) .

Debido a la complejidad para obtener la enzima CynD de forma pura, y su susceptibilidad a condiciones extremas, se evaluó el comportamiento de la enzima cuando se encuentra expresada dentro de las células de *E.coli*. Con el fin de determinar las condiciones de resuspensión óptimas que permitieran a las células de *E.coli* BI21(DE3) que expresan CynD remover la mayor cantidad de cianuro, se evaluaron 3 tipos de soluciones de resuspensión: buffer LB, el cual por sus condiciones le permite a la célula tener los nutrientes necesarios para su crecimiento (Growing cells), Buffer tris 20 mM (pH 8.0) el cual tiene las condiciones para que la célula se mantenga en estado estable sin crecimiento (Resting cells) y buffer tris 20 mM (pH 8) con 5% de tolueno y 1mM de EDTA, el tolueno en este último buffer permeabiliza la membrana celular (Permeabilized cells)(59).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. Se encontró que para todas las soluciones de resuspensión celular, después de 10 min de tratamiento se elimina aproximadamente el 99% del cianuro presente en la solución. El análisis estadístico demostró que no existe diferencia significativa en la capacidad de remoción de cianuro para las tres soluciones de resuspensión celular. Además, se encontró que las células de

E.coli BI21(DE3) que no expresan la proteína CynD en cualquiera de las tres condiciones de re-suspensión no logran remover el cianuro presente en la solución, por lo cual el porcentaje de cianuro removido por *E.coli* ($0,42\pm 0,7\%$) no tiene diferencia estadísticamente significativa con el cianuro removido por evaporación en la solución control sin adición de ningún tipo de células ($0,56\pm 1,1$). Estos resultados demuestran que el estado del cultivo celular (growing o resting) y de la membrana no tiene un efecto significativo sobre la capacidad de la enzima CynD que está dentro de la célula para degradar cianuro.

Tabla 4. Efecto de la solución de re-suspensión celular sobre la actividad de *E.coli* CynD en soluciones de cianuro de sodio a una concentración de 5mM

Solución de re-suspensión del pellet celular de <i>E.coli</i> CynD	% de CN- removido
Caldo Lb	99,07±0,8 ^a
Buffer tris pH 8	98,48±0,7 ^a
buffer tris pH 8 con 5% tolueno y 1mM EDTA	98,63±1,3 ^a

*Valores que comparten letra son estadísticamente iguales.

En contraste con la eficiencia del uso de células completas que expresan CynD para la remoción de cianuro, estudios realizados con un consorcio de bacterias del género *Bacillus* sp mostraron una máxima eficiencia de degradación del 60% de cianuro en un periodo de 8 días de tratamiento para aguas con concentraciones iniciales de 200ppm (4mM) de cianuro(60). Por otra parte, en estudios realizados con *Pseudomonas fluorescens* se encontró que este microorganismo es capaz de degradar cianuro en solución sin embargo esta respuesta metabólica tarda aproximadamente 7 días y solo se observa degradación significativa del cianuro a partir del día 2 para concentraciones iniciales de cianuro de 500 ppm(61). Por el contrario, *E. coli* CynD degrada aproximadamente el 100% de una solución con concentración inicial de 500 ppm (10mM) de cianuro en 10 minutos, lo que señala la potencialidad de esta metodología para la remoción de cianuro en aguas residuales industriales.

Los resultados encontrados demuestran que usando enzimas se logra un alto porcentaje de remoción de cianuro en cortos tiempos de proceso, comparado con lo reportado por otros autores para consorcios de bacterias y otros tipos de microorganismos(60,61) . El corto tiempo de reacción que se presenta para llegar a porcentajes de degradación

cercanos al 100%, puede ser el motivo por el cual no exista una influencia directa del estado de la célula, por lo cual no es necesario la adición de nutrientes para que la reacción sea eficiente.

Los resultados encontrados en esta investigación demuestran que existe factibilidad en el uso de células *E.coli CynD* en estado vegetativo (resting cells). Esto en procesos industriales presenta ventajas frente al uso de células en crecimiento ya que disminuye los costos y facilita el proceso dividiéndolo en dos etapas: 1) la formación de biomasa y 2) la biocatálisis. Esta separación facilita en términos operativos y de costos la última fase, ya que no es necesario que se dé en condiciones en la cual la célula se encuentra en su crecimiento óptimo (59).

3.3.5 Estabilidad de *E.coli CynD* frente al pH

Debido a la volatilidad del ácido cianhídrico los procesos industriales con cianuro se realizan a valores de pH básicos (pH11-12) donde gran cantidad de microorganismos no son viables y sus enzimas pierden actividad. Con el fin de determinar el efecto del pH de la solución sobre la actividad de *E.coli-CynD* se evaluó la capacidad de las células completas para degradar cianuro a pH 9 y 10.

La figura 15 muestra el efecto del pH sobre la capacidad de degradación de cianuro de *E. coli CynD*. Se encontró que la enzima tiene una actividad óptima a pH 8 logrando una degradación máxima del $98\% \pm 0,16\%$ a los 10min. A medida que el pH aumenta, la actividad de la enzima se ve afectada, a pH 9 se logra un porcentaje de remoción máximo del $97\% \pm 0,16\%$ a los 20 min, a partir de este tiempo no existen diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento a pH 8 a los 10 min, es decir que a estos tiempos (10 min a pH 8 y 20 min a pH 9) se logra remover la totalidad del cianuro presente en la solución. A pH 10 disminuye la actividad de la enzima. En este caso después de 40min de tratamiento el máximo de degradación fue del $78\% \pm 3\%$. Otros experimentos mostraron que hasta 3 horas de tratamiento a este pH el porcentaje de degradación no aumenta, lo que sugiere que la enzima ya no es activa (datos no mostrados).

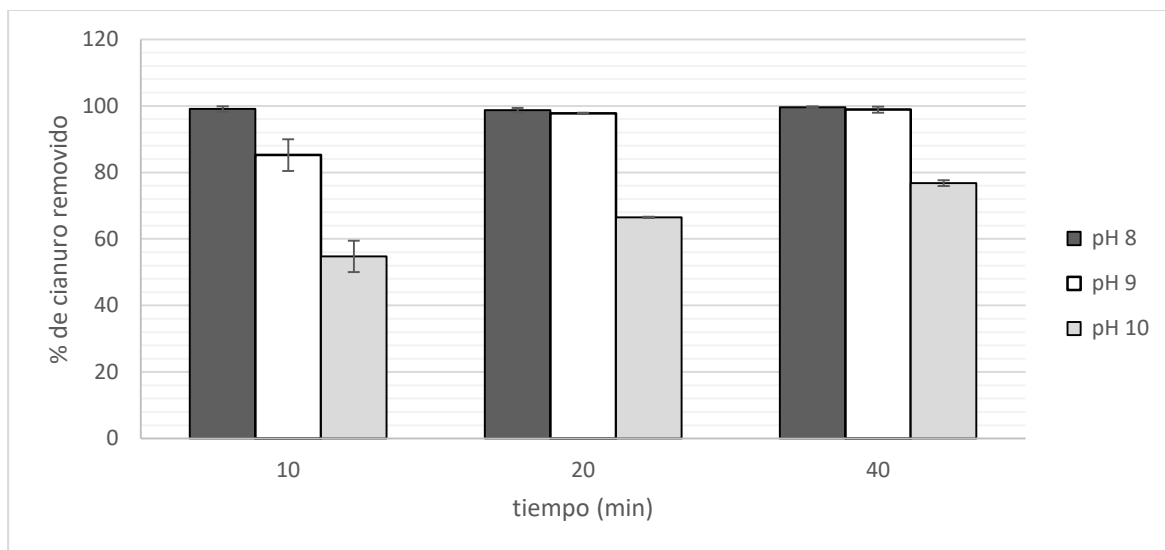


Figura 17 . Efecto del pH sobre el porcentaje de remoción de cianuro por *E.coli* CynD.

Los resultados obtenidos a pH 8 concuerdan con los reportados por otros autores donde se comprueba que la enzima presenta una actividad máxima a pH entre 7 y 8(40–42), sin embargo estos mismos trabajos demuestran que a medida que se aumenta el pH a 9 la enzima pierde toda su actividad(41). Otros trabajos muestran que aún después de evolución dirigida por mutaciones aleatorias tampoco se logra aumentar la actividad de la enzima a pH superiores a 9(40). Estos resultados reflejan la importancia de la membrana celular en los procesos de degradación de cianuro con enzimas altamente sensibles al pH como la cianuro dihidratasa, la cual al encontrarse protegida por la membrana celular es capaz de retener su actividad a medida que se expone a pH más básicos. Estudios previos muestran que la enzima CynD expuesta a pH 9 muestra espirales desnaturalizadas lo cual puede ser el causante de su pérdida de actividad, y esta desnaturalización se hace más evidente a medida que se aumenta el pH(40).

3.3.6 Termoestabilidad de *E. coli* CynD

La enzima CynD es sensible al aumento de temperatura lo que ocasiona pérdida de actividad al exponerse a temperaturas mayores a 42 grados(40–42). Con el fin de determinar si este mismo comportamiento se presenta para el uso de células de *E. coli* CynD, se evaluó el efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de la enzima dentro de la célula. Para ello las células se encubaron durante 10 minutos a 42, 50 y 60 °C y se evaluó la remoción de cianuro después de este periodo de incubación.

El efecto de la temperatura de incubación de las células sobre la actividad de *E. coli CynD* se presenta en la tabla 5. Aquí se observa que la actividad se ve disminuida a medida que aumenta la temperatura de incubación de esta. No obstante, aun luego de una incubación a 60 °C la enzima retiene 83% de actividad. Estos resultados contrastan con otros estudios realizados con CynD purificada que muestran que al incubar la enzima a 42 °C durante 1 hora se tiende a perder su actividad catalítica(40–42), La diferencia con los resultados obtenidos en esta investigación se puede atribuir a que la membrana celular actúa como protectora de la célula evitando la desnaturalización de la misma, sin embargo, a medida que se aumenta la temperatura la pared celular se ve afectada impidiendo que esta proteja a la enzima del daño térmico.

Tabla 5. Efecto de la temperatura de incubación de las células *E. coli CynD* sobre el porcentaje de cianuro removido

Temperatura °C	Porcentaje de cianuro removido*
42	94,3±2,5 ^a
50	91,9±1,7 ^{ab}
60	83,3±3,4 ^b

*Valores que comparten letra son estadísticamente iguales

3.3.7 Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática de *E.coli CynD*

Las enzimas tienen a aumentar o disminuir su actividad debido a la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción, generalmente en los procesos mineros las aguas de cianuración se encuentran abiertas al ambiente en grandes piscinas en donde el control de la temperatura es difícil, por lo cual se evaluó el efecto de la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción sobre la actividad de *E.coli-CynD*.

La temperatura de la reacción tiene un efecto significativo sobre el porcentaje de cianuro removido por la enzima, se observó que la actividad óptima de la enzima se encuentra entre los 37 y 50 °C, a temperaturas más bajas la actividad de la enzima disminuye, sin embargo, la disminución más significativa se observa a temperaturas superiores. Se

encontró que a 80 °C la remoción del cianuro se debe mayormente a evaporación (Tabla 6).

A medida que se aumenta la temperatura de la reacción las enzimas aumentan su actividad llegando a un equilibrio entre temperatura óptima y actividad máxima, sin embargo, a medida que la temperatura sobrepasa ciertos límites el efecto es contrario y se presenta una pérdida de actividad debido a una desnaturalización de la enzima por efecto del calor(62,63) .

Tabla 6. Efecto de la temperatura de reacción sobre el porcentaje de cianuro removido por *E.coli CynD*.

Temperatura	Porcentaje de cianuro removido
4	65,9±0,1 ^d
25	79,6±3,5 ^{bc}
30	73,4±6,5 ^c
37	84,6±2,6 ^a
42	91,0±0,95 ^a
50	91,9±0,5 ^a
60	27,1±2,7 ^e
70	22,5±4,9 ^e
80	3,5±2,4 ^e

*Valores que comparten letra son estadísticamente iguales

El porcentaje de actividad alcanzado a 50 °C es superior al reportado por otros autores en la literatura donde se muestra que a esta temperatura la enzima pierde su actividad(64) estos resultados resaltan la capacidad de las células completas para mantener la integridad de las enzimas, contrario a lo reportado para la enzima purificada la cual es altamente sensible a desnaturalización por temperaturas superiores a los 42 °C(65).

3.3.8 Efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad enzimática

En la tabla 7 se muestra el efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad de *E.coli CynD*. En este caso se encontró que hasta 20mM no existe un punto de saturación tal que la enzima pierda su actividad, sin embargo, sí se aprecia una leve disminución en los porcentajes de remoción de cianuro a medida que aumenta la concentración de este.

Tabla 7. Efecto de la concentración de cianuro sobre la actividad de *E.coli-CynD*

Concentración de CN ⁻ (mM)	Porcentaje de cianuro removido
1	98,9±2,1 ^{ab}
3	96,3±0,7 ^b
5	99,9±0,1 ^a
10	98,6±0,1 ^{ab}
15	93,9±0,8 ^{cd}
20	91,7±0,4 ^d

*Valores que comparten letra son estadísticamente iguales.

Otros estudios realizados con la enzima cianuro dihidratasa purificada muestran que a concentraciones de 20mM de cianuro y pH 8 la actividad enzimática se disminuye hasta en un 50%(60), estos resultados son interesantes y no es claro a qué se debe el aumento de la tolerancia de *CynD* intracelular a la concentración de cianuro. Una hipótesis es que la concentración efectiva de cianuro al interior de la célula nunca llega a los valores inhibitorios observados para la enzima purificada. Esta característica le permitiría a *E.coli-CynD* mantenerse activa en condiciones ambientales complejas que se asemejan más a las encontradas en procesos industriales como la minería de oro donde se usan concentraciones elevadas de cianuro(40). Por ejemplo, la concentración de cianuro libre determinada para la muestra de solución barren con la que se trabajó en esta investigación fue de 14937 ±100 ppm (300 mM).

3.3.9 Pruebas de actividad de *E.coli CynD* en aguas residuales de cianuración minera

Con el fin de evaluar la capacidad de *E. coli CynD* para degradar cianuro en efluentes mineros, se retó el sistema de células completas a la solución barren de una compañía minera colombiana. Las reacciones se llevaron a cabo a pequeña escala en el laboratorio. Se encontró que cuando *E. coli CynD* es adicionada directamente a la solución barren no hay una degradación apreciable. Por otro lado, si la solución barren se diluye, se logra aumentar la degradación del cianuro a un 10%. No obstante, parece existir un componente en la misma que inhibe la acción de la enzima. Sin embargo, al aumentar la proporción de células en la reacción se logra remover hasta el 70% del cianuro presente en la solución barren (figura 19).

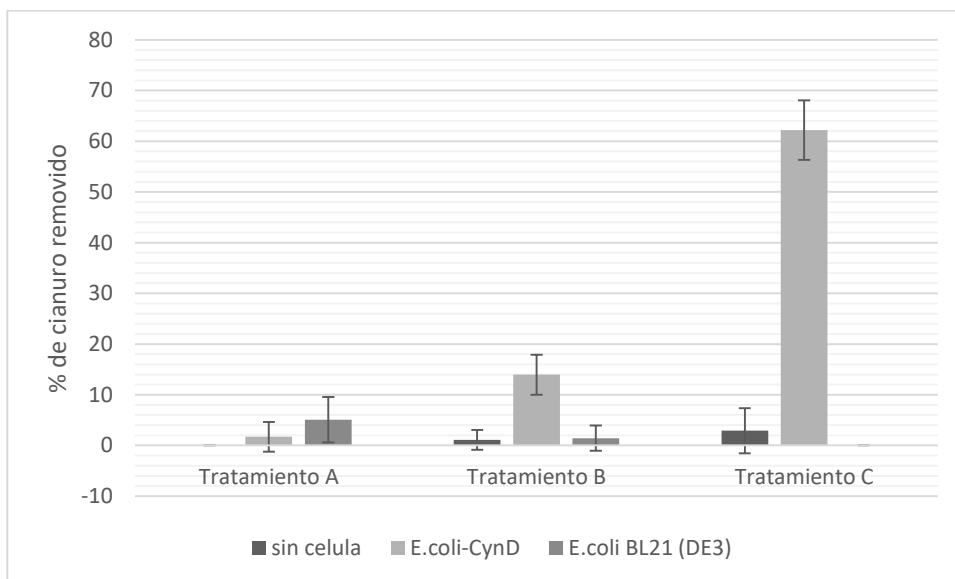


Figura 18. Actividad enzimática de *E.coli CynD* en aguas de cianuración minera. Tratamiento A: 100 μ L de resuspension celular en 1mL solución barren. Tratamiento B: 100 μ L de resuspension celular en 1 mL solución barren diluida 1:30 con agua. Tratamiento C: 300 μ L de resuspension celular en 1mL de solución barren diluida 1:30. Todas las reacciones se llevaron a cabo por 30min.

Los resultados son congruentes con la hipótesis que existe un elemento en la solución barren que inhibe la acción de la enzima. No obstante, al aumentar la concentración de células que contienen la enzima, la inhibición disminuye y se observa actividad enzimática,

logrando hasta un 70% de remoción de cianuro en 30 min. Estos resultados nos llevan a formular la hipótesis que existe un componente en las células que se une con el agente inhibidor, de esta forma al aumentar la cantidad de células una porción se inactiva mientras otra permanece activa y logra degradar el cianuro de la solución.

Para determinar si es algún componente normal de *E.coli* el que ejerce el efecto al unirse al agente inhibidor, se realizó un análisis de actividad usando 300µL de resuspensión celular. Esta solución celular estaba compuesta por 200µL de células *E. coli* BI21(DE3), sin transformar y por tanto sin expresar CynD, y 100 µL de células de *E. coli* CynD. Este experimento mostró que el efecto protector de la inhibición no estaba presente cuando las células adicionadas no expresaban CynD. Este resultado nos lleva a proponer que es la propia enzima CynD la cual interacciona con el agente inhibidor, por lo cual al aumentar la cantidad de enzima agregada el agente inhibidor se acompleja con una parte de la enzima dejando otra porción libre para actuar sobre el cianuro.

Las enzimas del grupo de las nitrilasas como la cianuro dihidratasa contienen varios residuos como ácido glutámico y cisteína de la triada catalítica, los cuales podrían actuar como sitio de unión para metales. La solución proveniente de la minera tiene un alto contenido de metales y es conocido que la unión de iones metálicos al centro activo de la enzima produce inhibición(37,39). Si esta hipótesis es correcta, el agente inhibidor puede afectar el centro activo de la enzima y debido a esto no hay actividad cuando la concentración de enzima es menor a la concentración del inhibidor. Igualmente, solo al aumentar la cantidad de *E.coli* CynD se logra complejar el inhibidor y una parte de enzima no inhibida se mantiene activa.

3.3.10 Efecto de metales en solución sobre la actividad de *E.coli* CynD.

El análisis de concentración de metales en la solución barren se muestra en la tabla 8. De los metales analizados se pudieron determinar con exactitud las concentraciones de arsénico, hierro, mercurio y níquel. Las concentraciones de los demás metales analizados se encuentran por debajo de los límites de detección del método.

Tabla 8. Concentración de metales totales en la solución barren determinado mediante ICP-MS

Metal	ppm	Límite de detección del método
Aluminio	<0,159	0,159
Arsénico	0,005	0,0045
Cadmio	<0,0048	0,0048
Cobalto	<0,0046	0,0046
Cobre	<0,0088	0,0088
Cromo	<0,0046	0,0046
Estaño	<0,0099	0,0099
Hierro	0,207	0,149
Mercurio	0,05	0,0006
Níquel	0,026	0,0045
Plata	<0,007	0,007
Plomo	<0,0054	0,0054

Los resultados de estos análisis muestran que además de las altas concentraciones de cianuro en la solución, las concentraciones de metales y elevado pH convierten este tipo de soluciones en medios complejos para la biocatálisis ya que estos factores que pueden afectar la actividad de una enzima y suponen un gran reto para la viabilidad de todos los seres vivos incluidos los microorganismos.

Reportes previos han mostrado que metales como el plomo, el zinc y el cadmio disminuyen la actividad de la enzima CynD purificada(64). Se evaluó el efecto de los metales predominantes en la solución barren sobre la actividad de *E.coli* CynD. Para ello se midió la degradación de cianuro en soluciones con concentraciones incrementales de hierro, mercurio, níquel y cobre. Se encontró que el hierro y el níquel no inhiben significativamente a *E.coli* CynD, mientras el mercurio y el cobre, a concentraciones de 200ppm, logran disminuir la actividad de la enzima contenida en *E.coli* (Figura 20).

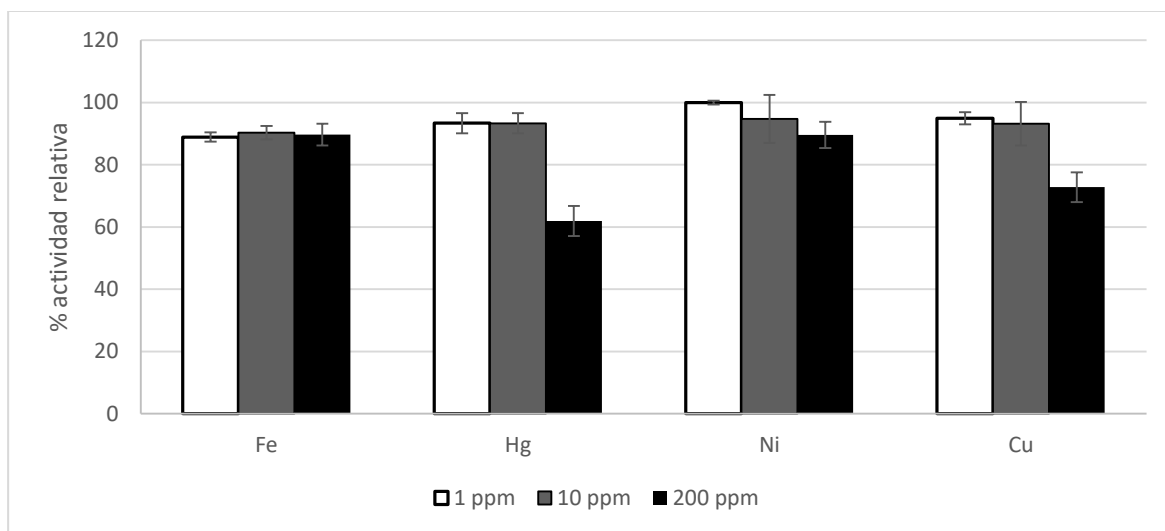


Figura 19 Efecto de la presencia de metales sobre la actividad relativa de *E.coli* CynD. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 1mL, buffer 20 mM Tris (pH 8), 5mM, NaCN, y temperatura ambiente.

Otros autores han evaluado la resistencia de la enzima CynD de *bacillus pumilus* a la presencia de metales. En estos reportes, al igual que en este estudio, se encontró que el hierro no inhibe la enzima. Por el contrario, el mercurio disminuye más del 90% de la actividad de la enzima purificada(64). En contraste, no existen reportes previos que evalúen el efecto del cobre sobre la actividad de CynD. Haciendo un paralelo con lo observado en este estudio para el mercurio, la inhibición del cobre a la enzima purificada puede ser sustancialmente mayor que la observada para *E.coli* CynD.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que a pesar de que existe una pérdida en actividad en presencia de mercurio, esta solo es del 40%. Esto contrasta con la inhibición de más del 90% observada para la enzima purificada. Por lo cual se puede

concluir que el uso de células completas confiere protección a la enzima y esta cualidad permitiría que esta sea activa en condiciones en las cuales la enzima purificada no lo es. El alto contenido de metales, encontrado en aguas residuales de minería, es un reto para el uso de CynD purificada en estrategias de biorremediación, por el contrario, las células completas podrían mostrar un mejor desempeño para biodegradar cianuro en muestras complejas.

3.3.11 Pruebas de viabilidad

Las células de *E.coli CynD* son organismos genéticamente modificados y a pesar de su alta actividad, su uso a nivel industrial podría ser restringido ya que la liberación de este tipo de microorganismos está restringida y controlada. Por lo cual se realizó una prueba de viabilidad para evaluar si *E.coli-CynD* eran viables al entrar en contacto con la solución barren o si por el contrario las condiciones de dicha solución hacían que la célula no viviera por mucho tiempo.

Para ello se evaluó la viabilidad de células *E. coli CynD* incubadas en la solución barren. Esto se llevó a cabo por conteo de unidades formadoras de colonia en placa. Se probaron células resuspendidas en medio LB como células a las cuales se les permeabilizo su membrana con tolueno. Los resultados fueron comparados con un control de células mantenidas en paralelo en caldo LB. Este control permite determinar si algún cambio en el conteo se debe al efecto de la solución barren o al tiempo del proceso.

Se encontró que desde el día 0 el conteo de células en la solución barren disminuye con respecto al control (cultivo en caldo LB) y que esta disminución se sigue dando durante los tres días en que se evaluó la viabilidad celular. Además, Las células con membrana sin permeabilizar presentan un conteo mayor que las células permeabilizadas. Para estas últimas después de 3 días en la solución barren su conteo en placa es 0 como se muestra en la figura 21. Además, se encontró que no existen diferencias significativas en el crecimiento en agar con o sin kanamicina por lo cual se puede afirmar que las células que están presentes en la solución aun contienen el plásmido y por lo tanto su característica resistencia a la kanamicina.

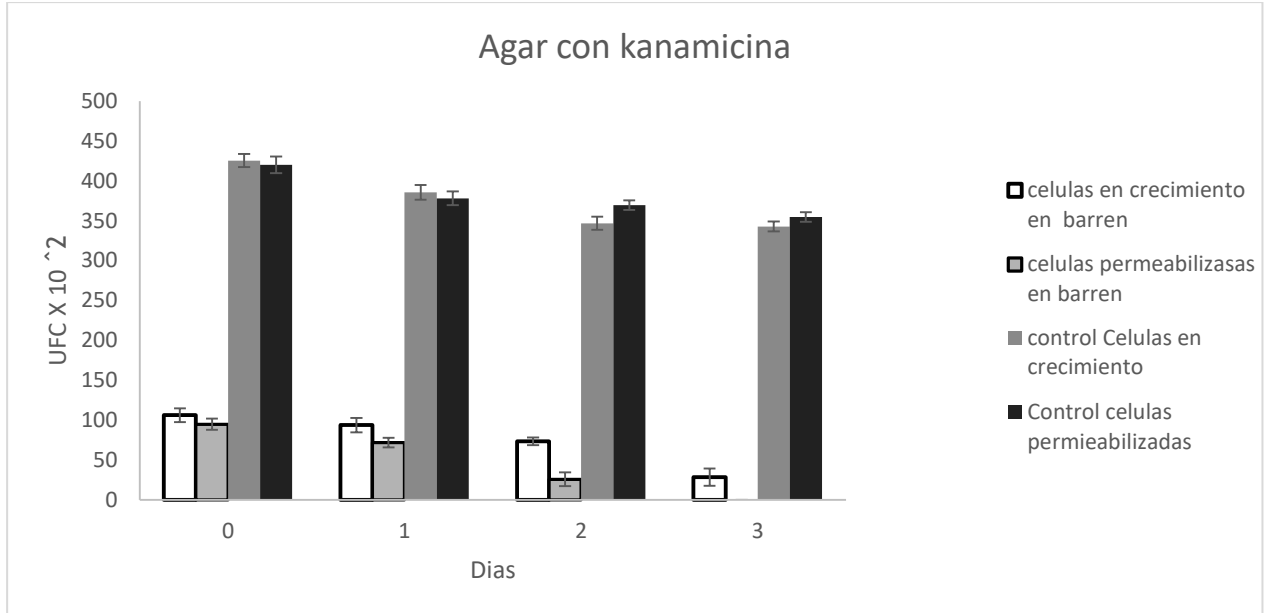


Figura 20 Conteo de unidades formadoras de colonia en placas luego de sembrar células *E.coli CynD* en estado de crecimiento (Lb) y permeabilizadas (Tolueno) incubadas en solución barren o caldo LB (control).

Con el objetivo de probar si las células de *E.coli CynD* a las cuales se les permeabilizo su membrana celular y fueron expuestas a solución barren eran capaces de recuperarse en las condiciones adecuadas, y establecer si realmente existía una muerte celular y no un estado de células viables no cultivables, se tomaron células incubadas en solución barren por 3 días y se inocularon en caldo Lb. Este cultivo se mantuvo a una temperatura de 37 °C con agitación constante, y se analizó este cultivo por conteo en placa durante 3 días. Se encontró que después de 3 días de permanecer en la solución barren las células permeabilizadas no mostraron recuperación al incubarlas en medio LB.

La célula de *E. coli* tiene la capacidad de regenerar su membrana celular cuando se encuentra en las condiciones de nutrientes adecuadas. Esto se puede observar para células permeabilizadas con tolueno, que luego son incubadas en solución con nutrientes. Sin embargo, las células permeabilizadas que son incubadas en la solución barren no se observa regeneración y las células pierden viabilidad al cabo de tres días. La incapacidad de *E.coli CynD* permeabilizada para reproducirse, permite concluir que una vez en contacto con la solución barren, las células de *E.coli* dejan de ser organismos vivos y su membrana

celular actúa simplemente como un liposoma que recubre y protege el contenido proteico, incluida CynD.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

La enzima cianuro dihidratasa es una proteína altamente insoluble, y difícil de purificar, además presenta un bajo rendimiento de recuperación por lo cual se dificulta su uso como enzima purificada a escalas industriales ya que se tendrían costos de producción elevados.

El uso de células completas de *E. coli* B121(DE3) que expresan CynD son una alternativa para la degradación de cianuro a nivel industrial, ya que estas a comparación de la enzima aislada, tienen una resistencia a pH básico, temperatura y alta concentración de cianuro., Además, presentan menor pérdida de actividad cuando se encuentra en presencia de metales. Todas estas características son claves a nivel industrial donde la degradación de cianuro se realiza a pH altamente básico, no hay control de la temperatura, ya que los procesos se realizan al aire libre, se manejan altas concentraciones de cianuro y en muchos casos puede haber presencia de metales.

Cuando las células *E.coli*-CynD se usan en las proporciones adecuadas estas logran degradar hasta el 60% del cianuro presente en una solución real de cianuración minera. Esto demuestra que el uso de esta enzima recombinante protegida en el ambiente celular de *E.coli* es una alternativa viable para degradar cianuro a nivel industrial.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda estudiar otros métodos de purificación que permitan obtener la enzima de forma pura con altos rendimientos.

Estudiar estrategias de recuperación de las células para evitar fugas de organismos vivos modificados en estado viable al medio ambiente.

5. Anexos

5.1 Anexo A: secuencias analizadas

A continuación, se presentan las secuencias analizadas en el capítulo 1.

Secuencia C1

```
>gene_id_38134[]MTPLRVAVVQAGTSLFDTPKTLERMQAHCCEAAAALGVKLVVFPEAYI
GGYPKGLTFGAVMGSRFPEGREEYLRWKSAIMVPGPETVQIGSFAATMKAHIVVGVE
KEGATLYCKALFFGPDGALLGKHRKLMPTATERLVWGQGDGSTLPVFETEAGRLGAAIC
WENYMPALRQSLYAQGINVWCAPTVDERDIWQASMRHIAYEGRTFVLSACQYMTRADA
PEQYECHQGHNPETVLIKGGSVIVNPFGEIAGPVYDREAILTADIDLDDVIRAKYDLDVAG
HYARPDVFSLQVDTTAKTPVAFTTQETGPLSLPDAIE
```

Secuencia C2

```
>gene_id_59541
GAPDPAEELEAVCAQSDALLAIMRDTAMRHGVWLMPGTLPRPEVEGVRNRAPLIAPDG
RIMFQDKHVMTRFENESWGVVRAGNPPGVFETPWGLIGAAVCYDSEFPMLTRRQIEAGA
WLILVPTCTDSLHGFNRVRISAQARALENQCFVAVAPTVDGAPWLATLDENHGCAGVYG
PVDRG
```

Secuencia C3

```
>gene_id_66932
AEHTPQGLYNAATLVDAQGHTVLHYRKQHFLGALDRAFFLPGSAQPEVVSFQGMRVAS
MICYDVEFPEYVRATALAGCELLLVPTAQMEPFTFVAREVIRTRAWENQIYIYINHDGQE
GQTHYVGNSQIVAPDATVLARIEQGTGLITADVSAQVVARAQHANPYLQDRRPASYQSL
VAAFEKDTP
```

Secuencia C4

```
>gene_id_96025
HGVLMPGTLPRPEAEGVRNRAPLIAPDGRIMFQDKHVMTRFENESWGVVRAGNPPGV
FETPWGLIGTAVCYDSEFPMLTRRQIEAGAWLILVPTCTDSLHGFNRVRISAQARALENQ
```


Bibliografía

1. Kuyucak N, Akcil A. Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Miner Eng.* 2013;50:13–29.
2. Vidya B, Iniya M, Sivaraman G, Sumesh RV, chellappa D. Diverse benzothiazole based chemodosimeters for the detection of cyanide in aqueous media and in HeLa cells. *Sensors Actuators B Chem.* 2017;242:434–42.
3. Azamat J, Khataee A. Molecular dynamics simulations of removal of cyanide from aqueous solution using boron nitride nanotubes. *Comput Mater Sci.* 2017;128:8–14.
4. agencia para sustancias toxicas y egistro de enfermedades. Resumen de Salud Pública: Cianuro (Cyanide) | PHS | ATSDR [Internet]. 2016 [cited 2016 Dec 13]. Available from: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs8.html
5. RESTREPO OJ, MONTOYA CA, MUÑOZ NA. Degradación microbiana de cianuro procedente de plntas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P.fluorecens*. *DYNA.* 2006;73(149):45–51.
6. Logsdon MJ, Hagelstein K, Terry Mudder Cl. El Manejo del cianuro en la extracción de oro. International Council on Metals and the Environment. 2001. 15 p.
7. OCMAL. Auge de minería en Latinoamérica [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 9]. Available from: <https://www.fdcl.org/wp-content/uploads/2015/12/Informe-Ocmal-LA.pdf>
8. Banco de la republica, Ministerio de minas y Energia, ANM. Sisitema de información minero Colombiano [Internet]. 2015 [cited 2017 Jan 8].

Available from:

http://www.upme.gov.co/generadorconsultas/Consulta_Series.aspx?idModulo=4&tipoSerie=116&grupo=355

9. Rubiano S. La regulación ambiental y social de La minería en Colombia: comentarios al proyecto de Ley de reforma al código de minas. Foro Nac Ambient [Internet]. 2012;1:1–16. Available from: www.foronacionalambiental.org.co
10. Oliviero Verbel J. Efectos de la minería en Colombia sobre la salud humana. Univ Cart [Internet]. 2010;5–13. Available from: http://www1.upme.gov.co/sites/default/files/forum_topic/3655/files/efectos_mineria_colombia_sobre_salud_humana.pdf
11. Environmental impacts and metal exposure of aquatic ecosystems in rivers contaminated by small scale gold mining: the Puyango River basin, southern Ecuador. Sci Total Environ [Internet]. 2001 Oct 20 [cited 2017 Oct 9];278(1–3):239–61. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969701006556>
12. Gaviria A, Meza L. Analysis of Alternatives for the Degradation of the Cyanide in Liquids and Solids Efluentes of the County of Segovia , Antioquia and in the Ore Dressing Mill of the Mineros Nacionales, County of Marmato, Caldas. Rev Dyna [Internet]. 2006;31–44. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/496/49614904/49614904.html>
13. Botz MM. OVERVIEW OF CYANIDE TREATMENT METHODS. Min enviromental Manag Min J Ltd. 2001;28–30.
14. Gupta N, Balomajumder C, Agarwal VK. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. J Hazard Mater. 2010;176(1):1–13.
15. Kabiru Ibrahim K, Arif Syed M, Yunus Shukor M, Aqlima Ahmad S. Biological Remediation of Cyanide: a Review. 2015;22(2):151–63.

16. Mirete S, Morgante V, Gonzales-Pastor JE. Functional metagenomics of extreme environments. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Oct 24];38:143–9. Available from: https://ac.els-cdn.com/S0958166916300234/1-s2.0-S0958166916300234-main.pdf?_tid=dfb31b72-b8c9-11e7-9792-00000aacb362&acdnat=1508856464_48b57528a4d00742508ee70d51a8be1c
17. González A, Cárdenas M, Restrepo S. Metagenómica Revelación de comunidades microbianas. *Hipótesis, Apunt científicos uniandinos* [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 24];12. Available from: <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed12pdf/Metagenomica.pdf>
18. Pablo J, Ardenas C, Quatrini R, Holmes DS. Genomic and metagenomic challenges and opportunities for bioleaching: a mini-review. 2016 [cited 2017 Oct 24]; Available from: https://ac.els-cdn.com/S0923250816300699/1-s2.0-S0923250816300699-main.pdf?_tid=23ad6a7a-b8cb-11e7-b0ef-00000aab0f01&acdnat=1508857007_00417071f7fbf5dd5e58658c82772709
19. Ufarté L, Laville É, Duquesne S, Potocki-Veronese G. Metagenomics for the discovery of pollutant degrading enzymes. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 24];33:1845–54. Available from: https://ac.els-cdn.com/S073497501530046X/1-s2.0-S073497501530046X-main.pdf?_tid=461b62b0-b8cb-11e7-ba86-00000aab0f01&acdnat=1508857065_7fe366b78b7c1ca82c24e3446b994fb4
20. Guerrero BJ. Cianuro: Toxicidad y Destrucción Biológica. [cited 2017 Oct 12]; Available from: https://www.researchgate.net/profile/Jose_J_Guerrero_Rojas/publication/258499252_Cianuro_Toxicidad_y_Destruccion_Biologica/links/0046352858cb74d8d9000000/Cianuro-Toxicidad-y-Destruccion-Biologica.pdf

21. Alarcón F, Dufour MD. Almidón Agrícola de Yuca en Colombia Tomo 1: Producción y Recomendaciones. [cited 2017 Oct 12]; Available from: http://www.starchtechnology.org/uploads/files/almidon_agrio_1.pdf
22. Vargas Aguilar P. Obtención de almidón fermentado a partir de yuca (*Manihot esculenta crantz*) variedad valencia , factibilidad de uso en productos de panadería. *Tecnol en marcha*. 2010;23(3):15–23.
23. National center for biotechnology information. Protein BLAST: search protein databases using a protein query [Internet]. [cited 2017 Nov 19]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>
24. Kumar S, Stecher G, Tamura K. Mega: molecular evolutionary genetic analysis [Internet]. 2016 [cited 2017 Nov 19]. Available from: <http://www.megasoftware.net/citations>
25. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2004 Aug 19 [cited 2018 Feb 6];5(1):113. Available from: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-5-113>
26. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Mar 8 [cited 2018 Feb 6];32(5):1792–7. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkh340>
27. Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2018 Feb 6];43(W1):W580-4. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv279>
28. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013

- Jul 1 [cited 2018 Feb 6];41(Web Server issue):W597-600. Available from:
<http://academic.oup.com/nar/article/41/W1/W597/1095852/Analysis-Tool-Web-Services-from-the-EMBLEBI>
29. Arnold K, Bordoli L, Koop J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2006;22(2):195–201.
 30. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. Swiss-model: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acid research*. 2014;42(w252-8).
 31. Lisdiyanti P, Awasaki H, Seki T, Yamada Y, Uchinura T, Omogata K. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J Gen Appl Microbiol* [Internet]. 2001 [cited 2017 Oct 13];47:119--131. Available from:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/47/3/47_3_119/_pdf
 32. Kiryu T, Kiso T, Nakano H, Ooe K, Kimura T, Murakami H. Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt ("Caspian Sea yogurt") in Japan. *J Dairy Sci* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Oct 13];92(1):25–34. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030209703066?via%3Dihub>
 33. Zhang L, Yin B, Wang C, Jiang S, Wang H, Yuan YA, et al. Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803. *J Struct Biol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2018 Feb 6];188(2):93–101. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847714002123?via%3Dihub>
 34. Pace HC, Hodawadekar SC, Draganescu A, Huang J, Bieganowski P, Pekarsky Y, et al. Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Curr Biol* [Internet].

- [cited 2018 Feb 8];10(15):907–17. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959838>
35. NOVO C, FARNAUD S, TATA R, CLEMENTE A, BROWN PR. Support for a three-dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity. *Biochem J* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2017 Oct 30];365(3):731–8. Available from:
<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj20011714>
36. FARNAUD S, TATA R, SOHI MK, WAN T, BROWN PR, SUTTON BJ. Evidence that cysteine-166 is the active-site nucleophile of *Pseudomonas aeruginosa* amidase: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the enzyme. *Biochem J* [Internet]. 1999 Jun 15 [cited 2017 Oct 30];340(3):711–4. Available from:
<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj3400711>
37. Howden AJM, Preston GM. Nitrilase enzymes and their role in plant-microbe interactions. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2017 Oct 3];2(4):441–51. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255276>
38. Basile LJ. Cyanide-degrading enzymes for bioremediation. 2008.
39. Gong J-S, Lu Z-M, Li H, Shi J-S, Zhou Z-M, Xu Z-H. Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2012 Oct 30 [cited 2017 Oct 2];11(1):142. Available from:
<http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-11-142>
40. Wang L, Watermeyer JM, Mulelu AE, Sewell BT, Benedik MJ. Engineering pH-tolerant mutants of a cyanide dihydratase. 2012;131–40.
41. Crum MA, Sewell BT, Benedik MJ. *Bacillus pumilus* Cyanide Dihydratase Mutants with Higher Catalytic Activity. *Front Microbiol* [Internet].

- 2016;7(August):1–10. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01264>
42. Crum MA, Park JM, Sewell BT, Benedik MJ. C-terminal hybrid mutant of *Bacillus pumilus* cyanide dihydratase dramatically enhances thermal stability and pH tolerance by reinforcing oligomerization. *J Appl Microbiol*. 2015;118(4):881–9.
43. Jandhyala D, Berman M, Meyers PR, Sewell BT, Willson RC, Benedik MJ. CynD, the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*: gene cloning and structural studies. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2003 Aug [cited 2016 Nov 23];69(8):4794–805. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12902273>
44. Meyers PR, Rawlings DE, Woods DR, Lindsey GG. Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. *J Bacteriol* [Internet]. 1993 Oct [cited 2016 Dec 15];175(19):6105–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8407782>
45. Watanabe A, Yano K, Ikebukuro K, Karube I. Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology*. 1998;144(6):1677–82.
46. Watanabe A, Yano K, Ikebukuro K, Karube I. Investigation of the potential active site of a cyanide dihydratase using site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 1998;1382(1):1–4.
47. Park JM, Mulelu A, Trevor Sewell B, Benedik MJ. Probing an interfacial surface in the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*, a spiral forming nitrilase. *Front Microbiol*. 2016;6(JAN):1–14.
48. Escobar YC. ESTUDIO DE MÉTODOS QUÍMICOS DE REMOCIÓN DE CIANURO PRESENTE EN RESIDUOS DE CIANURACIÓN PROVENIENTES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ORO DE VETA EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO. *Rev Luna Azul* [Internet]. 2010;31(31):156–69. Available from:
http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-

- 24742010000200012&lng=es&nrm
49. NOvagen. BugBuster™ Protein Extraction Reagent [Internet]. [cited 2017 Oct 17]. p. 1–4. Available from:
http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Expression_Extraction/NOVAGEN_BugBuster_protein_extraction.pdf
 50. GE Healthcare. Purifying Challenging Proteins. Gen Electr Co [Internet]. 2007;28-9095–31:1–107. Available from:
http://www.mcdb.ucla.edu/Research/Jacobsen/LabWebSite/PDFOthers/GE_Seminar.pdf
 51. Fisher FB, Brown JS. Colorimetric Determination of Cyanide in Stack Gas and Waste Water. *Anal Chem*. 1952;24(9):1440–4.
 52. ThermoFisher SCIENTIFIC. Protein expression handbook Recombinant protein expression and purification technologies [Internet]. [cited 2017 Oct 17]. Available from:
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/protein-expression-handbook.pdf>
 53. Sørensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2005 Jan 4 [cited 2017 Nov 21];4(1):1. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629064>
 54. Larentis AL, Nicolau JFMQ, Esteves G dos S, Vareschini DT, de Almeida FVR, dos Reis MG, et al. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Res Notes* [Internet]. 2014 Sep 25 [cited 2017 Nov 21];7:671. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25252618>
 55. Bornhorst J, Falke J. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags [Internet]. Vol. 326. Academic Press; 2000 [cited 2017 Oct 17]. 245-254

- p. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687900260588>
56. GE healthcare. Recombinant protein purification handbook [Internet]. [cited 2017 Oct 17]. Available from:
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1336168762999/litdoc18114275_20120505001440.pdf
57. Villaverde A, Carrió MM. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2003 [cited 2017 Oct 17];25:1385–95. Available from:
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1025024104862.pdf>
58. De Carvalho CCCR. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 30];10:250–63. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328830/pdf/MBT2-10-250.pdf>
59. Ramesh H, Zajkoska P, Rebroš M, Woodley JM. The effect of cultivation media and washing whole-cell biocatalysts on monoamine oxidase catalyzed oxidative desymmetrization of 3-azabicyclo[3,3,0]octane. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 20];83:7–13. Available from:
http://ac.els-cdn.com/S0141022915300788/1-s2.0-S0141022915300788-main.pdf?_tid=c6bc207a-9e37-11e7-9d32-00000aab0f6c&acdnat=1505934985_f79fa43b00059b76839af21414bf77a9
60. Mekuto L, Jacson V, Obed S. Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus* Sp. Consortium Dominated by *Bacillus Safensis*, *Lichenformis* and *Tequilensis* Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey. *J Bioremed Biodeg* [Internet]. 2013 [cited 2017 Sep 21]; Available from:
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.S18-004>
61. Restrepo OJ, MONToya C., Muñoz N. DEGRADACIÓN MICROBIANA DE CIANURO PROCEDENTE DE PLANTAS DE BENEFICIO DE ORO MEDIANTE UNA CEPA NATIVA DE *P.fluorecens*. *Dyna* [Internet]. 2006

- [cited 2017 Nov 21];73(149). Available from:
<http://www.redalyc.org/html/496/49614905/>
62. Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R, Lee CK, Peterson ME. The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. *Extremophiles* [Internet]. 2008 Jan 13 [cited 2017 Sep 25];12(1):51–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-007-0089-7>
63. Daniel RM, Peterson ME, Danson MJ, Price NC, Kelly SM, Monk CR, et al. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochem J* [Internet]. 2009 Dec 23 [cited 2017 Sep 25];425(2):353–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19849667>
64. Jandhyala DM, Willson RC, Sewell BT, Benedik MJ. Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2005 Aug 10 [cited 2017 Sep 25];68(3):327–35. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1903-8>
65. Jandhyala DM, Willson RC, Sewell BT, Benedik MJ. Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2005 Aug 10 [cited 2017 Aug 8];68(3):327–35. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1903-8>