



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Expresión, purificación y cristalización de la proteína rCynD de *Bacillus*
safensis PER-URP-08

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

AUTORA

Castillo Chávez, Adriana Alexandra
(ORCID: 0000-0003-1437-5391)

ASESOR

Quiñones Aguilar, Mauro Maximo
(ORCID: 0000-0001-5026-5865)

ASESOR EXTERNO

Justo Arévalo, Santiago
(ORCID: 0000-0001-8833-4395)

Lima, Perú

2023

Metadatos Complementarios

Datos de autora

Castillo Chávez, Adriana Alexandra

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de Identidad: 70005714

Datos de asesor

Quiñones Aguilar, Mauro Maximo

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de Identidad: 25757894

Justo Arévalo, Santiago

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de Identidad: 46700251

Datos del jurado

JURADO 1: Cruz Neyra, Lidia Luz

Número de documento de identidad: 08406252

Código ORCID: 0000-0003-3902-4280

JURADO 2: Pineda Chavarria, Roberto Christian

Número de documento de identidad: 10308965

Código ORCID: 0000-0001-9388-1342

JURADO 3: Guerra Santa Cruz, Alcides

Número de documento de identidad: 28260663

Código ORCID: 0000-0002-5130-8190

Datos de la investigación

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.10

Código del Programa: 511206

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Adriana Alexandra Castillo Chávez, con código de estudiante N° 20112264, con (DNI o Carné de Extranjería¹) N° 70005714, con domicilio en Jr. Lopez de Ayala 1122, distrito San Borja, provincia y departamento de Lima.

En mi condición de bachiller en Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, declaro bajo juramento que:

(El/la) presente (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación)

titulado: "Expresión, purificación y cristalización de la proteína r CynD de Bacillus safensis PER-URP-08"

es de mi única autoría, bajo el asesoramiento del docente Migro Maximo Quiñones Aguilar y mi asesor externo Santiago Justo Arévalo, y no existe plagio y/o copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica o de investigación, universidad, etc; (el/la) cual ha sido sometido (a) al antiplagio Turnitin y tiene el 11 % de similitud final.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación), el contenido de estas corresponde a las opiniones de ellos, y por las cuales no asumo responsabilidad, ya sean de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de internet.

Asimismo, ratifico plenamente que el contenido íntegro del(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) es de mi conocimiento y autoría. Por tal motivo, asumo toda la responsabilidad de cualquier error u omisión en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) y soy consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de falsa declaración, me someto a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y a los dispositivos legales nacionales vigentes.

Surco, 7 de noviembre de 2023



Adriana Alexandra Castillo Chávez
(Nombre completo y Firma)

(N° DNI o Carné de Extranjería) 70005714



Mg. Mario Martín Pauta Gálvez
Jefe Unidad Grados y Títulos
FCB

¹ Se debe colocar la opción que corresponda, realizar lo mismo en todo el texto del documento.

Expresión, purificación y cristalización de la proteína rCynD de Bacillus safensis PER-URP-08

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	1%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	patents.google.com Fuente de Internet	1%
4	dokumen.pub Fuente de Internet	<1%
5	www.revistapesquisa.fapesp.br:2222 Fuente de Internet	<1%
6	ecosur.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1%
7	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
8	www.revistaalfa.revistahorizontes.org Fuente de Internet	<1%
9	savoirs.usherbrooke.ca Fuente de Internet	<1%

<1 %

10 [sid.ir](#)
Fuente de Internet

<1 %

11 Submitted to Wageningen University
Trabajo del estudiante

<1 %

12 [link.springer.com](#)
Fuente de Internet

<1 %

13 [www.urp.edu.pe](#)
Fuente de Internet

<1 %

14 [dehesa.unex.es](#)
Fuente de Internet

<1 %

15 [dspace.ucuenca.edu.ec](#)
Fuente de Internet

<1 %

16 [journals.iucr.org](#)
Fuente de Internet

<1 %

17 [repositorio.uchile.cl](#)
Fuente de Internet

<1 %

18 [repositorio.untumbes.edu.pe](#)
Fuente de Internet

<1 %

19 [www.researchgate.net](#)
Fuente de Internet

<1 %

20 [www.teses.usp.br](#)
Fuente de Internet

<1 %

21	repositorio.utp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
22	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
23	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
24	pure.udem.edu.mx Fuente de Internet	<1 %
25	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
26	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1 %
27	repositorio.unjbg.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
28	repositorio.utelesup.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
29	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1 %
30	brenda-enzymes.org Fuente de Internet	<1 %
31	nanopdf.com Fuente de Internet	<1 %
32	"Aumento de la termoestabilidad de una xilanasa activa en frío mediante ingeniería de	<1 %

proteínas.", Pontificia Universidad Catolica de Chile, 2020

Publicación

33	Submitted to Pontificia Universidad Catolica del Peru Trabajo del estudiante	<1 %
34	Submitted to Universidad Catolica De Cuenca Trabajo del estudiante	<1 %
35	Submitted to Universidad Continental Trabajo del estudiante	<1 %
36	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
37	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
38	repositorio.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
39	Alba Sanchis Juan. "Exome Sequencing in Gastrointestinal Food Allergy Induced by Multiple Food Protein", Universitat Politecnica de Valencia, 2019 Publicación	<1 %
40	dspace.umh.es Fuente de Internet	<1 %
41	rmiq.org Fuente de Internet	<1 %

42	www.aquamania.net Fuente de Internet	<1 %
43	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
44	www.planetseed.com Fuente de Internet	<1 %
45	"Integrated Natural Resources Research", Springer Science and Business Media LLC, 2021 Publicación	<1 %
46	Anshula Sharma, Gaganjot Gupta, Tawseef Ahmad, Baljinder Kaur, Khalid Rehman Hakeem. "Tailoring cellular metabolism in lactic acid bacteria through metabolic engineering", Journal of Microbiological Methods, 2020 Publicación	<1 %
47	Belén Sotomayor Burneo, A. Sánchez Juárez, Diego Alejandro Nieto-Monteros. "Un-steady state modeling for free cyanide removal and biofilm growth in a RBC batch process", Journal of Hazardous Materials, 2020 Publicación	<1 %
48	Dakshina M. Jandhyala, Richard C. Willson, B. Trevor Sewell, Michael J. Benedik. "Comparison of cyanide-degrading nitrilases",	<1 %

Applied Microbiology and Biotechnology, 2005

Publicación

49	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
50	hydrologie.org Fuente de Internet	<1 %
51	idus.us.es Fuente de Internet	<1 %
52	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	<1 %
53	"Rol de triptófano y tirosina en las modificaciones oxidativas de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa inducidas por radicales peroxilo y anión radical carbonato", Pontificia Universidad Católica de Chile, 2022 Publicación	<1 %
54	Michael J. Benedik, B. Trevor Sewell. "Cyanide-degrading nitrilases in nature", The Journal of General and Applied Microbiology, 2018 Publicación	<1 %
55	bioone.org Fuente de Internet	<1 %
56	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %

dumas.ccsd.cnrs.fr

57	Fuente de Internet	<1 %
58	ebuah.uah.es Fuente de Internet	<1 %
59	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1 %
60	ideas.repec.org Fuente de Internet	<1 %
61	revistadigital.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
62	www.ccoo.illes.balears.net Fuente de Internet	<1 %
63	www.colibri.udelar.edu.uy Fuente de Internet	<1 %
64	Mathew Paul Watts, Liam Patrick Spurr, Han Ming Gan, John William Moreau. "Characterization of an autotrophic bioreactor microbial consortium degrading thiocyanate", Applied Microbiology and Biotechnology, 2017 Publicación	<1 %
65	autsys.aalto.fi Fuente de Internet	<1 %
66	biblioteca2.icesi.edu.co Fuente de Internet	<1 %

67	edoc.pub Fuente de Internet	<1 %
68	gerenaverde.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
69	onlinelibrary.wiley.com Fuente de Internet	<1 %
70	people.eecs.berkeley.edu Fuente de Internet	<1 %
71	repositorio.unapiquitos.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
72	repositorio.uniandes.edu.co Fuente de Internet	<1 %
73	rinfi.fi.mdp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
74	riudg.udg.mx Fuente de Internet	<1 %
75	watermark.silverchair.com Fuente de Internet	<1 %
76	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
77	www.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.org Fuente de Internet	<1 %
78	www.jove.com Fuente de Internet	<1 %

79	www.mdpi.com Fuente de Internet	<1 %
80	www.sabiia.cnptia.embrapa.br Fuente de Internet	<1 %
81	www.worldcat.org Fuente de Internet	<1 %
82	doku.pub Fuente de Internet	<1 %
83	renati.sunedu.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
84	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
85	revistas.unjbg.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

DEDICATORIA

A mis padres Liliana Chávez Lobato, Marco Castillo Torres y Gino Vásquez Garcés, por su paciencia, su apoyo incondicional y por siempre creer en mí. También dedico este trabajo a mis hermanas Angie Vásquez Chávez y Sophia Castillo Meza por darme fuerza y acompañarme siempre con una sonrisa.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mis hermanas, mi enamorado y el resto de mi familia por todo su cariño y por siempre darme la motivación que necesitaba.

A Santiago Justo por darme los conocimientos necesarios para realizar esta investigación y por su infinita paciencia y amistad sincera.

Al profesor Mauro Quiñones por su asesoría y apoyo durante este proceso, y al Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Ricardo Palma por permitirme realizar los ensayos iniciales.

Al profesor Shaker Chuck Farah de la Universidad de Sao Paulo por recibirme en su laboratorio y brindarme las facilidades para el desarrollo de los experimentos.

A todos mis amigos por apoyarme en este y otros proyectos, ustedes ya saben quiénes son.

ÍNDICE

I.	Introducción	10
1.1	Planteamiento del problema	12
1.2	Justificación de la investigación.....	14
1.3	Objetivo general	15
1.4	Objetivos específicos.....	15
II.	Marco teórico	16
2.1	Proteína CynD	16
2.2	Cianuro: toxicidad, fuentes y remediación.....	17
2.3	Cristalización de proteínas	18
III.	Antecedentes	19
IV.	Materiales y métodos	28
4.1	Lugar de ejecución	28
4.2	Tipo y diseño de investigación.....	28
4.3	Variables.....	28
4.3.1	Variables independientes:	28
4.3.2	Variable dependiente:	28
4.4	Operacionalización de las variables	29
4.5	Procedimientos y análisis de datos.....	30
4.5.1	Transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)(pLysS) usando un plásmido de expresión con el inserto del gen CynD de <i>B. safensis</i> PER-URP-08.	30

4.5.2	Inducción y purificación de la proteína rCynD _{PER-URP-08} de las células transformadas de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)(pLysS).....	31
4.5.3	Determinación de la actividad enzimática de la proteína rCynD _{PER-URP-08} ...	32
4.5.4	Cristalización de la proteína rCynD _{PER-URP-08} a diferentes pH y concentraciones de PEG 8000	33
V.	Resultados	35
5.1	Transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)(pLysS) usando un plásmido de expresión con el inserto del gen CynD de <i>B. safensis</i> PER-URP-08.....	35
5.2	Inducción y purificación de la proteína rCynD _{PER-URP-08} de las células transformadas de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)(pLysS).	36
5.3	Determinación de la actividad enzimática de la proteína rCynD _{PER-URP-08}	41
5.4	Cristalización de la proteína rCynD _{PER-URP-08} a diferentes pH y concentraciones de PEG 8000	44
VI.	Discusión.....	48
VII.	Conclusiones	51
VIII.	Recomendaciones	52
IX.	Referencias citadas.....	53
X.	Anexos	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Operacionalización de las variables.....	29
Tabla 2.	Análisis cinético de rCynD _{PER-URP-08} empleando pH 8 y 9.	43
Tabla 3.	Tamaño de cristales formados en diferentes condiciones de cristalización..	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Placa empleada para la determinación de la actividad enzimática.	33
Figura 2.	Batería de soluciones de precipitación.....	33
Figura 3.	Eficiencia de transformación de acuerdo a la concentración de plásmido inoculado.	35
Figura 4.	SDS-PAGE del primer ensayo de inducción. NI: no inducido. 18°: inducción a 18°C. 30°: inducción a 30°C. 37°: inducción a 37°C.	36
Figura 5.	SDS-PAGE del segundo ensayo de inducción. NI: no inducido. 18°: inducción a 18°C. 30°: inducción a 30°C. 37°: inducción a 37°C.	37
Figura 6.	Concentración de rCynD _{PER-URP-08} inducida en diferentes temperaturas.	37
Figura 7.	Cromatograma de cromatografía por afinidad con elución en gradiente.....	38
Figura 8.	Cromatograma de cromatografía por afinidad con elución isocrática.	39
Figura 9.	SDS-PAGE de la purificación usando cromatografía por afinidad con elución en gradiente y cromatografía por exclusión de tamaño.	39
Figura 10.	SDS-PAGE de la purificación usando cromatografía por afinidad con elución isocrática y cromatografía por exclusión de tamaño.....	40
Figura 11.	SDS-PAGE de las fracciones de interés de las cromatografías con elución en gradiente e isocrática respectivamente.....	40
Figura 12.	Pureza de rCynD _{PER-URP-08} obtenida empleando cromatografía con elución en gradiente e isocrática.....	41
Figura 13.	Velocidad inicial (V ₀) vs Concentración inicial de Cianuro a pH 8	42
Figura 14.	Velocidad inicial (V ₀) vs Concentración inicial de Cianuro a pH 9	42

Figura 15. K_m obtenida empleando los pH 8 y 9 durante el análisis cinético.	43
Figura 16. k_{cat} obtenida empleando los pH 8 y 9 durante el análisis cinético.	43
Figura 17. Cristales en la condición de 6% de PEG 8000, pH 10,5 y stock de aminoácidos como aditivo (aumento de 40x).	45
Figura 18. Cristales en la condición de 8% de PEG 8000, pH 11 y stock de aminoácidos como aditivo (aumento de 40x).	45
Figura 19. Cristales en la condición de 12% de PEG 8000, pH 10,5 y cationes divalentes como aditivo (aumento de 40x).	46
Figura 20. Cristales en la condición de 10% de PEG 8000, pH 11 y cationes divalentes como aditivo (aumento de 40x).	46
Figura 21. Tamaño de los cristales formados en diferentes condiciones de cristalización.	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Mapa del plásmido pET-11a con el inserto del gen CynD de <i>B. safensis</i> PER-URP-08.	69
Anexo 2.	Número de colonia formadas de acuerdo a la concentración de plásmido inoculado.	70
Anexo 3.	Eficiencia de transformación de acuerdo a la concentración de plásmido inoculado.	70
Anexo 4.	Concentración de rCynD _{PER-URP-08} en cultivos no inducidos e inducidos a diferentes temperaturas.	70
Anexo 5.	Concentración de rCynD _{PER-URP-08} en cultivos no inducidos e inducidos a diferentes temperaturas (tabla extendida).	71
Anexo 6.	Pureza de rCynD _{PER-URP-08} obtenida empleando cromatografía con elución en gradiente e isocrática.	71
Anexo 7.	Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño.	72
Anexo 8.	Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño (zoom).	72
Anexo 9.	Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño.	73
Anexo 10.	Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño (zoom).	73
Anexo 11.	Análisis cinético de rCynD _{PER-URP-08} empleando pH 8 y 9.	74
Anexo 12.	Tamaño de los cristales formados en diferentes condiciones de cristalización (tabla extendida).	74
Anexo 13.	Patrón de difracción de rayos X de un cristal de (A) Amidasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y (B) Sulfuro de Zinc.	75

Resumen

La enzima cianuro dihidratasa (CynD) es producida por algunas bacterias y es capaz de degradar el cianuro, una sustancia tóxica utilizada en varias industrias. Para biorremediar el cianuro se necesita mantener un pH de 9, lo que hace que la CynD de algunas bacterias pierdan su actividad. Se necesita la estructura tridimensional de la CynD para entender mejor las interacciones entre sus dominios y superficies y mejorar su tolerancia al pH mediante la creación de mutantes. El objetivo de esta investigación es expresar, purificar y cristalizar la rCynD de *B. safensis* PER-URP-08 (rCynD_{PER-URP-08}). Se evidenció que diferentes concentraciones de inóculo de plásmido (67,8; 135,6 y 271,2 ng/ μ L) pueden transformar *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS) con una eficiencia de 1,24; $2,3 \times 10^{-1}$ y $7,7 \times 10^{-1}$ ufc/ng respectivamente ($p=0,49$), y que se puede inducir rCynD_{PER-URP-08} con IPTG a 18°, 30 y 37°C ($p=0,1$). Así mismo, se obtuvo que la pureza de la proteína es similar al realizar una cromatografía con elución isocrática o en gradiente ($p=1$). Con respecto a la actividad enzimática, el K_m y k_{cat} de rCynD_{PER-URP-08} se mantiene a pH 9 ($p=0,48$ y $p=0,093$ respectivamente), por lo cual, debe ser considerada como candidata para la biorremediación de residuos con cianuro. En cuatro de las condiciones utilizadas se lograron obtener cristales, siendo los más grandes los generados con la adición de un stock de aminoácidos (60-95 μ m), mientras que los cristales generados con los cationes divalentes tuvieron un tamaño más pequeño (27,78-29,09 μ m) ($p=0,0032$). Dado que estos aditivos tienen la capacidad de formar sales, es necesario que un siguiente estudio analice el patrón de difracción de rayos X para determinar que los cristales son de proteínas.

Palabras clave: Cianuro dihidratasa, CynD, *Bacillus safensis*, cristalización.

Abstract

The cyanide dihydratase enzyme (CynD) is produced by certain bacteria and is capable of degrading cyanide, a toxic substance used in various industries. To bioremediate cyanide, a pH of 9 is needed, which causes CynD in some bacteria to lose its activity. The three-dimensional structure of CynD is needed to better understand the interactions between its domains and surfaces and improve its pH tolerance by creating mutants. The objective of this research is to express, purify, and crystallize rCynD from *B. safensis* PER-URP-08 (rCynD_{PER-URP-08}). It was found that different concentrations of plasmid inoculum (67.8, 135.6, and 271.2 ng/ μ L) can transform *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS) with an efficiency of 1.24, 2.3×10^{-1} , and 7.7×10^{-1} cfu/ng, respectively ($p=0.49$), and that rCynD_{PER-URP-08} can be induced with IPTG at 18°C, 30°C, and 37°C ($p=0.1$). The purity of the protein is similar when using either isocratic or gradient elution chromatography ($p=1$). Regarding to enzymatic activity, the K_m and k_{cat} of rCynD_{PER-URP-08} are maintained at pH 9 ($p=0.48$ and $p=0.093$, respectively), making it a candidate for the bioremediation of cyanide waste. Crystals were obtained in four of the conditions used, with the largest crystals generated with the addition of an amino acid stock (60-95 μ m), while crystals generated with divalent cations were smaller (27.78-29.09 μ m) ($p=0.0032$). Since these additives have the ability to form salts, further study is needed to analyze the X-ray diffraction pattern to determine that the crystals are protein.

Keywords: Cyanide dihydratase, CynD, *Bacillus safensis*, crystallization.

I. Introducción

La CynD, también llamada cianuro dihidratasa, es una enzima que pertenece a la superfamilia de las nitrilasas (EC 3.5.5.1). Esta enzima ha sido aislada de *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Pseudomonas stutzeri* y *Alcaligenes xylosoxidans* (Ingvorsen, *et al.*, 1991; Kunz, *et al.*, 1992; Meyers, *et al.*, 1993; Watanabe, *et al.*, 1998; Jandhyala, *et al.*, 2003; Sewell, *et al.*, 2003; Justo, *et al.*, 2022), dado que tiene la capacidad de degradar cianuro convirtiéndolo en compuestos menos tóxicos (formiato y amoníaco) (Raybuck, 1992; Gupta, *et al.*, 2010; Kumar, *et al.*, 2017).

El cianuro ($-C\equiv N$) se incorpora al medio ambiente como contaminante primordialmente a través de actividades antropológicas, ya que su afinidad con otros metales es aprovechada en la minería y en las industrias metalúrgica, química, de galvanoplastia, entre otras (Young y Jordan, 1995; Yarar, 2001; Botz, *et al.*, 2005; Kyucak y Akcil, 2013). Cabe señalar, que su toxicidad radica principalmente en su capacidad de inhibir la respiración celular (Antonini, *et al.* 1971; Jensen, *et al.*, 1984; Jones, *et al.*, 1984), y como resultado, puede afectar al sistema nervioso central y el control de la función respiratoria hasta conducir a la muerte (Services, 2002).

Por otra parte, el Ministerio del Medio Ambiente del Perú ha establecido en sus Estándares de Calidad Ambiental para agua un límite de cianuro de 0,0052 mg/L en la categoría de conservación del ambiente acuático para lagunas, lagos y ríos (D. S. N° 004-2017-MINAM, 2017). A pesar de ello, se han encontrado niveles de cianuro que superan este límite en aguas superficiales (ríos, lagunas y puquios) de Cajamarca (Narro y Vásquez, 2017), La Libertad (Tuesta, 2010; Carbajal y Cisneros, 2012; Ibañez, 2016; Castillo y Lecca, 2019, Nuñuvero y Vigo, 2019), Puno (Argota-Pérez, *et al.*, 2014) y Tumbes (Fernandez, 2019).

El cianuro puede ser degradado a través de la biorremediación, que es una técnica alternativa ecológica que no genera contaminación secundaria, es potencialmente económica y no requiere de fuentes de energía complementarias (Nelson, *et al.*, 1998; Stott, *et al.*, 2001; Akcil, 2003; Baxter y Cummings, 2006; Dash y Balomajumder, 2009; Bhalla, *et al.*, 2017; Kumar, *et al.*, 2017; Sharma, *et al.*, 2019a). Cabe mencionar que a la fecha se ha logrado biorremediar aguas residuales de la industria joyera (Cobos, *et al.*, 2015; Luque-Almagro, *et al.*, 2015; Ibañez, *et al.*, 2017), de galvanoplastia (Patil y Paknikar, 2000; Sirianuntapiboon, *et al.*, 2007; Wu, *et al.*, 2014; Mekuto, *et al.*, 2015) y de la coquización (obtención de combustible sólido a partir de carbón) (Jeong y Chung, 2006; Sharma y Phillip, 2015; Joshi, *et al.*, 2016), relaves mineros (Nelson *et al.*, 1998; Evangelho, *et al.*, 2001; Stott, 2001; Baxter y Cummings, 2006) y otros efluentes (Annachhatre y Amornkaew, 2001; Quan, *et al.*, 2004; Wang, *et al.*, 2004; Chen, *et al.*, 2008; Dash, *et al.*, 2008; Kaewkannetra, *et al.*, 2009; Mekuto, *et al.*, 2014) contaminados con cianuro empleando consorcios bacterianos.

En la actualidad la enzima CynD es una de las alternativas modernas para la biorremediación de residuos con cianuro, ya que no requiere la intervención de sustratos ni cofactores adicionales para su funcionamiento (Meyers, *et al.*, 1991; Park, *et al.*, 2017; Sharma, *et al.*, 2019b); no obstante, su uso en la biorremediación se ve limitado debido a su inestabilidad térmica y baja tolerancia al pH alcalino. Estas características pueden ser mejoradas a través del diseño racional de proteínas, que requiere el conocimiento de la estructura tridimensional en alta resolución de la CynD (Sharma, *et al.*, 2019a). Una de las técnicas más usada para resolver la estructura de las proteínas es la cristalografía de rayos X, donde es esencial cultivar cristales de la enzima, por ello se plantea expresar, purificar y cristalizar rCynD de *B. safensis* PER-URP-08 (rCynD_{PER-URP-08}).

1.1 Planteamiento del problema

Estudios realizados en Perú registran altas concentraciones de cianuro en aguas superficiales aledañas a zonas mineras en Cajamarca (0,034-0,04 mg/L), La Libertad (0,01-27,07 mg/L), Puno (0,13-0,14 mg/L) y Tumbes (0,5-0,9 mg/L) (Tuesta, 2010; Carbajal y Cisneros, 2012; Argota-Pérez, *et al.*, 2014; Ibañez, 2016; Narro y Vásquez, 2017; Castillo y Lecca, 2019; Fernandez, 2019; Nuñuvero y Vigo, 2019), las cuales superan el límite máximo permisible de cianuro (0,0052 mg/L) determinado por el Ministerio del Ambiente (D. S. N° 004-2017-MINAM, 2017).

En la actualidad la eliminación de residuos contaminados con cianuro se realiza en su mayoría a través de métodos físicos y químicos, los cuales generan por si mismos otros subproductos nocivos; así, las industrias continúan liberando otros contaminantes que pueden afectar al medio ambiente y a la salud pública (Young y Jordan, 1995; Yarar, 2001; Botz, *et al.*, 2005; Kyucak y Akcil, 2013).

En este contexto, la biorremediación enzimática toma relevancia al ser un método que permite la degradación natural del cianuro; sin embargo, existen dificultades para mantener condiciones óptimas que permitan el funcionamiento de estas enzimas. Mediante la ingeniería enzimática es posible realizar cambios en la cadena de aminoácidos para obtener enzimas quiméricas con propiedades mejoradas, por ejemplo, la tolerancia al pH alcalino o termoestabilidad (Wang, *et al.*, 2012; Crum, *et al.*, 2015b; Crum, *et al.*, 2016); no obstante, la ausencia de la estructura tridimensional en alta resolución de algunas de estas enzimas limita el avance en este campo.

Por consiguiente, es importante desarrollar investigaciones que posibiliten el entendimiento de las interacciones intramoleculares e intermoleculares de las enzimas. Para conocer la

información estructural a través de la cristalografía de rayos X, es necesario cristalizar la enzima a estudiar.

1.2 Justificación de la investigación

La biorremediación es un método efectivo y responsable con el medio ambiente e incluso hay estudios que avalan que puede ser más rentable que los métodos convencionales de remediación (Nelson, *et al.*, 1998; Kyucak y Akcil, 2013; Naymunda, 2017). Una de las formas de impulsar esta técnica es determinar variantes de enzimas que permitan la degradación sostenida del cianuro.

Debe señalarse que las enzimas degradadoras de cianuro conocidas se encuentran inactivas a pH alcalino, siendo esta la condición en la que se mantienen los residuos con cianuro para prevenir la volatilización de HCN (Martínková, *et al.*, 2015); por consiguiente, es esencial obtener variantes con tolerancia al pH alcalino para garantizar una remediación a largo plazo en su aplicación práctica.

La determinación de la estructura tridimensional permitirá conocer la naturaleza precisa de las interacciones, ubicar los aminoácidos relevantes en los dominios y las superficies de interacción y entender el impacto de los dominios altamente conservados y variables, de modo que se podrán proyectar las mutaciones de aminoácidos que puedan mejorar las propiedades de interés.

1.3 Objetivo general

- Expresar, purificar y cristalizar la proteína rCynD de *B. safensis* PER-URP-08.

1.4 Objetivos específicos

- Transformar *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS) usando un plásmido de expresión con el inserto del gen CynD de *B. safensis* PER-URP-08.
- Inducir y purificar la proteína rCynD de las células transformadas de *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS).
- Determinar la actividad enzimática de la proteína rCynD_{PER-URP-08}
- Cristalizar la proteína rCynD_{PER-URP-08} a diferentes pH y concentraciones de PEG 8000.

II. Marco teórico

2.1 Proteína CynD

Es una enzima también conocida como cianuro dihidratasa, que convierte el cianuro (CN^-) en amoníaco (NH_3) y formiato (HCOOH) mediante la vía hidrolítica (White, *et al.*, 1988; Meyers, *et al.*, 1993; Watanabe, *et al.*, 1998; Jandhyala, *et al.*, 2003, 2005). Por otro lado, se conoce que es de origen bacteriano, ha sido aislada de *Bacillus pumilus* cepas C1 y 8A3 (Meyers, *et al.*, 1993; Jandhyala, *et al.*, 2003), *Bacillus safensis* cepa PER-URP-08 (Justo, *et al.*, 2022), *Pseudomonas stutzeri* AK61 (Kunz, *et al.*, 1992; Watanabe, *et al.*, 1998; Sewell, *et al.*, 2003) y *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans* DF3 (Ingvorsen, *et al.*, 1991).

La CynD pertenece a la superfamilia de las nitrilasas (EC 3.5.5.1), las cuales se caracterizan por hidrolizar el triple enlace carbono-nitrógeno de los nitrilos ($\text{ROC}\equiv\text{N}$), poseer una tétrada catalítica CEEK (cisteína, glutamato, glutamato, lisina) y poseer en su estructura dimérica un pliegue $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ (Pace y Brenner, 2001; Thuku, *et al.*, 2009; Martínková, *et al.*, 2015; Benedik y Sewell, 2018; Mulelu, *et al.*, 2019). Además, presentan una estructura dimérica subyacente que puede extenderse formando grandes homooligómeros helicoidales (generalmente de 10-18 subunidades); se ha reportado que estos oligómeros espirales se diferencian de sus homólogos que no los forman por la presencia de dos inserciones (12-14 aminoácidos) y la extensión C-terminal (Sewell, *et al.*, 2005).

Se conoce la estructura tridimensional de CynD de *B. pumilus* (CynD_{pum}) de la cepa C1 (resolución=3.2 nm) y de *Pseudomonas stutzeri* (CynD_{stut}) de la cepa AK61 (resolución=2.5 nm) a través de la reconstrucción tridimensional de micrografías electrónicas. Por un lado, CynD_{pum} posee un dímero de 37kDa que forma un espiral compacto (9 nm de diámetro) de 18 subunidades a pH 6-8 y espirales mayores a pH 5.4 (Meyers, *et al.*, 1993; Jandhyala, *et*

al., 2003). Por otro lado, CynD_{stut} presenta una estructura espiral (radio exterior de 5.1 nm) de 14 subunidades (Sewel, *et al.*, 2003), siendo cada subunidad de 38kDa (Watanabe, *et al.*, 1998). En ambos casos cuentan con simetría axial y hélice izquierda. Cabe señalar que el alineamiento de sus secuencias de aminoácidos presenta 80% de identidad y 91% de similitud (Jandhyala, *et al.*, 2003).

2.2 Cianuro: toxicidad, fuentes y remediación

La palabra cianuro se emplea para describir moléculas que contienen el grupo $-C\equiv N$ en su composición (Kuyucak y Akcil, 2013). Por lo general, el cianuro está presente como cianuro libre o en complejo. La forma más nociva es el cianuro libre, dependiendo del pH de la solución se puede encontrar como anión de cianuro (CN^-) o cianuro de hidrógeno (HCN). Por otro lado, su origen puede ser natural a través del proceso de cianogénesis de plantas, hongos, algas y bacterias o artificial mediante gases de escape de los vehículos, incendios o quema de desechos y actividades industriales (industria minera, metalúrgica, química, galvanoplástica, entre otras) (Luque-Almagro, *et al.*, 2005; Services, 2002). Se incorpora como contaminante del agua principalmente por aguas residuales industriales (Jaszczak, *et al.*, 2017), por medio de fugas durante el transporte, fallas de presas de relaves, fallas en las actividades de carga y descarga, y filtraciones de vertederos y embalses (Yarar, 2001).

El HCN puede ingresar al organismo por inhalación, ingestión o absorción cutánea; a pesar de que el cianuro no se bioacumula en el cuerpo, se le considera como un compuesto altamente nocivo para los organismos aeróbicos ya que una baja exposición puede tener efectos letales en corto tiempo. Los iones CN^- tienen la capacidad de inhibir metaloenzimas incluyendo glutamato descarboxilasa, xantina oxidasa, superóxido dismutasa, NO sintasa, nitrito reductasa y citocromo c oxidasa (Jaszczak, *et al.*, 2017); el efecto en esta última se considera altamente crítico, ya que bloquea el transporte de electrones inhibiendo la

respiración celular (Antonini, *et al.*, 1971; Jones, *et al.*, 1984). En el caso de los humanos, esta reducción de oxígeno, afecta principalmente al sistema nervioso central y el control de la función respiratoria, lo cual puede conducir a la muerte (Services, 2002).

Los métodos de remediación pretenden convertir el cianuro en compuestos con menor toxicidad, insolubles y/o que no puedan ser absorbidos por los organismos; se pueden abordar por dos vías: la atenuación natural y los procedimientos de tratamiento planificados. La atenuación natural consiste en la colocación de las soluciones de cianuro en estanques expuestos a la atmósfera, donde principalmente el HCN se volatiliza y en segundo plano ocurren otras reacciones como hidrólisis, fotólisis, oxidación, formación de complejos o tiocianatos y precipitación. Los procedimientos planificados consisten en separaciones físicas (electrodeposición, tecnología de membranas, carbón activado, resinas, entre otros), métodos de destrucción química (ozono, cloración alcalina, peróxido de hidrógeno, volatilización de soluciones ácidas, proceso de dióxido de azufre/aire (INCO), ácido peroximonosulfúrico, entre otros) y procedimientos biológicos (plantas, hongos, protozoarios y bacterias) (Kyucak y Akcil, 2013; Arbabi, *et al.*, 2015; Nyamunda, 2017).

2.3 Cristalización de proteínas

Una de las técnicas más usada para resolver la estructura de las proteínas es la cristalografía de rayos X, donde es esencial cultivar cristales que se empaquen en una disposición simétrica a modo de mosaico. Para la formación de cristales, la solución debe alcanzar un estado de sobresaturación, donde la cantidad de proteínas en solución exceda su límite de solubilidad. De esta manera, las proteínas son expulsadas de la solución y forman pequeños agregados o núcleos ordenados que permitirán el crecimiento de cristales, a esta etapa se le conoce como fase de nucleación. La sobresaturación de la proteína se puede lograr

añadiendo precipitantes para reducir su solubilidad, como sales neutras, polímeros o disolventes orgánicos (Holcomb, *et al.*, 2017).

Las proteínas se pueden cristalizar a través de experimentos de difusión de vapor, donde la “gota” compuesta por una mezcla de solución de proteína (únicamente proteína o mezcla de proteína y aditivos) y solución precipitante (precipitante) se coloca en equilibrio con el precipitante colocado en un pocillo. La diferencia de concentraciones impulsa al vapor de agua a migrar desde la gota hacia el pocillo, a medida que esto ocurre, la proteína se concentra hasta la saturación, nucleación y posterior crecimiento de cristales de proteína. Existen dos técnicas ampliamente usadas: el “hanging drop”, donde la gota se coloca en un portaobjetos de vidrio siliconado invertido sobre el pocillo; y el “sitting drop”, donde la gota se coloca en un pedestal sobre el pocillo (Drenth, 2007; Bolanos-Garcia y Chayen, 2009).

III. Antecedentes

White *et al.* (1988), evidenciaron que cultivos de *Pseudomonas spp.* aisladas de aguas residuales industriales fueron capaces de degradar cianuro en amoníaco y formiato, a una tasa de 0.2-0.5 μg cianuro/mg de peso seco/min. Adicionalmente, comprobaron que los extractos libres de células degradaron 0.22-0.41 μg de cianuro/mg de proteína/minuto. Debe señalarse, que cultivaron las bacterias aisladas en matraces laterales de 300 mL con 50 mL de medio de lactato agitados a 200 rpm a 30°C.

Meyers *et al.* (1991), comprobaron que *B. pumilus* C1 tiene la capacidad de degradar cianuro libre en ausencia de cofactores. Además, señalaron que la actividad degradadora está relacionada a la fase de crecimiento exponencial tardía/estacionaria temprana. También evidenciaron que la degradación ocurrió rápidamente de manera intracelular y en los extractos libres de células. Por último, sugirieron que Mn^{2+} es requerido en el medio de

crecimiento para la producción de la actividad degradante del cianuro de las células de *B. pumilus*.

Meyers *et al.* (1993), observaron que CynDpum de la cepa C1 presentó una actividad óptima a 37°C y pH 7.8-8.0, logrando una constante de Michaelis-Menten (K_m) igual a 2.56 ± 0.48 mM y una velocidad máxima (V_{max}) $88,03 \pm 4,67$ mmol/min/mg/L; mientras que al agregar 10 μ m de Cr^3 la K_m se duplicó a 5.28 ± 0.38 mM y la V_{max} aumentó a $197,11 \pm 8,51$ mmol/min/mg/L.

Watanabe *et al.* (1998), evidenciaron que la actividad degradadora de *P. stutzeri* AK61 fue independiente de la presencia de cianuro. Adicionalmente, sugirieron que la CynDstut funcional es una proteína agregada de 38 kDa, y que presentó una actividad óptima a 30°C y pH 7.5, logrando una K_m de 1.7 mM.

Nagasawa *et al.* (2000), evidenciaron que la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 permaneció inactiva en su forma homodimérica de 80kDa; no obstante, se convirtió en una enzima activa luego de una incubación con benzonitrilo, donde se observó que se ensambla formando un oligómero de 410kDa, el cual propusieron que fuera un decámero.

Pace *et al.* (2000), cultivaron cristales de la nitrilasa NitFhit de *Caenorhabditis elegans* empleando el método de “hanging drop” a temperatura ambiente, donde mezclaron 2 μ L de la solución de proteína (7 mg mL⁻¹ en NaHEPES 10 mM pH 7, NaCl 50 mM, DTT 5 mM) y 2 μ L del precipitante (2-metil-2,4-pentanodiol al 38% (MPD)) para obtener la gota. Además, usaron 1 mL de precipitante en el pocillo, y luego de una semana se sembraron los microcristales individuales en gotas similares y se equilibraron frente a MPD al 35% por un mes, obteniendo cristales con dimensiones de $\sim 100 \mu$ m x 200 μ m x 300 μ m. Cabe mencionar, que el NitFhit es un complejo tetramérico de 200 kDa.

Jandhyala *et al.* (2003), evidenciaron mediante la reconstrucción tridimensional por microscopía electrónica que la CynDpum de la cepa C1 forma una espiral de 18 subunidades a pH 8. Con este propósito, realizaron su clonación y expresión empleando pET26b y *E. coli* BL21(DE3)(pLysS); se debe destacar, que insertaron 6 histidinas en la C-terminal (6-His) para simplificar la posterior purificación por cromatografía de afinidad con resina de níquel. Además, observaron que el crecimiento óptimo de *E. coli* se logró a 30 y 37 °C. También demostraron que CynDpum se encontró en la cepa 8A3 exhibiendo una actividad degradadora comparable a C1.

Johnston *et al.* (2003), cristalizaron una nitrilasa hipotética P018 de levadura que tiene similitud de secuencia con las hidrolasas CN. Con esta finalidad, los cristales fueron cultivados usando el método “sitting drop”, donde se mezclaron volúmenes iguales de proteína (3 mg/mL) y precipitante (PEG 8000 al 10% en Hepes 100 mM pH 7, con cloruro de magnesio 5 mM) para obtener la gota. Asimismo, se emplearon 800 µL de precipitante en el pocillo. Por último, se obtuvieron cristales de 300 µm x 400 µm x 100 µm luego de una semana de equilibrio a temperatura ambiente. Cabe mencionar que el uso de concentraciones más altas de proteína formó cristales maclados.

Sewel *et al.* (2003), evidenciaron a través de la reconstrucción tridimensional por microscopía electrónica que la CynDstut de la cepa AK61 presentó una estructura espiral de 14 subunidades. Adicionalmente sugirieron que la interacción entre subunidades se produjo a través de la superficie A (para formar el dímero) y C (para formar el oligómero).

Sakai *et al.* (2004), consiguieron cristalizar la nitrilasa hipotética PH0642 de *Pyrococcus horikoshii* con 29.9 kDa, que tiene similitud de secuencia con las proteínas de la superfamilia de nitrilasas. Para este fin, emplearon el método de “hangin drop” a 20°C, usando una gota

de 10 μL (mismo volumen de solución de proteína y precipitante); y un precipitante compuesto por 100 mM de acetato de sodio, pH 4.1 y 45% MPD.

Jandhyala *et al.* (2005), realizaron la expresión y purificación de CynDpum y CynDstut empleando *E. coli* BL21(DE3)(pLysS). Primero se cultivó la *E. coli* transformada en caldo Luria-Bertani (LB) (suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cloranfenicol, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamicina) durante la noche a 30°C y 250 rpm. Luego una alícuota se inoculó en medio LB fresco (1:100) y se incubaron en matraces de 2 L a 30°C o 37°C con agitación, al alcanzar una OD_{600nm} de 0.5, se agregó β -D-1- tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM al cultivo para inducir la producción de CynDpum. Posteriormente se incubó por 3-10 horas a 30°C con agitación, y se centrifugó durante 30 minutos a 5800 rpm y 4°C. Por último, los pellets de los cultivos fueron resuspendidos, lisados y resuspendidos (tampón fosfato 20 mM-NaCl 100 mM (pH 7,8) más imidazol 10 mM (pH 7,8)) y las enzimas (marcadas con 6-His) fueron purificadas utilizando cromatografía de afinidad de iones de níquel inmovilizado con la ayuda de una columna de quelación de metales HiTrap de 5 mL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) cargada con 2.5 mL NiSO₄ 0.1 M.

Tsai *et al.* (2006), obtuvieron cristales cúbicos de la nitrilasa CN-hidrolasa de *Xanthomonas campestris* (XC1258), mediante el método de “sitting drop”, empleando para la gota 0.5 μL de solución de proteína (28 mg mL⁻¹ en Tris 20 mM a pH 8 y NaCl 80 mM) y 0,5 μL de precipitante. Así mismo, se empleó como precipitante cacodilato de sodio 0.1 M, pH 6.5 y citrato de sodio 1 M; alcanzando el equilibrio luego de 3 días a 295 K. Por otro lado, se mezclaron 1,5 μL de solución de proteína y 1.5 μL de precipitante para la gota, y luego de una semana de equilibrio a 277 K se obtuvieron cristales adecuados para la difracción de rayos X, cuyo tamaño fue de 150 μm x 150 μm x 100 μm .

Andrade *et al.* (2007), consiguieron cristalizar la nitrilasa acilamida amidohidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa* a 305 K, mediante el método de “sitting drop” luego de unas horas de equilibrio, alcanzando su tamaño máximo a las 24-30 horas. Para obtener la gota se mezcló 5 μL de la enzima (25 mg mL^{-1}) con 2 μL de precipitante (15% (v/v) PEG 4000 y solución saturada al 5% (v/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a pH 6.8) y se usaron 500 μL de precipitante en el pocillo. Cabe señalar que la enzima fue hexamérica y estuvo compuesta por seis subunidades idénticas con un peso molecular de aproximadamente 38 kDa.

Hung *et al.* (2007), emplearon el método de “hanging drop” para cristalizar la nitrilasa AmiF formamidasa de *Helicobacter pylori*. Con este fin, la gota estuvo compuesta por 1 μL de solución de proteína (10 mg/mL en Tris-HCl 50 mM a pH 8) y 1 μL de precipitante (cacodilato de sodio 0.1 M a pH 6.5, tiocianato de potasio 0.15 M y PEG 550 MME al 20%). Se obtuvieron cristales de un tamaño máximo de $\sim 600 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, luego de una equilibración de 2 días a 20°C.

Lundgren *et al.* (2007), lograron la formación cristales de la nitrilasa β -alanina sintasa (βAS) de *Drosophila melanogaster*, a través del método “hanging drop” obteniendo un tamaño máximo de $150 \times 50 \times 20 \mu\text{m}$. Adicionalmente, observaron que los cristales se formaron luego de 14-30 días de equilibrio a 293° K usando como precipitante 1 mL de PEG 3350 al 9-12% (p / v), fosfato-citrato 0.1 M a pH 4.2 y NaCl 0.2 M; Por otro lado, las gotas de 4 μL consistieron en volúmenes iguales de solución de proteína ($6\text{--}12 \text{ mg mL}^{-1}$ βAS y aditivos 5 mM N-carbamil- β -alanina y 5%(v/v) glicerol) y precipitante.

Thuku *et al.* (2007), observaron que la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 presentó un oligómero activo de 480 kDa y un dímero inactivo de 80 kDa. Así mismo, al escindir 39 aminoácidos de la C-terminal, la enzima formó largas hélices activas, similares a la enzima nativa.

Barglow *et al.* (2008), obtuvieron cristales en forma de X de la nitrilasa-2 de ratón (mNit2) con un tamaño de hasta 500 μm empleando el método de “hanging drop” a temperatura ambiente. Para ello, emplearon como precipitante CaCl_2 250 mM, Hepes 100 mM a pH 8 y polietilenglicol monometil éter 550 (PEG MME 550) al 30% (v/v), con 12 mg/mL de mNit2, donde las gotas consistieron en 1 μL de precipitante y 1 μL de solución de proteína.

Raczynska *et al.* (2011), cristalizaron la nitrilasa termoactiva de *Pyrococcus abyssi* (PaNit) mediante el método de “hanging drop” usando como precipitante PEG 550 MME al 35%, MgCl_2 o $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ 0.2 M y TrisHCl 0.2 M a pH 7.5.

Wang *et al.* (2012), identificaron que los mutantes de CynDpum con los alelos “C5” (Q86R+E96G+D254E) y “H7” (E35K+Q322R+E327G) permitieron que la *E. coli* transformada degradara cianuro a pH 10, mientras que la enzima nativa permaneció inactiva sobre un pH 9. También demostraron que para los mutantes simples y dobles de C5 y H7 la actividad disminuyó a pH 10, a excepción de la mutante única E327G, la cual tuvo una actividad comparable a la triple mutante original (H7). Por último, demostraron que existe una correlación entre la formación mejorada de fibras y la estabilidad mejorada.

Zhang *et al.* (2014), obtuvieron cristales de la nitrilasa de *Syechocystis sp.* PCC6803 (Nit6803) con un tamaño de 300 μm x 300 μm x 100 μm . Con este objetivo, la cristalización se desarrolló a 20°C luego de 3 días, empleando como gota una mezcla de 1.0 μL de proteína y 1.0 μL de precipitante (15% de PEG 5000 MME, 1 mM de ditiotretitol, 3% de tascimate y 100 mM de HEPES a pH 6.8).

Crum *et al.* (2015a), realizaron deleciones del C-terminal de la CynDpum, la CynDstut y la cianuro hidratasa de *Neurospora crassa* (CHTCras), observando que la CynDpum $\Delta 303$ y CynDstut $\Delta 330$ mostraron inestabilidad al incubarlos a 38°C con respecto a la enzima nativa, mientras que CHTCras $\Delta 339$ no mostró cambios significativos. Por otro lado, encontraron

que la actividad enzimática disminuyó en más del 50% para CynDpum Δ 293, Cynstu Δ 310, CHTcras Δ 339 y Δ 323; y se perdió para CynDpum Δ 279, Cynstu Δ 302 y CHTcras Δ 307; por el contrario, la CynDpum Δ 303 y Cynstu Δ 330 mantuvieron la actividad en 87.5% y 97.3% respectivamente.

Crum *et al.* (2015b), evaluaron la actividad de un híbrido entre CynDpum (aminoácidos 1-286) y CynD-stut (aminoácidos 287-335), el cual mostró una estabilidad 15-20 veces mayor a 42°C en comparación a la enzima nativa; además mostró su mayor actividad a pH 9 y retuvo 40% de esta actividad a pH 9.5. También sugirieron que el C-terminal está involucrado en interacciones con la superficie de dimerización A y la superficie de oligomerización C; sin embargo, mencionaron que no se puede conocer la naturaleza precisa de las interacciones debido a la falta de datos estructurales de alta resolución.

Kandasamy, *et al.* (2015), aislaron diez cepas bacterianas de las aguas residuales de una fábrica de yuca, entre ellas *B. pumilus*, que presentaron la capacidad de degradar cianuro en concentraciones de hasta 5 mM. Además, sugirieron que la degradación ocurrió por una hidrólisis directa del cianuro, ya que encontraron en el sobrenadante de los cultivos amoníaco y el formiato.

Crum *et al.* (2016), encontraron que las mutaciones en los aminoácidos E327K, K93R y D172N de CynDpum degradaron cianuro a mayor velocidad a pH 7.7 en comparación a la nativa. Además, indicaron que estas mutaciones aumentaron la termoestabilidad. Por otro lado, le atribuyeron a la mutación A202T la inactivación de la enzima. Adicionalmente construyeron un modelo por homología empleando Nit6803 con 31% de identidad (PDB ID: 3WUY), donde se mostraron que CynD tuvo una inserción de 2 residuos (cerca al aminoácido 224); y una delección de 7 residuos (cerca al aminoácido 190) que acortó la hélice α de la superficie A, la cual es la interfase entre monómeros. De acuerdo al modelo en

mención, el aminoácido 93 estuvo ubicado en la superficie D/E cerca de una interfaz; el aminoácido 172 estuvo ubicado en la superficie A y dirigido hacia el sitio activo; el aminoácido 202 estuvo ubicado en la superficie A; y el aminoácido 327, que corresponde a la región C-terminal, no se visualizó.

Park *et al.* (2016a), produjeron CynDpum a partir de *E. coli* BL21(DE3)(pLysS) transformada usando pET28a con la inserción de la enzima. Para ello las células se cultivaron a 37 ° C hasta obtener una DO600 entre 0.4 y 0.6, se indujeron añadiendo IPTG a 1 mM y se transfirieron a 30°C durante 2-3 horas. Se debe señalar que la enzima fue etiquetada con 6-His lo que permitió su purificación usando “HisPur™ Cobalt Spin Column”.

Park *et al.* (2016b), expresaron CynDpum de *E. coli* BL21(DE3)(pLysS) transformada con este gen, empleando caldo LB con antibióticos como medio de cultivo. Con este fin se realizó el cultivo por una noche, luego este fue diluido (200 µl en 3 mL de medio) y se cultivó a 37 ° C hasta alcanzar una DO600 entre 0.5 y 0.7; la expresión se indujo usando IPTG a 1 mM, posteriormente se transfirieron a 37°C durante 1-2 h.

Lu *et al.* (2017), obtuvieron cristales hexagonales de la nitrilasa apolipoproteína N-acil transferasa de *E. coli* con un tamaño de 300 x 100 x 20 µm, usando el método de “hanging drop”. Para lograrlo, la cristalización se realizó a 16°C usando como precipitante Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) y PEG 550 MME al 26% (v/v) suplementado con dos detergentes (n-Heptil-b-D-tioglucopiranosido y CHAPSO).

Carmona-Orozco y Panay (2019), realizaron la clonación y expresión de CynDpum empleando pD451-BpumCynD (con etiqueta 6-His) y *E. coli* BL21(DE3)(pLysS). Primero se cultivó la *E. coli* transformada en caldo LB durante 16 horas a 37°C y 300 rpm. Luego una alícuota se inoculó en medio LB fresco (1:100) suplementado con kanamicina (25

$\mu\text{g/mL}$); al alcanzar una OD_{600nm} de 0.5-0.9, se agregó IPTG 0,4 mM al cultivo para inducir la producción de CynD_{pum} y se incubó por 4 horas. Por último, centrifugaron el cultivo durante 30 minutos a 5800 rpm y 4°C, y los sedimentos que no se usaron inmediatamente se almacenaron a -80°C. También verificaron la expresión de CynD usando SDS-PAGE, y emplearon como control negativo un cultivo sin antibióticos y sin transformar.

Mulelu *et al.* (2019), determinaron la estructura por criomicroscopía electrónica (resolución 3.4 Å) de la nitrilasa 4 de *Arabidopsis thaliana*, una nitrilasa helicoidal activa, encontrando que cuenta con un núcleo $\alpha\beta\beta\alpha$ dispuesto en dímeros a través de la interfaz A y la tétada catalítica CEEK. Adicionalmente sugirieron que la C-terminal influye en la oligomerización y la termoestabilidad.

Justo *et al.* (2022), aislaron una cepa de *Bacillus* que tiene la capacidad de degradar cianuro y luego del análisis del genoma la denominaron *Bacillus safensis* PER-URP-08. Además, identificaron la presencia de la enzima CynD (CynD_{PER-URP-08}), cuyo monómero presenta una masa de 38.5 kDa.

IV. Materiales y métodos

4.1 Lugar de ejecución

Laboratorio del Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo.

4.2 Tipo y diseño de investigación

La investigación fue experimental y factorial.

4.3 Variables

4.3.1 Variables independientes:

- Concentración de plásmido: 67,8; 135,6 y 271,2 ng/50 μ L de bacterias competentes.
- Temperatura de inducción: 18, 30, 37°C.
- Tipo de elución: Isocrática, en gradiente.
- pH del ensayo enzimático: 8 y 9.
- Condiciones de cristalización
 - o pH: 10,5; 11; 11,5.
 - o Concentración de PEG 8000: 6, 8, 10 y 12%

4.3.2 Variable dependiente:

- Eficiencia de transformación: número de colonias por ng de plásmido.
- Concentración de rCynD_{PER-URP-08} inducida: intensidad de banda.
- Pureza de rCynD_{PER-URP-08}: ratio de intensidad de banda.
- Actividad degradante de rCynD_{PER-URP-08}: K_m y k_{cat} .
- Tamaño de cristales.

4.4 Operacionalización de las variables

Tabla 1. Operacionalización de las variables

Objetivos específicos	Variable	Definición	Tipo de variable		Indicador
Transformar <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)(pLys S) usando un plásmido de expresión con el inserto del gen CynD de <i>B. safensis</i> PER-URP-08.	Concentración de plásmido.	Cantidad de plásmido presente en la transformación de las bacterias competentes.	Independiente	Cuantitativa	67,8; 135,6 y 271,2 ng/50 μ L de bacterias competentes.
	Eficiencia de transformación.	Capacidad de inserción del plásmido en las bacterias competentes.	Dependiente	Cuantitativa	Número de colonias por ng de plásmido.
	Temperatura de inducción	Magnitud física que refleja la cantidad de calor empleada en la inducción.	Independiente	Cuantitativa	18, 30, 37°C.
Inducir y purificar la proteína rCynD _{PER-URP-08} de las células transformadas de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)(pLys S).	Tipo de elución.	Condiciones de eluyente durante la purificación.	Independiente	Cualitativa	Isocrática y en gradiente.
	Concentración de rCynD inducida.	Cantidad de rCynD presente en la banda de SDS-PAGE luego de la inducción.	Dependiente	Cuantitativa	Ratio de intensidad de banda de rCynD (inducido / no inducido).
	Pureza de rCynD.	Proporción de intensidad de banda de rCynD respecto a todas las bandas del gel.	Dependiente	Cuantitativa	Ratio de intensidad de bandas (rCynD/total de bandas).
Determinar la actividad enzimática de la proteína rCynD _{PER-URP-08} mediante el “Ammonia Assay Kit”	pH	Concentración de iones de hidrógeno presentes en el “Ammonia Assay Reagent”.	Independiente	Cualitativa	8, 9.
	Actividad degradante de rCynD.	Capacidad de la proteína de desintegrar un sustrato específico.	Dependiente	Cualitativa	Valores de K_m y k_{cat} .
Cristalizar la proteína rCynD _{PER-URP-08} a diferentes pH y concentraciones de PEG 8000.	pH	Concentración de iones de hidrógeno presentes en la solución precipitante.	Independiente	Cuantitativa	10,5; 11; 11,5
	Concentración de PEG 8000	Cantidad de soluto presente en la solución precipitante.	Independiente	Cuantitativa	6, 8, 10 y 12%

Tamaño de Dimensiones físicas Dependiente Cuantitativa μm .
 cristales de los cristales
 obtenidos.

4.5 Procedimientos y análisis de datos

4.5.1 Transformación de *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS) usando un plásmido de expresión con el inserto del gen CynD de *B. safensis* PER-URP-08.

El plásmido pET-11a con un inserto del gen CynD de *B. safensis* PER-URP-08 fue donado por el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo y conservado a -16°C . Es importante mencionar que el plásmido expresante cuenta con un gen de resistencia a la ampicilina, además, el gen de la proteína de interés está marcado con 6 histidinas insertadas en el extremo C-terminal (*Anexo 1*). Se determinó la concentración del plásmido y, a continuación, se realizaron diluciones seriadas obteniendo las siguientes concentraciones: 67,8, 135,6 y 271,2 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Seguidamente, se inocularon 0,5 μL de los plásmidos en bacterias *E. coli* BL21(DE3)(pLysS) competentes, se incubaron a 42°C por 1 minuto e inmediatamente después se colocaron en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se agregó 1 mL de caldo 2XTY (levadura y triptona) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Después, se sembraron por extensión 100 μL del cultivo en agar 2XTY/Amp (suplementado con ampicilina) y se incubaron a 37°C por 18 horas. Luego se realizó un conteo de las colonias formadas de acuerdo a la concentración de plásmido empleado. Por último, se determinó si hubo diferencias significativas entre las concentraciones de plásmido expresante empleadas como inóculo en la transformación mediante el método de Kruskal-Wallis. Cabe señalar que estas inoculaciones y las que se mencionarán fueron realizadas en la cámara flujo laminar. También es necesario mencionar que este ensayo se replicó 6 veces.

4.5.2 Inducción y purificación de la proteína rCynD_{PER-URP-08} de las células transformadas de *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS).

Para estandarizar la temperatura de inducción se inocularon 3 colonias resistentes a la ampicilina en 5 mL de caldo 2XTY/Amp y se incubaron a 37°C por 24 horas. A continuación, una alícuota fue tomada e inoculada en un matraz con 100 mL de caldo 2XTY/Amp. Luego de 6 horas, cuando el cultivo alcanzó un OD₆₀₀ de 0.78, se añadieron 30 µL de IPTG y se incubaron las bacterias en agitación constante a 18, 30 y 37°C por 24 horas. Posteriormente, la concentración de rCynD_{PER-URP-08} inducida fue calculada utilizando SDS-PAGE y el programa ImageJ. Por último, se determinó si hubo diferencias significativas entre las temperaturas usadas para la inducción mediante el método de Kruskal-Wallis. Cabe señalar que este ensayo se replicó 2 veces.

Para realizar la purificación se empleó el procedimiento descrito previamente, sin embargo, la inducción se realizó empleando un inóculo inicial de 5 mL de cultivo y 1 L de caldo 2XTY/Amp. Una vez obtenidas las bacterias sobreexpresantes de rCynD_{PER-URP-08}, estas fueron lisadas empleando un sonicador por 7 minutos (15 seg pulso, 35 seg pausa). Este paso y los subsecuentes fueron realizados a 4°C. Luego, las muestras lisadas fueron centrifugadas a 15 000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante fue utilizado para los ensayos de purificación. Después, se realizó una cromatografía por afinidad donde se empleó una columna HiTrap 5 mL Chelating HP cargada con NiSO₄ 300 mM, para ligar las 6 histidinas ubicadas en el C-terminal de la proteína de interés; al realizar la elución se consideró el cambio gradual (en gradiente) o total (isocrática) de la inyección de buffer lisis (imidazol 20 mM, NaCl 100 mM, Tris 20 mM a pH 8) por buffer de elución (imidazol 500 mM, NaCl 100 mM, Tris 20 mM a pH 8). A continuación, se realizó una cromatografía por exclusión de tamaño empleando una columna HiLood

26/600 Superdex 200 y buffer GF (CAPs 20 mM, NaCl 100 mM, pH 11) para eliminar residuos. Ambas cromatografías se realizaron usando el sistema de purificación AKTA. Seguidamente, se concentraron las fracciones de interés en una celda de ultrafiltración Amicon usando una membrana PM30 hasta obtener 500 μ L. Posteriormente, la concentración y pureza de rCynD fue calculada utilizando SDS-PAGE y el programa ImageJ. Por último, se determinó si hubo diferencias significativas entre los tipos de elución empleados mediante el método de Wilcoxon.

4.5.3 Determinación de la actividad enzimática de la proteína rCynD_{PER-URP-08}.

Para determinar la actividad enzimática, se realizó la purificación empleando el procedimiento descrito previamente, sin embargo, la cromatografía por exclusión de tamaño se realizó empleando buffer GF a pH 8 (Tris 20 mM, NaCl 100 mM). Se realizaron los ensayos de degradación de cianuro con el “Ammonia Assay Kit” para evaluar la actividad de la proteína purificada. En una placa de 96 pocillos se agregaron a las filas A, B y C 100 μ L de “Ammonia Assay Reagent” (ARR) (pH 8 o 9 según corresponda), 5 μ L de CynD 11,1 μ M y 1 μ L de L-glutamato dehidrogenasa (GDH). Luego, se agregaron a la fila D 50 μ L de buffer GF (pH 8 o 9 según corresponda) y se realizaron diluciones de NaCN 1,11 5 μ M, obteniendo concentraciones finales 0.0075, 0.0125, 0.015, 0.025, 0.0325, 0.05, 0.0525, 0.0625, 0.1, 0.125, 0.25, 0.5 de NaCN (*Figura 1*).

Para preparar las soluciones de precipitación, se emplearon 100 μL de solución de CAPS como buffer (pH 10.5, 11, 11.5), 500 μL de solución PEG, 100 μL de solución de aditivos y 300 μL de agua miliQ.

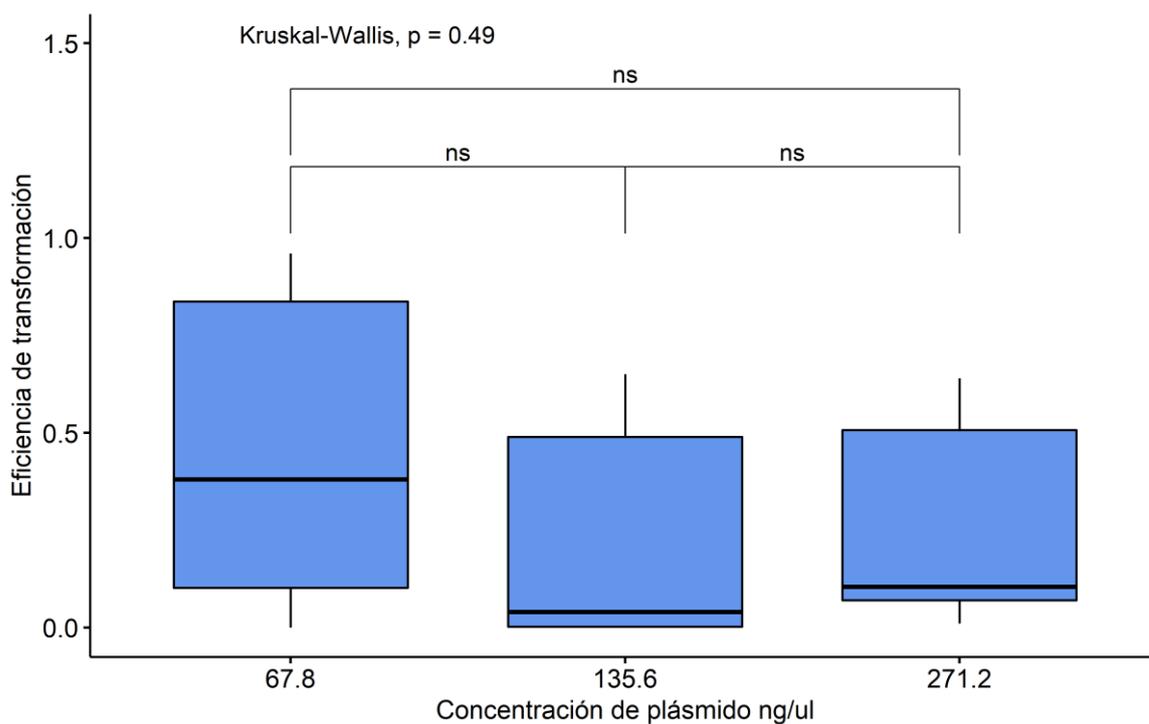
Posteriormente, se tomó una placa de cristalización y se agregaron 100 μL de cada solución de precipitación en el pocillo. Luego, 1 μL de la proteína purificada se colocó en el pedestal y se mezcló con 1 μL de la solución del pocillo. Posteriormente, se selló la placa de cristalización, se incubó a 18°C y se revisó durante 4 semanas para verificar la formación de cristales con ayuda de un estereoscopio. Seguidamente, se realizó la medición de los cristales formados empleando un lente ocular con escala. Por último, se determinó si hubo diferencias significativas en el tamaño de los cristales entre las condiciones de cristalización empleadas mediante el método de Kruskal-Wallis.

V. Resultados

5.1 Transformación de *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS) usando un plásmido de expresión con el inserto del gen CynD de *B. safensis* PER-URP-08.

El plásmido pET-11a con el inserto del gen CynD de *B. safensis* fue transformado en la cepa BL21(DE3)(pLysS) de *E. coli* usando 3 concentraciones: 67,8; 135,6 y 271,2 ng/ μ L. Luego se realizó el conteo de colonias formadas y se calculó la eficiencia de la transformación (número de colonias formadas/concentración de plásmido) (**Anexo 2 y Anexo 3**). Por último, se determinó mediante el método de Kruskal-Wallis que no existen diferencias significativas ($p=0,49$) en la eficiencia de transformación entre las concentraciones de plásmido empleadas en la transformación (**Figura 3**).

Figura 3. Eficiencia de transformación de acuerdo a la concentración de plásmido inoculado.



5.2 Inducción y purificación de la proteína rCynD_{PER-URP-08} de las células transformadas de *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS).

Se expresó rCynD_{PER-URP-08} en *E. coli*, BL21(DE3)(pLysS) con IPTG (300 μ M) a 18, 30 y 37°C por 18 horas. Para evaluar la expresión de rCynD_{PER-URP-08} entre las temperaturas de inducción se empleó Image J tomando como referencia los resultados del SDS-PAGE (**Figura 4** y **Figura 5**). Para ello, se calculó la intensidad de las bandas del rCynD_{PER-URP-08} en los cultivos no inducidos e inducidos, y de una banda observable en todas las muestras que se empleó para normalizar todos los datos (rCynD/Norm) (**Anexo 4**). Posteriormente, se calculó la concentración de rCynD_{PER-URP-08} usando las ratios del cultivo no inducido y los inducidos (Ratio I/ Ratio NI) (**Anexo 4**). Por último, se determinó mediante el método de Kruskal-Wallis que no existen diferencias significativas entre las temperaturas usadas para la inducción ($p=0,1$) (**Figura 6; Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Figura 4. SDS-PAGE del primer ensayo de inducción. NI: no inducido. 18°: inducción a 18°C. 30°: inducción a 30°C. 37°: inducción a 37°C.

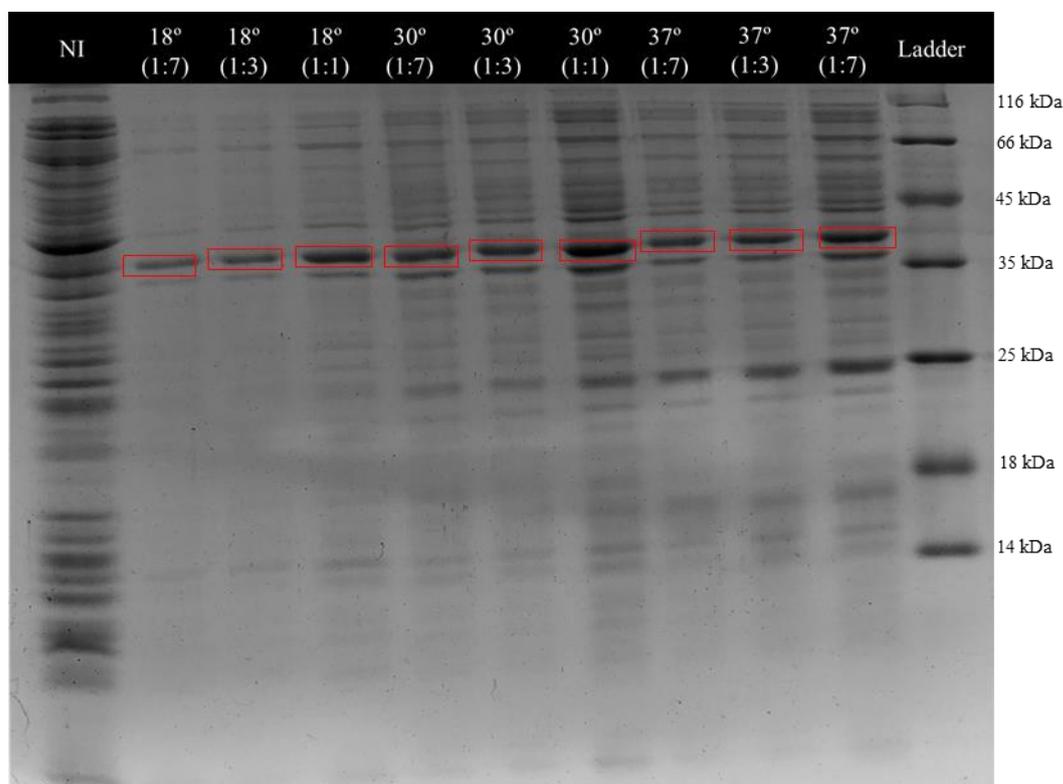


Figura 5. SDS-PAGE del segundo ensayo de inducción. NI: no inducido. 18°: inducción a 18°C. 30°: inducción a 30°C. 37°: inducción a 37°C.

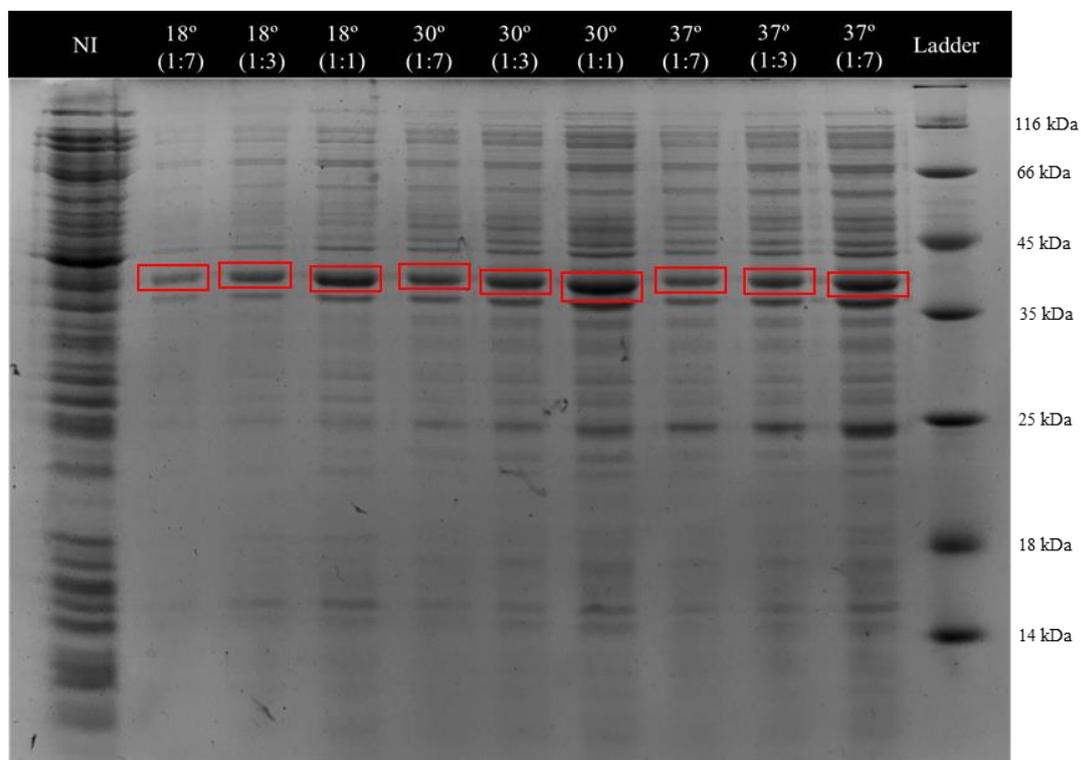
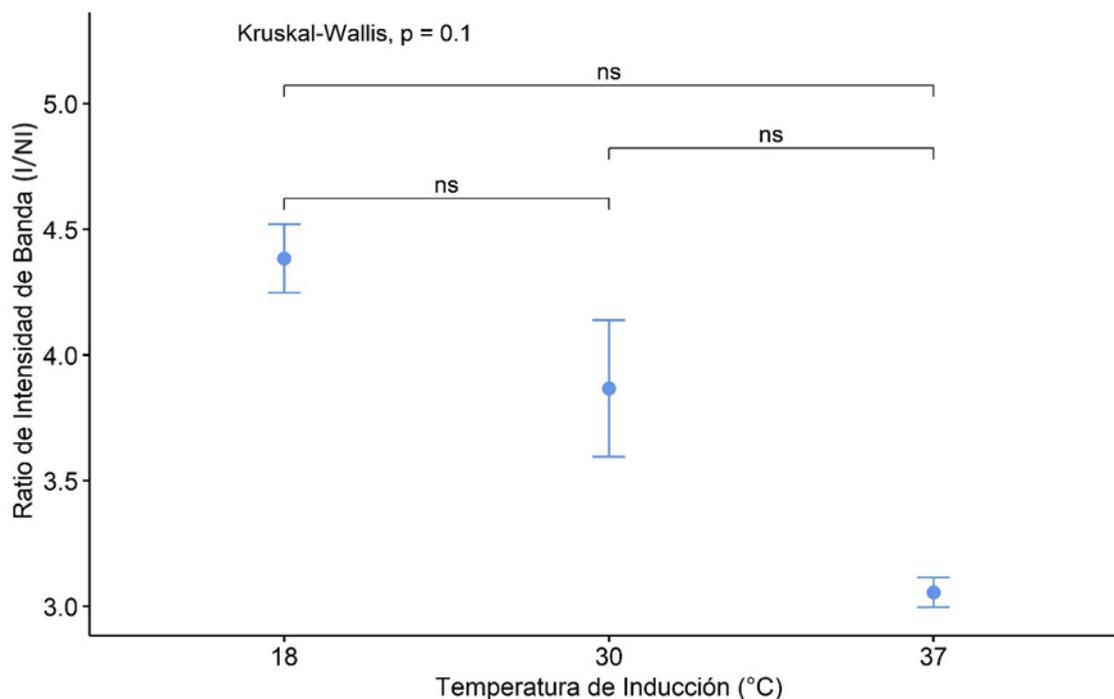


Figura 6. Concentración de rCynD_{PER-URP-08} inducida en diferentes temperaturas.



La rCynD_{PER-URP-08} fue purificada mediante una columna HiTrap usando una elución isocrática y en gradiente (**Figura 7** y **Figura 8**), seguida de una cromatografía por exclusión de tamaño (10-600 KDa) (**Anexo 7** y **Anexo 9**). Para evaluar la pureza de la proteína obtenida con elución en gradiente e isocrática, se realizó un SDS-PAGE (**Figura 9**, **Figura 10** y **Figura 11**). Luego, tomando como referencias estos resultados, se empleó Image J para medir la intensidad de las bandas del rCynD_{PER-URP-08} y del resto de bandas del gel. Posteriormente, se calculó la ratio entre la intensidad de rCynD_{PER-URP-08} y la intensidad total (rCynD/Total) para estimar la pureza de la proteína (**Anexo 6**). Se obtuvo un porcentaje de pureza similar de rCynD_{PER-URP-08} al emplear una elución en gradiente (\bar{x} =0,51) o una elución isocrática (\bar{x} =0,50) (**Anexo 6**). Mediante el método de Wilcoxon se determinó que no existen diferencias significativas entre los tipos de elución empleados ($p=1$) (**Figura 12**).

Figura 7. *Cromatograma de cromatografía por afinidad con elución en gradiente.*

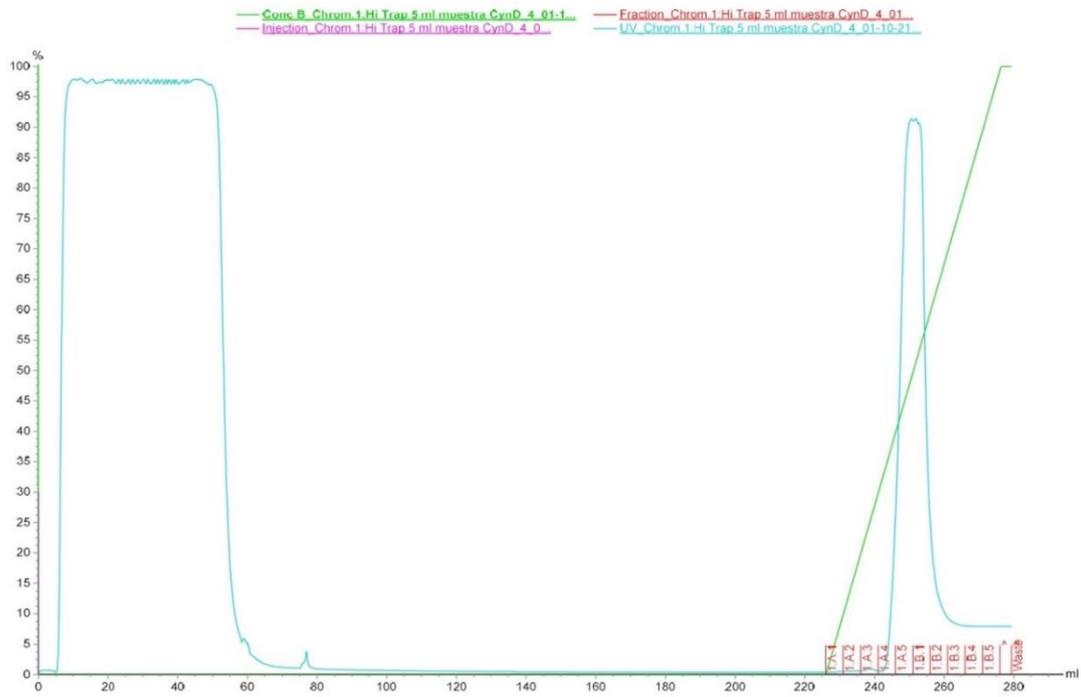


Figura 8. *Cromatograma de cromatografía por afinidad con elución isocrática.*

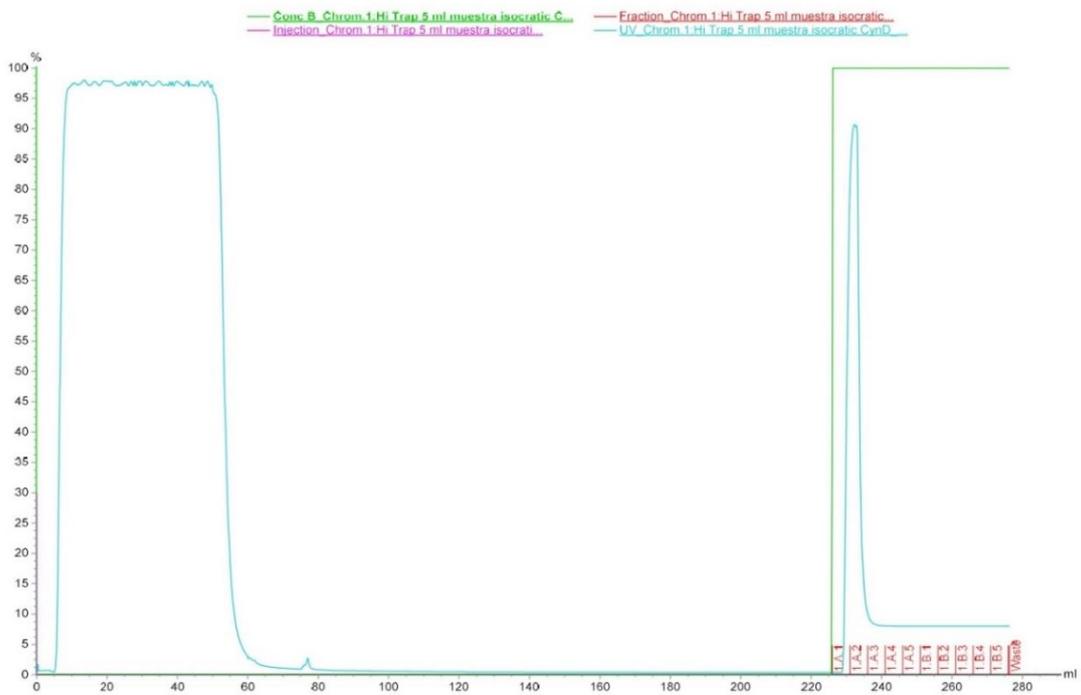


Figura 9. *SDS-PAGE de la purificación usando cromatografía por afinidad con elución en gradiente y cromatografía por exclusión de tamaño.*

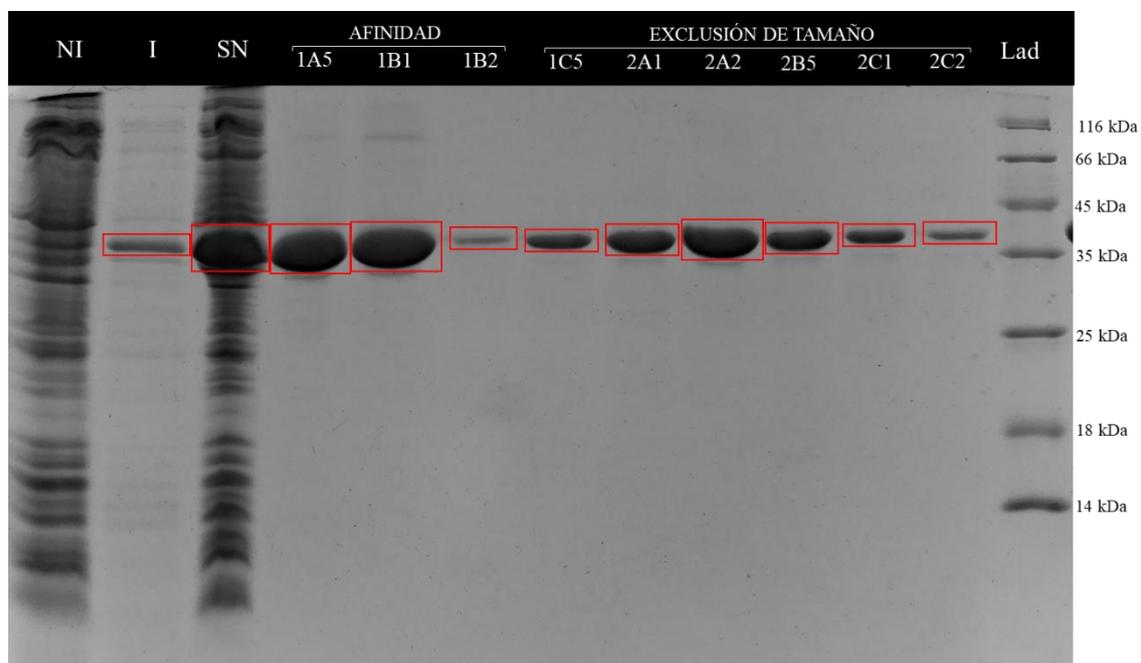


Figura 10. *SDS-PAGE de la purificación usando cromatografía por afinidad con elución isocrática y cromatografía por exclusión de tamaño.*

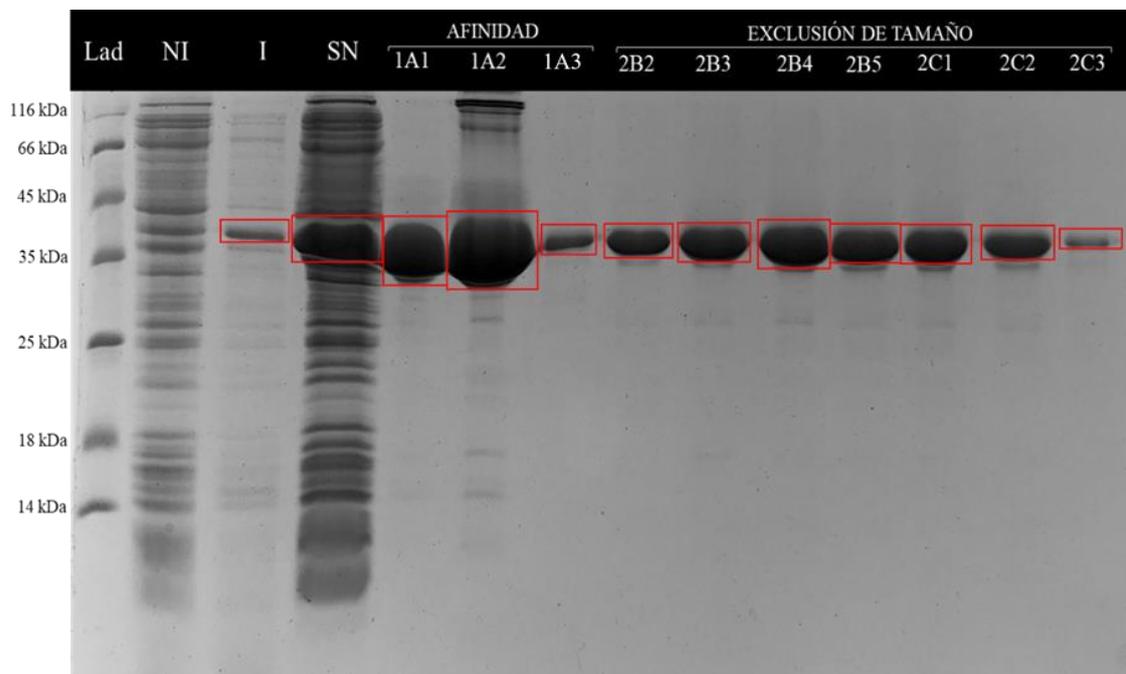


Figura 11. SDS-PAGE de las fracciones de interés de las cromatografías con elución en gradiente e isocrática respectivamente.

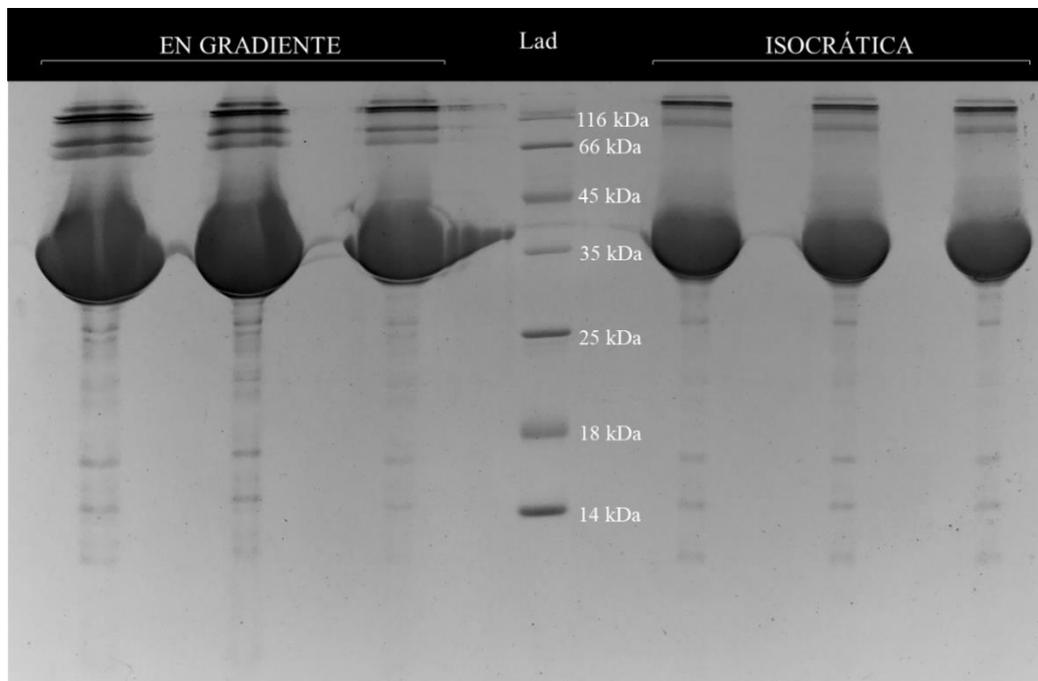
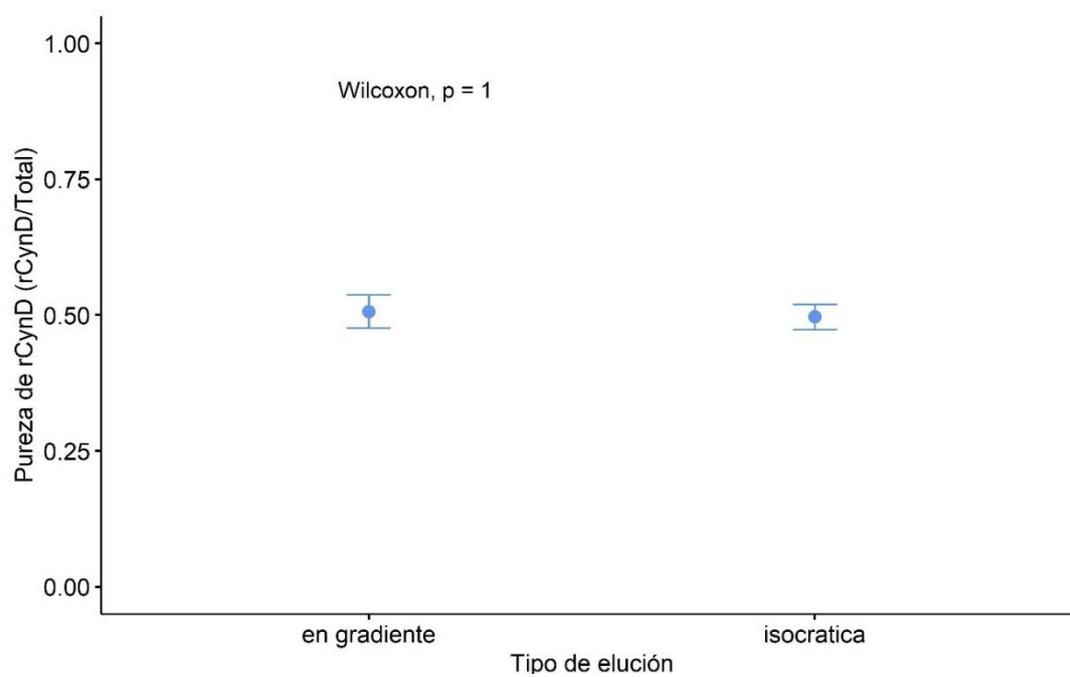


Figura 12. Pureza de rCynD_{PER-URP-08} obtenida empleando cromatografía con elución en gradiente e isocrática.



5.3 Determinación de la actividad enzimática de la proteína rCynD_{PER-URP-08}.

La proteína rCynD_{PER-URP-08} purificada fue incubada con diferentes concentraciones de NaCN a dos pHs diferentes (8 y 9). Se midió la formación de NH₄ en el tiempo para estimar la velocidad inicial de rCynD_{PER-URP-08}. A partir de estos datos se estimó la velocidad inicial en cada concentración de NaCN, y posteriormente se calculó la K_m y k_{cat} empleando la ecuación de Michaelis – Menten (**Figura 13** y **Figura 14**). Se determinó mediante el método de Wilcoxon que no existen diferencias significativas en la estimación del K_m y k_{cat} entre los pH empleados durante el análisis cinético ($p=0.48$ y $p=0.093$ respectivamente) (**Tabla 2**, **Figura 15** y **Figura 16**).

Figura 13. Velocidad inicial (V_o) vs Concentración inicial de Cianuro a pH 8

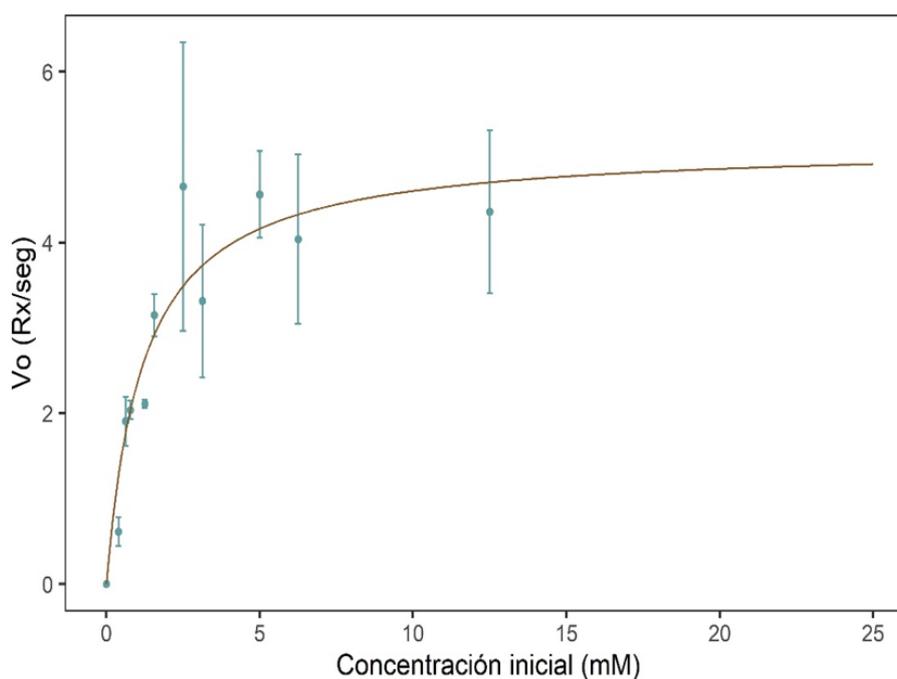


Figura 14. Velocidad inicial (V_o) vs Concentración inicial de Cianuro a pH 9

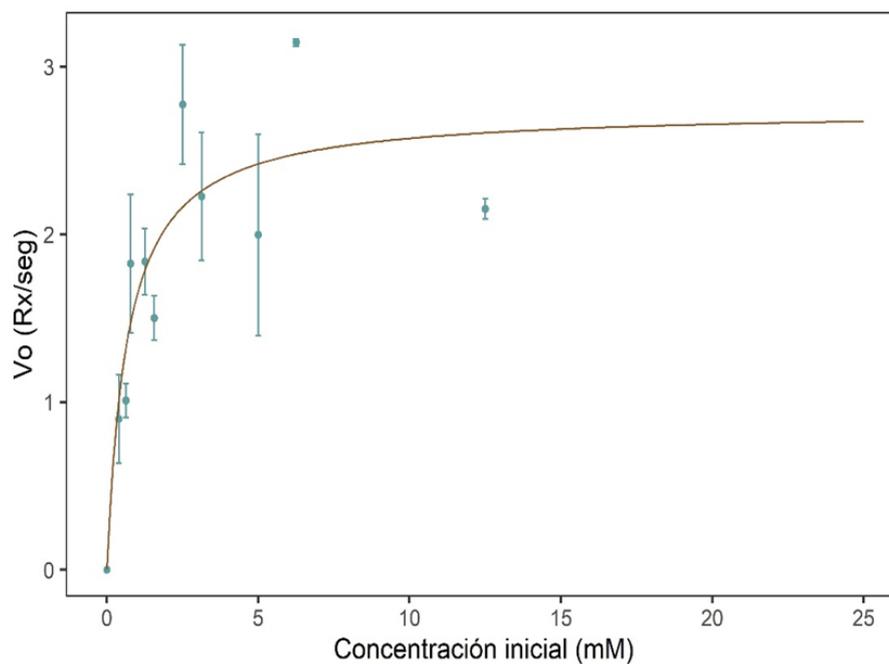


Tabla 2. Análisis cinético de $rCynD_{PER-URP-08}$ empleando pH 8 y 9.

pH	K_m ($\bar{x} \pm sd$)	k_{cat} ($\bar{x} \pm sd$)
8	$1,09 \pm 0,66$	$4,83 \pm 1,57$
9	$0,97 \pm 1,20$	$2,99 \pm 1,41$

Figura 15. K_m obtenida empleando los pH 8 y 9 durante el análisis cinético.

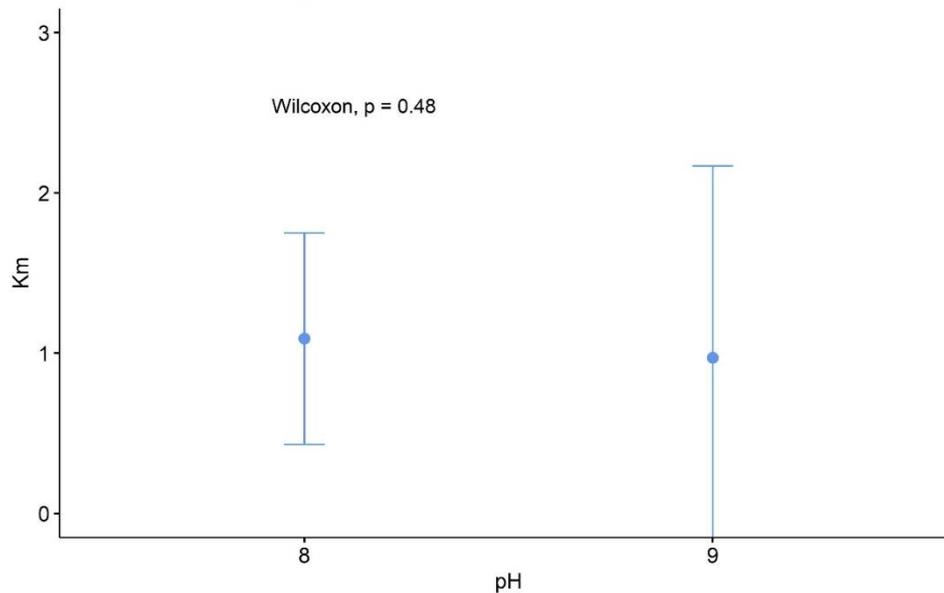
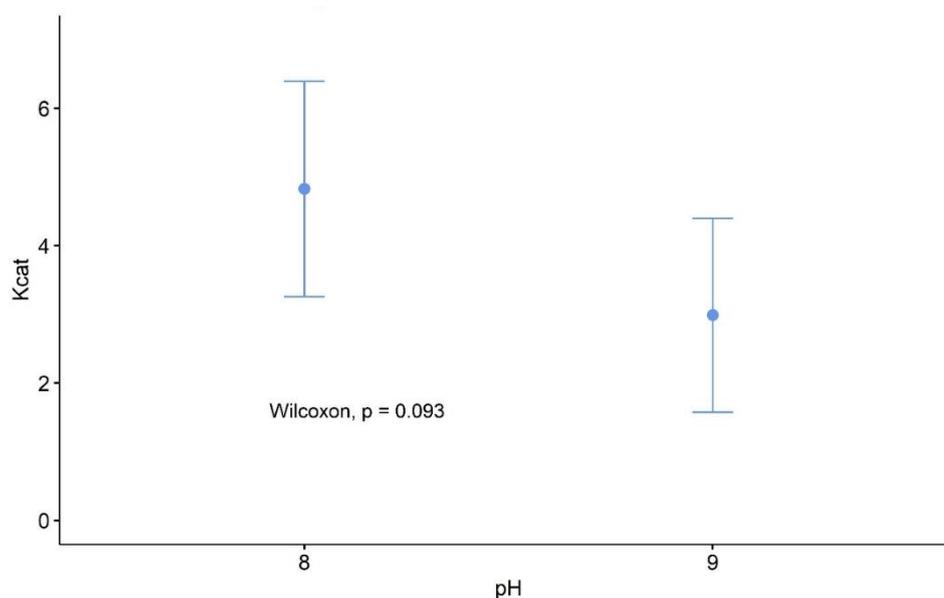


Figura 16. k_{cat} obtenida empleando los pH 8 y 9 durante el análisis cinético.



5.4 Cristalización de la proteína rCynD_{PER-URP-08} a diferentes pH y concentraciones de PEG 8000

La proteína purificada fue colocada en una placa de cristalización empleando condiciones de cristalización diferentes, dado que se usaron distintas concentraciones de PEG (6, 8,10 y 12%), pHs (10,5; 11; 11,5) y aditivos (**Figura 2**). Las placas de

crystalización fueron revisadas durante 4 semanas. Luego de 17 días se observó la formación de cristales en 4 de las condiciones empleadas y se realizó la medición de los cristales (*Tabla 3*). De acuerdo al método de Kruskal-Wallis, se observó que los cristales más grandes se encontraron en la condición 2 ($\bar{x}=95,00$), luego en la condición 1 ($\bar{x}=60,00$) y finalmente en las condiciones 3 ($\bar{x}=27,78$) y 4 ($\bar{x}=29,09$). Cabe señalar que el tamaño de los cristales entre las condiciones 3 y 4 no presentó diferencias significativas (*Figura 21*). Por ende, las condiciones de cristalización en donde se empleó el stock de aminoácidos como aditivo tuvieron los cristales más grandes.

Tabla 3. *Tamaño de cristales formados en diferentes condiciones de cristalización.*

Denominación	Condición de cristalización	Tamaño de los cristales ($\bar{x} \pm sd$)	Figura
Condición 1	6% de PEG 8000, pH 10,5 y stock de aminoácidos como aditivo	60,00 \pm 10,00 μ m	<i>Figura 17</i>
Condición 2	8% de PEG 8000, pH 11 y stock de aminoácidos como aditivo	95,00 \pm 7,07 μ m	<i>Figura 18</i>
Condición 3	12% de PEG 8000, pH 10,5 y cationes divalentes como aditivo	27,78 \pm 4,41 μ m	<i>Figura 19</i>
Condición 4	10% de PEG 8000, pH 11 y cationes divalentes como aditivo	29,09 \pm 7,01 μ m	<i>Figura 20</i>

Figura 17. *Cristales en la condición de 6% de PEG 8000, pH 10,5 y stock de aminoácidos como aditivo (aumento de 40x).*

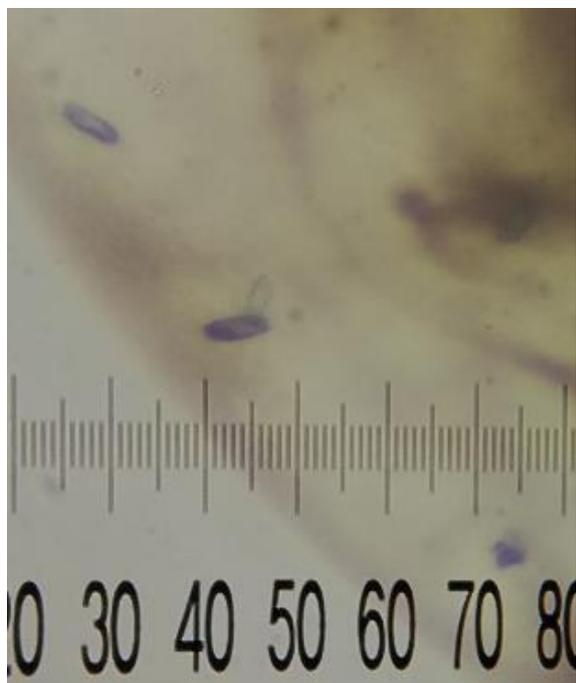


Figura 18. *Cristales en la condición de 8% de PEG 8000, pH 11 y stock de aminoácidos como aditivo (aumento de 40x).*

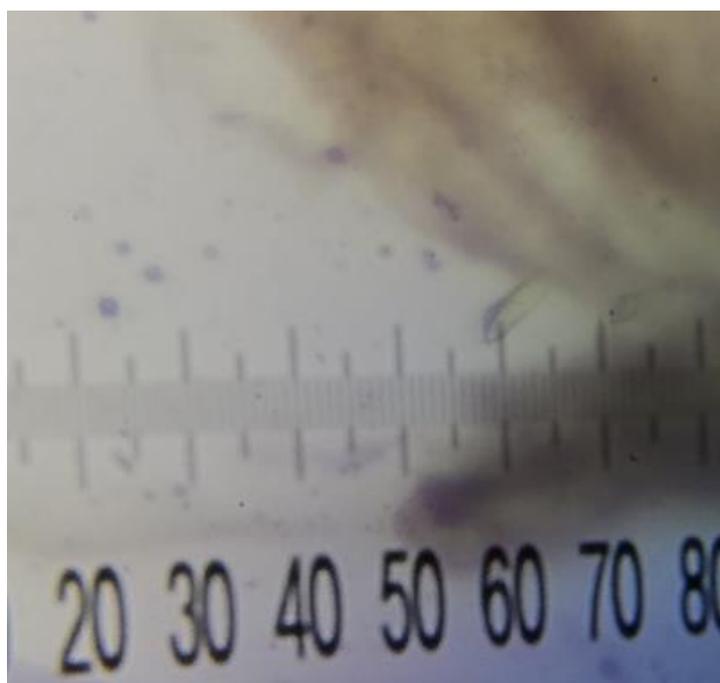


Figura 19. *Cristales en la condición de 12% de PEG 8000, pH 10,5 y cationes divalentes como aditivo (aumento de 40x).*

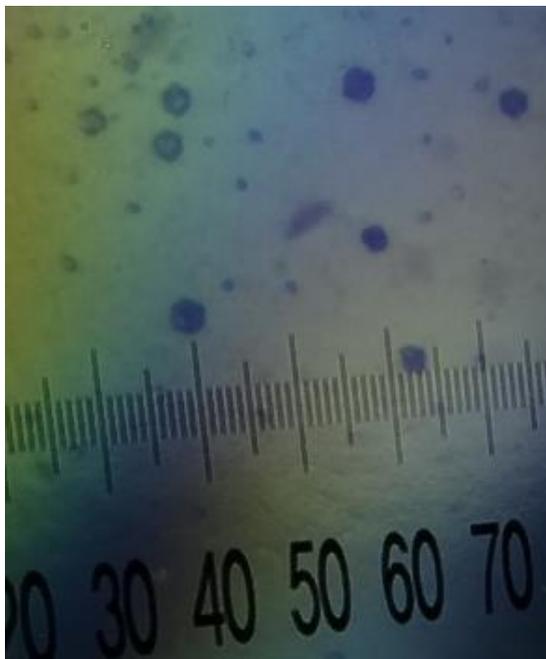


Figura 20. *Cristales en la condición de 10% de PEG 8000, pH 11 y cationes divalentes como aditivo (aumento de 40x).*

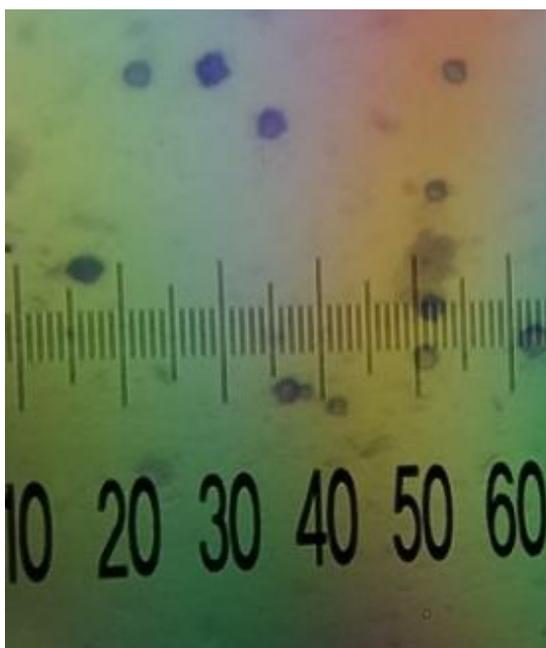
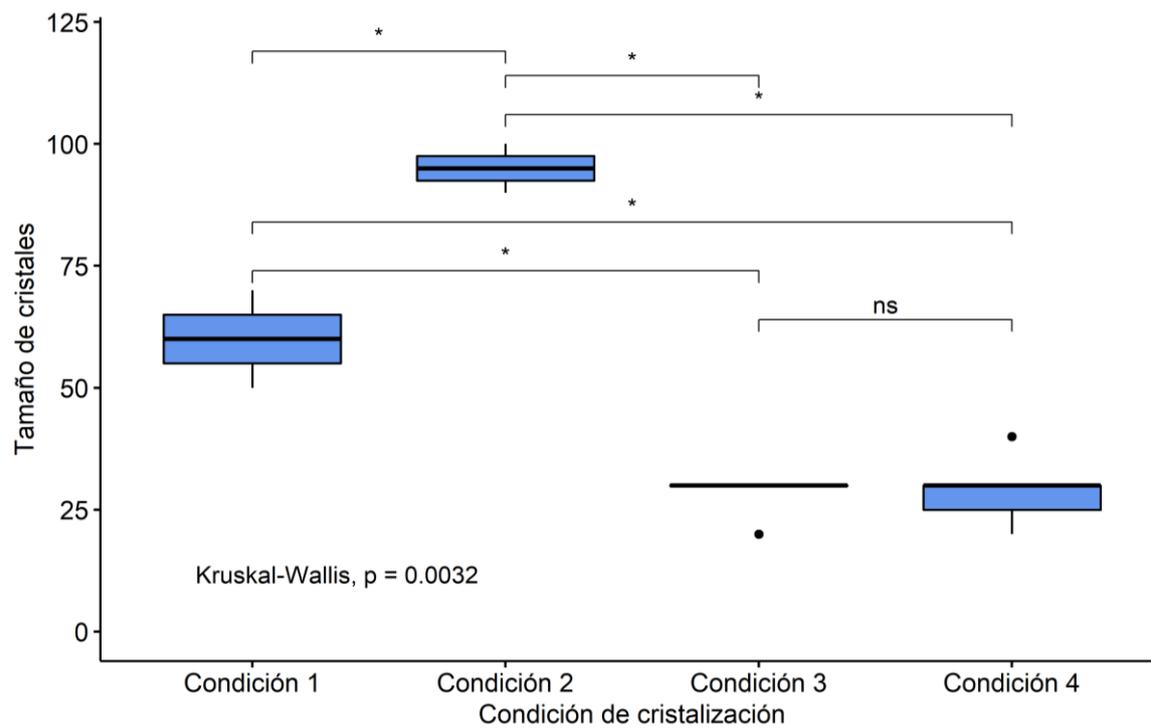


Figura 21. *Tamaño de los cristales formados en diferentes condiciones de cristalización.*

VI. Discusión

Se ha descrito la expresión, purificación y cristalización de la proteína rCynD_{PER-URP-08} empleando a *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS) como sistema de expresión. Además, se confirmó la degradación de cianuro a través de la producción de amonio (NH₃).

En el presente estudio, se utilizó el plásmido pET-11a con un inserto del gen CynD de *B. safensis* PER-URP-08 y una etiqueta de 6 histidinas (C-terminal) para expresar rCynD_{PER-URP-08}. Este enfoque es similar a los empleados en estudios anteriores que utilizaron plásmidos basados en pET para la expresión de proteínas CynD de otras especies (Jandhyala *et al.*, 2003; Sewel *et al.*, 2003; Jandhyala *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012; Crum *et al.*, 2015b; Crum *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016a; Park *et al.*, 2016b; Carmona-Orozco y Panay, 2019). Aunque los estudios anteriores no reportaron datos sobre la eficiencia de transformación, se pueden tomar como referencia los estudios de Pope *et al.* (1996) y Heiat *et al.*, (2014) quienes también utilizaron vectores basados en pET y el método de choque térmico para la transformación bacteriana, donde se encontraron eficiencias de $7,9 \times 10^{-2}$ – $1,7 \times 10^{-1}$ y 5 – $1,8 \times 10$ ufc/ng, respectivamente, mientras que en el estudio realizado se mostró una eficiencia de $2,3 \times 10^{-1}$ – $1,24$ ufc/ng. Es importante destacar que los estudios de Pope *et al.* y Heiat *et al.* emplearon diferentes genes, plásmidos y condiciones de cultivo bacteriano, lo que podría haber influido en las diferencias observadas en la eficiencia de transformación.

El crecimiento de *E. coli* transformada (inserto de rCynD_{pum}) a 22, 30 y 37°C fue evaluado por Jandhyala *et al.* (2003), no obstante, la expresión de rCynD durante la inducción no ha sido evaluada. Estudios previos emplearon las temperaturas de 18°C (Justo *et al.*, 2022), 22°C (Jandhyala *et al.*, 2005), 30°C (Jandhyala *et al.*, 2005; Crum *et al.*, 2015a; Crum *et al.*, 2015b; Crum *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016a) y 37°C (Sewel *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2016b) durante la inducción de los cultivos, por esta razón, en el presente estudio

se evaluó la expresión de rCynD_{PER-URP-08} en las temperaturas 18, 30 y 37°C. No se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas empleadas en este estudio por lo que nuestro sistema de expresión puede ser utilizado en cualquiera de estas temperaturas.

Según Martínková *et al.* (2015), la biorremediación de residuos con cianuro debe llevarse a cabo a un pH igual o superior a 9 para evitar la volatilización de HCN. Se ha demostrado que rCynD_{pum} y rCynD_{stut} alcanzan su actividad óptima a pH 7,6-8 (Meyers *et al.*, 1993; Jandhyala *et al.*, 2005) y se inactivan a pH 9 y 10 respectivamente (Crum *et al.*, 2015b; Watanabe *et al.*, 1998). Crum *et al.* (2015b), construyó una enzima quimérica que mantiene su actividad a pH 9 ($K_m = 1,5 \pm 0,5$) empleando los residuos 1-286 de CynD_{pum} y 287-335 de CynD_{stut}. En el presente estudio se demuestra que la enzima rCynD_{PER-URP-08} continúa siendo activa a pH 9, lo cual es congruente con lo presentado por Justo *et al.* (2022). Además, se comprobó que la actividad no se ve afectada significativamente al emplear pH 8 ($K_m = 1,09$ mM; $k_{cat} = 4,83$ reacciones/segundo) o 9 ($K_m = 0,97$ mM; $k_{cat} = 2,99$ reacciones/segundo), lo que sugiere que esta enzima puede ser una buena candidata para la biorremediación de cianuro.

Cabe señalar que, de acuerdo a lo presentado por Jandhyala *et al.* (2003), la adición de la etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal no tiene un impacto en la actividad enzimática, sin embargo, sería importante que futuros estudios evalúen la actividad de la enzima empleando la etiqueta de 6 histidinas en el N-terminal en lugar de en el C-terminal, dado que el C-terminal presenta mayor variabilidad y está relacionado a la tolerancia a pH alcalinos (Crum *et al.*, 2015).

Los cristales obtenidos deben ser expuestos a rayos X en una siguiente investigación para analizar el patrón de difracción y determinar si los cristales corresponden a una proteína o una sal formada por los componentes de las soluciones de precipitación y/o los aditivos

(stock de aminoácidos y cationes divalentes). Si se trata de proteínas, se podrá observar una menor distancia entre las reflexiones en el patrón de difracción en comparación con las sales. Esta característica indicaría que la célula unitaria del cristal es de mayor tamaño, lo que confirma su naturaleza proteica (**Anexo 13**) (Andrade *et al.*, 2007; Martiradona, 2014).

VII. Conclusiones

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Se logró transformar bacterias *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS) mediante el uso de diferentes concentraciones de plásmido (67,8; 135,6 y 271,2 ng/50 μ L de bacterias competentes), demostrando una eficiencia de 1,24; $2,3 \times 10^{-1}$ y $7,7 \times 10^{-1}$ ufc/ng respectivamente, sin observar diferencias significativas ($p=0,49$).
2. Se demostró que las temperaturas 18, 30 y 37°C permiten la inducción de la expresión de rCynD_{PER-URP-08} en *Escherichia coli* BL21(DE3)(pLysS), donde no se evidenció diferencias significativas ($p=0,1$).
3. El uso de una elución isocrática o en gradiente en el ensayo de cromatografía no afectó significativamente la pureza de rCynD_{PER-URP-08} obtenida ($p=1$).
4. La actividad enzimática (K_m y k_{cat}) de rCynD_{PER-URP-08} se mantuvo a pH 9 ($p=0,48$ y $p=0,093$ respectivamente), estos datos demostraron que puede ser una alternativa para la bioremediación de residuos contaminados con cianuro.
5. Los cristales más grandes (60-95 μ m) se obtuvieron usando una solución de precipitación suplementada con aminoácidos, mientras que usando una solución de precipitación suplementada con cationes divalentes produjo cristales más pequeños (27,78-29,09 μ m), con diferencias significativas ($p=0,0032$).
6. En la presente investigación no se logró determinar si los cristales obtenidos son de origen proteico o son de sales (cationes y aminoácidos) incorporados en la solución de precipitación. Para este efecto se requiere analizar el patrón de difracción de rayos X, lo cual no es objeto de esta investigación.

VIII. Recomendaciones

- Determinar la temperatura óptima para la actividad de la enzima, realizando las reacciones de degradación de cianuro a diferentes temperaturas.
- Evaluar la termoestabilidad de la enzima, incubándola a diferentes temperaturas y posteriormente midiendo su actividad enzimática residual.
- Revisar las placas de cristalización durante los meses posteriores al ensayo inicial, dado que los cristales se pueden formar años después de la exposición a las condiciones de cristalización.

IX. Referencias citadas

- Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: Biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21(6), 501–511.
[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00099-5)
- Annachhatre, A. P., y Amornkaew, A. (2001). Upflow Anaerobic Sludge Blanket Treatment of Starch Wastewater Containing Cyanide. *Water Environment Research*, 73(5), 622–632. <https://doi.org/10.2175/106143001x143358>
- Andrade, J., Karmali, A., Carrondo, M. A., y Frazão, C. (2007). Crystallization, diffraction data collection and preliminary crystallographic analysis of hexagonal crystals of *Pseudomonas aeruginosa* amidase. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(3), 214–216.
<https://doi.org/10.1107/S1744309107005830>
- Antonini, E., Brunori, M., Rotilio, G. C., Greenwood, C., y Malmström, B. G. (1971). The Interaction of Cyanide with Cytochrome Oxidase. *European Journal of Biochemistry*, 23(2), 396–400.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1971.tb01633.x>
- Arbabi, M., Masoudipour, N., y Amiri, M. (2015). Negative effects of cyanide on health and its removal options from industrial wastewater. *Int. J. Epidemiol. Res*, 2((1)), 44–49.
http://ijer.skums.ac.ir/m/article_11114.html
- Argota-Pérez, G., Argota-Coello, H., y Mamani-Vilca, J. (2014). Determinación analítica por exposición a cianuro libre en efluentes mineros, planta artesanal

poderosa Ananea – Puno Analytical determination for exposition to free cyanide in mining. *Catedra Villarreal*, 2(1), 11–18.

Barglow, K. T., Saikatendu, K. S., Bracey, M. H., Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., Stevens, R. C., y Cravatt, B. F. (2008). Functional proteomic and structural insights into molecular recognition in the nitrilase family enzymes. *Biochemistry*, 47(51), 13514–13523.

<https://doi.org/10.1021/bi801786y>

Baxter, J., y Cummings, S. P. (2006). The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9057-y>

Benedik, M. J., y Sewell, B. T. (2018). Cyanide-degrading nitrilases in nature. *Journal of General and Applied Microbiology*, 64(2), 90–93.

<https://doi.org/10.2323/jgam.2017.06.002>

Bhalla, T. C., Kumar, V., y Kumar, V. (2017). Microbial Remediation of Cyanides. *Bioremediation Current Research and Applications*, Edition: 1st, 4, 88–109.

Bolanos-Garcia, V. M., y Chayen, N. E. (2009). New directions in conventional methods of protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 101(1–3), 3–12.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.12.006>

Botz, M. M., Mudder, T. I., y Akcil, A. U. (2005). Cyanide treatment: Physical, chemical and biological processes. *Developments in Mineral Processing*, 15(C), 672–702.

[https://doi.org/10.1016/S0167-4528\(05\)15028-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4528(05)15028-5)

- Botz, M. M., Mudder, T. I., y Akcil, A. U. (2016). Cyanide Treatment. In Gold Ore Processing. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63658-4.00035-9>
- Carbajal, M. y Cisneros, M. (2013). *Determinación de la concentración de cianuro en aguas superficiales aledañas al Cerro el Toro impactado por la minería artesanal, Shiracmaca-Huamachuco, La Libertad-2012* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Trujillo].
- Carmona-Orozco, M. L., y Panay, A. J. (2019). Immobilization of *E. coli* expressing *Bacillus pumilus* CynD in three organic polymer matrices. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(13), 5401–5410. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09859-z>
- Castillo, F. y Lecca, D. (2014). *Concentración de cianuro en las aguas del río Cajas impactadas por la minería artesanal en Patate, La Libertad, noviembre – diciembre 2018* [Tesis de Bachillerato, Universidad Nacional de Trujillo].
- Chen, C. Y., Kao, C. M., y Chen, S. C. (2008). Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater. Chemosphere, 71(1), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.058>
- Cobos, I. M., Ibáñez García, M. I., Moreno, F. de la P., Sáez Melero, L. P., Luque-Almagro, V. M., Rodríguez, F. C., Ruiz, M. D. R., Jiménez, M. A. P., y Vivián, C. M. (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. Microbial Cell Factories, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0267-8>
- Crum, M. A. N., Park, J. M., Mulelu, A. E., Sewell, B. T., y Benedik, M. J. (2015a). Probing C-terminal interactions of the *Pseudomonas stutzeri* cyanide-

degrading CynD protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 3093–3102.

<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6335-x>

Crum, M. A., Park, J. M., Sewell, B. T., y Benedik, M. J. (2015b). C-terminal hybrid mutant of *Bacillus pumilus* cyanide dihydratase dramatically enhances thermal stability and pH tolerance by reinforcing oligomerization. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 881–889.

<https://doi.org/10.1111/jam.12754>

Crum, M. A., Trevor Sewell, B., y Benedik, M. J. (2016). *Bacillus pumilus* cyanide dihydratase mutants with higher catalytic activity. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–10.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01264>

Dash, R. R., Balomajumder, C., y Kumar, A. (2008). Treatment of metal cyanide bearing wastewater by simultaneous adsorption and biodegradation (SAB). *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 387–396.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.009>

Dash, R. R., Gaur, A., y Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>

Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen disposiciones complementarias. El Peruano (2017). <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>

Drenth, J. (2007). *Principles of protein X-ray crystallography*. Groningen, The Netherlands: Springer Science+Business Media.

- Evangelho, M. R., Gonçalves, M. M. M., Sant'Anna, G. L., y Villas Bõas, R. C. (2001). A trickling filter application for the treatment of a gold milling effluent. *International Journal of Mineral Processing*, 62(1–4), 279–292. [https://doi.org/10.1016/S0301-7516\(00\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0301-7516(00)00059-4)
- Fernandez, J. (2018). *Nivel de contaminación por metales pesados: Hg, Pb, As y Cianuro (CN-), en el naciente río Binacional Puyango –Tumbes (Perú – Ecuador)* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Trujillo].
- Gupta, N., Balomajumder, C., y Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038>
- Heiat, M., Aghamollaei, H., Moosazadeh, M. & Kooshki, H. Using CM11 peptide as a cell permeable agent for the improvement of conventional plasmid transformation methods in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Minerva Biotec* **26**, 149–57 (2014).
- Holcomb, J., Spellmon, N., Zhang, Y., Doughan, M., Li, C., y Yang, Z. (2017). Protein crystallization: Eluding the bottleneck of X-ray crystallography. *AIMS Biophysics*, 4(4), 557–575. <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.4.557>
- Hung, C. L., Liu, J. H., Chiu, W. C., Huang, S. W., Hwang, J. K., y Wang, W. C. (2007). Crystal structure of *Helicobacter pylori* formamidase AmiF reveals a cysteine-glutamate-lysine catalytic triad. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 12220–12229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609134200>
- Ibañez, E. (2016). *Estudio De La Contaminacion Por Plomo Y Cianuro En Las Aguas De La Laguna De Sausacocha. Huamachuco- Provincia De Sanchez*

Carrión, La Libertad, Perú 2015 [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Trujillo].

[http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3801/Tesis Maestría - Marco Antonio Macen Moya.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3801/Tesis%20Maestría%20-%20Marco%20Antonio%20Macen%20Moya.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Ibáñez, M. I., Cabello, P., Luque-Almagro, V. M., Sáez, L. P., Olaya, A., De Medina, V. S., De Castro, M. D. L., Moreno-Vivián, C., y Roldán, M. D. (2017). Quantitative proteomic analysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to industrial cyanide-containing wastewaters using Liquid Chromatography- Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LCMS/MS). *PLoS ONE*, 12(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172908>
- Ingvorsen, K., Hojer-Pedersen, B., y Godtfredsen, S. E. (1991). Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1783–1789. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1783-1789.1991>
- Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P. R., Sewell, B. T., Willson, R. C., y Benedik, M. J. (2003). CynD, the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene cloning and structural studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4794–4805. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4794-4805.2003>
- Jandhyala, D. M., Willson, R. C., Sewell, B. T., y Benedik, M. J. (2005). Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3), 327–335. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1903-8>

- Jaszczak, E., Polkowska, Ż., Narkowicz, S., y Namieśnik, J. (2017). Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 15929–15948.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9081-7>
- Jensen, P., Wilson, M. T., Aasa, R., y Malmström, B. G. (1984). Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase. A rapid-freeze e.p.r. investigation. *The Biochemical Journal*, 224(3), 829–837.
<https://doi.org/10.1042/bj2240829>
- Jeong, Y. S., y Chung, J. S. (2006). Biodegradation of thiocyanate in biofilm reactor using fluidized-carriers. *Process Biochemistry*, 41(3), 701–707.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.09.004>
- Johnston, J. M., Arcus, V. L., Morton, C. J., Parker, M. W., y Baker, E. N. (2003). Crystal Structure of a Putative CN Hydrolase From Yeast. *Society*, 185(14), 4057–4065.
- Jones, M. G., Bickar, D., Wilson, M. T., Brunori, M., Colosimo, A., y Sarti, P. (1984). A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase. *The Biochemical Journal*, 220(1), 57–66.
<https://doi.org/10.1042/bj2200057>
- Joshi, D. R., Zhang, Y., Tian, Z., Gao, Y., y Yang, M. (2016). Performance and microbial community composition in a long-term sequential anaerobic-aerobic bioreactor operation treating coking wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 8191–8202.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7591-8>

- Justo Arevalo, S. et al. (2022). Genomic Characterization of *Bacillus safensis* Isolated from Mine Tailings in Peru and Evaluation of Its Cyanide-Degrading Enzyme CynD. *Appl. Environ. Microbiol.* 88, e0091622.
- Kaewkannetra, P., Imai, T., Garcia-Garcia, F. J., y Chiu, T. Y. (2009). Cyanide removal from cassava mill wastewater using *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 with mixed microorganisms in activated sludge treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, 172(1), 224–228.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.162>
- Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K., y Benckiser, G. (2015). Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 659–666.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838246320130516>
- Kumar, R., Saha, S., Dhaka, S., Kurade, M. B., Kang, C. U., Baek, S. H., y Jeon, B. H. (2017). Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering*, 20(1), 28–40.
<https://doi.org/10.1080/12269328.2016.1218303>
- Kunz, D. A., Nagappan, O., Silva-Avalos, J., y Delong, G. T. (1992). Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: Evidence for multiple pathways of metabolic conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 2022–2029.
<https://doi.org/10.1128/aem.58.6.2022-2029.1992>
- Kuyucak, N., y Akcil, A. (2013). Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Minerals Engineering*, 50–51, 13–29.
<https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.05.027>

- Lu, G., Xu, Y., Zhang, K., Xiong, Y., Li, H., Cui, L., Wang, X., Lou, J., Zhai, Y., Sun, F., y Zhang, X. C. (2017). Crystal structure of *E. coli* apolipoprotein N-acyl transferase. *Nature Communications*, 8(May), 1–8.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15948>
- Lundgren, S., Andersen, B., Piškur, J., y Dobritzsch, D. (2007). Crystallization and preliminary X-ray data analysis of β -alanine synthase from *Drosophila melanogaster*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(10), 874–877.
<https://doi.org/10.1107/S1744309107042984>
- Luque-Almagro, V. M., Escribano, M. P., Manso, I., Sáez, L. P., Cabello, P., Moreno-Vivián, C., y Roldán, M. D. (2015). DNA microarray analysis of the cyanotroph *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to nitrogen starvation, cyanide and a jewelry wastewater. *Journal of Biotechnology*, 214, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.032>
- Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M. D., García-Gil, L. J., Castillo, F., y Blasco, R. (2005). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 940–947.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.940-947.2005>
- Martínková, L., Veselá, A. B., Rinágelová, A., y Chmátal, M. (2015). Cyanide hydratases and cyanide dihydratases: emerging tools in the biodegradation and biodetection of cyanide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(21), 8875–8882.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6899-0>

- Martiradonna, L. A photograph of crystal order. *Nature* 511, 7–7 (2014).
<https://doi.org/10.1038/nature13350>
- Mekuto, L., Jackson VA, y Ntwampe, S. K. O. (2014). Biodegradation of Free Cyanide Using *Bacillus Sp.* Consortium Dominated by *Bacillus Safensis*, Lichenformis and Tequilensis Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 05(02).
<https://doi.org/10.4172/2155-6199.s18-004>
- Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., y Jackson, V. A. (2015). Biodegradation of free cyanide and subsequent utilisation of biodegradation by-products by *Bacillus* consortia: Optimisation using response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10434–10443.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4221-4>
- Meyers, P. R., Gokool, P., Rawlings, D. E., y Woods, D. R. (1991). An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. *Journal of General Microbiology*, 137(6), 1397–1400.
<https://doi.org/10.1099/00221287-137-6-1397>
- Meyers, P. R., Rawlings, D. E., Woods, D. R., y Lindsey, G. G. (1993). Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. *Journal of Bacteriology*, 175(19), 6105–6112.
<https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6105-6112.1993>
- Mulelu, A. E., Kirykowicz, A. M., y Woodward, J. D. (2019). Cryo-EM and directed evolution reveal how *Arabidopsis* nitrilase specificity is influenced by its quaternary structure. *Communications Biology*, 2(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0505-4>

- Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T., y Gekko, K. (2000). Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: Conversion into the active form by subunit association. *European Journal of Biochemistry*, 267(1), 138–144.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00983.x>
- Narro, A. y Vásquez, D. (2017). *Determinación de cianuro en aguas del río Chinchipe - San Ignacio - Cajamarca, en el período Octubre-Diciembre del año 2016* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Trujillo].
- Nelson, M. G., Kroegef, E. B., y Arps, P. J. (1998). Chemical and Biological Destruction of Cyanide: Comparative Costs in a Cold Climate. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 19(1), 217–226.
<https://doi.org/10.1080/08827509608962441>
- Nuñuvero, I. y Vigo, J. (2009). *Determinación de la concentración de plomo y cianuro en aguas de la laguna Huangacocha - Candoguran, provincia de Santiago De Chuco* [Tesis de Bachillerato, Universidad Nacional de Trujillo].
- Nyamunda, B. C. (2017). Review of the Impact on Water Quality and Treatment Options of Cyanide Used in Gold Ore Processing. *Water Quality*.
<https://doi.org/10.5772/65706>
- Pace, H. C., Hodawadekar, S. C., Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., Pekarsky, Y., Croce, C. M., y Brenner, C. (2000). Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Current Biology*, 10(15), 907–917.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00621-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00621-7)

- Pace, H. C., y Brenner, C. (2001). The nitrilase superfamily: Classification, structure and function. *Genome Biology*, 2(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-1-reviews0001>
- Park, J. M., Mulelu, A., Trevor Sewell, B., y Benedik, M. J. (2016a). Probing an interfacial surface in the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*, a spiral forming nitrilase. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01479>
- Park, J. M., Ponder, C. M., Sewell, B. T., y Benedik, M. J. (2016b). Residue Y70 of the nitrilase cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* is critical for formation and activity of the spiral oligomer. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2179–2183.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1606.06035>
- Park, J. M., Trevor Sewell, B., y Benedik, M. J. (2017). Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3029–3042.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8204-x>
- Patil, Y. B., y Paknikar, K. M. (2000). Development of a process for biotransformation of metal cyanides from waste waters. *Process Biochemistry*, 35(10), 1139–1151. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00150-3)
- Pope, B. & Kent, H. M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 24, 536–537 (1996). <https://doi.org/10.1093/nar/24.3.536>
- Quan, Z. X., Bae, J. W., Rhee, S. K., Cho, Y. G., y Lee, S. T. (2004). Toxicity and degradation of metal-complexed cyanide by a bacterial consortium under

- sulfate-reducing conditions. *Biotechnology Letters*, 26(12), 1007–1011.
<https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000030048.04282.da>
- Raczynska, J. E., Vorgias, C. E., Antranikian, G., y Rypniewski, W. (2011). Crystallographic analysis of a thermoactive nitrilase. *Journal of Structural Biology*, 173(2), 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.017>
- Raybuck, S. A. (1992). Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation*, 3(1), 3–18. <https://doi.org/10.1007/BF00189632>
- Sakai, N., Tajika, Y., Yao, M., Watanabe, N., y Tanaka, I. (2004). Crystal structure of hypothetical protein PH0642 from *Pyrococcus horikoshii* at 1.6Å resolution. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 57(4), 869–873.
<https://doi.org/10.1002/prot.20259>
- Services, H. (2002). Toxicological Profile for Cyanide. ATSDR's Toxicological Profiles, July.
https://doi.org/10.1201/9781420061888_ch68
- Sewell, B. T., Berman, M. N., Meyers, P. R., Jandhyala, D., y Benedik, M. J. (2003). The cyanide degrading nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 is a two-fold symmetric, 14-subunit spiral. *Structure*, 11(11), 1413–1422.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2003.10.005>
- Sharma, M., Akhter, Y., y Chatterjee, S. (2019a). A review on remediation of cyanide containing industrial wastes using biological systems with special reference to enzymatic degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2643-8>
- Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Mansoor, S., y Kaur, B. (2019b). Enzyme Engineering: Current Trends and Future Perspectives. *Food Reviews International*, 1–34. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695835>

- Sharma, N. K., y Philip, L. (2015). Treatment of Phenolics, Aromatic Hydrocarbons, and Cyanide-Bearing Wastewater in Individual and Combined Anaerobic, Aerobic, and Anoxic Bioreactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 300–322. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1262-y>
- Sirianuntapiboon, S., Chairattanawan, K., y Rarunroeng, M. (2007). Biological removal of cyanide compounds from electroplating wastewater (EPWW) by sequencing batch reactor (SBR) system. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1–3), 526–534. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.056>
- Stott, M. B., Franzmann, P. D., Zappia, L. R., Watling, H. R., Quan, L. P., Clark, B. J., Houchin, M. R., Miller, P. C., y Williams, T. L. (2001). Thiocyanate removal from saline CIP process water by a rotating biological contactor, with reuse of the water for bioleaching. *Hydrometallurgy*, 62(2), 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(01\)00185-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(01)00185-2)
- Thuku, R. N., Brady, D., Benedik, M. J., y Sewell, B. T. (2009). Microbial nitrilases: Versatile, spiral forming, industrial enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 703–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03941.x>
- Thuku, R. N., Weber, B. W., Varsani, A., y Sewell, B. T. (2007). Post-translational cleavage of recombinantly expressed nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 yields a stable, active helical form. *FEBS Journal*, 274(8), 2099–2108. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05752.x>
- Tsai, Y. Der, Chin, K. H., Gao, F. P., Shr, H. L., Lyu, P. C., Wang, A. H. J., y Chou, S. H. (2006). Cloning, crystallization and preliminary X-ray study of XC1258, a CN-hydrolase superfamily protein from *Xanthomonas*

campestris. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 62(10), 999–1002.

<https://doi.org/10.1107/S1744309106035433>

Tuesta, L. (2010). *Evaluación de Cianuro en suelos, cuerpos de agua y plantas del entorno de centros mineros en Salpo-La Libertad-Perú 2007-2008* [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Trujillo]. [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3801/Tesis Maestría - Marco Antonio Macen Moya.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3801/Tesis%20Maestría%20-%20Marco%20Antonio%20Macen%20Moya.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Wang, C. C., Lee, C. M., & Chen, L. J. (2004). Removal of nitriles from synthetic wastewater by acrylonitrile utilizing bacteria. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 39(7), 1767–1779. <https://doi.org/10.1081/ESE-120037876>

Wang, L., Watermeyer, J. M., Mulelu, A. E., Sewell, B. T., y Benedik, M. J. (2012). Engineering pH-tolerant mutants of a cyanide dihydratase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(1), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3620-9>

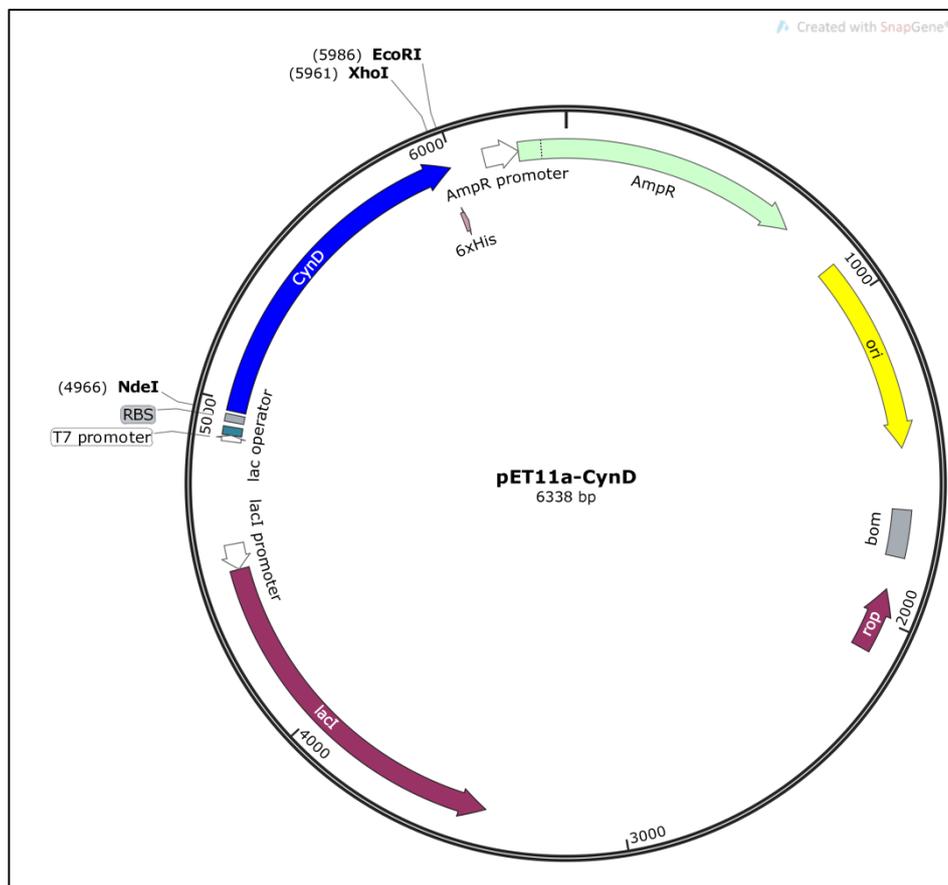
Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., y Karube, I. (1998). Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology*, 144(6), 1677–1682. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-6-1677>

White, J. M., Jones, D. D., Huang, D., y Gauthier, J. J. (1988). Conversion of cyanide to formate and ammonia by a *Pseudomonad* obtained from industrial wastewater. *Journal of Industrial Microbiology*, 3(5), 263–272. <https://doi.org/10.1007/BF01569526>

- Wu, C. F., Xu, X. M., Zhu, Q., Deng, M. C., Feng, L., Peng, J., Yuan, J. P., y Wang, J. H. (2014). An effective method for the detoxification of cyanide-rich wastewater by *Bacillus sp.* CN-22. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3801–3807. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5433-5>
- Yarar, B. (2001). Cyanides in the Environment and Their Long-Term Fate. 85–92.
- Young, C. A., y Jordan, T. S. (1995). Cyanide remediation: current and past technologies. 104–129.
- Zhang, L., Yin, B., Wang, C., Jiang, S., Wang, H., Yuan, Y. A., y Wei, D. (2014). Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Syechocystis sp.* PCC6803. *Journal of Structural Biology*, 188(2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.10.003>

X. Anexos

Anexo 1. Mapa del plásmido pET-11a con el inserto del gen CynD de *B. safensis* PER-URP-08.



Nota: Se observa que el plásmido expresante cuenta con el gen de CynD marcado con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal y con un gen de resistencia a la ampicilina. Los genes mencionados se encuentran regulados por el promotor T7, el cual puede ser inducido usando IPTG.

Anexo 2. *Número de colonia formadas de acuerdo a la concentración de plásmido inoculado.*

Concentración de plásmido (ng/ul)	Número de colonias por placa						$\bar{x} \pm sd$
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	
67,8	65	32	384	3	0	20	84 ± 148,8
135,6	88	9	86	1	0	0	30,67 ± 43,77
271,2	28	15	996	4	29	173	207,50 ± 391,27

Anexo 3. *Eficiencia de transformación de acuerdo a la concentración de plásmido inoculado.*

Concentración de plásmido (ng/ul)	Eficiencia de transformación						$\bar{x} \pm sd$
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	
67,8	0,96	0,47	5,66	0,04	0,00	0,29	1,24 ± 2,19
135,6	0,65	0,07	0,63	0,01	0,00	0,00	0,23 ± 0,32
271,2	0,10	0,06	3,67	0,01	0,11	0,64	0,77 ± 1,44

Anexo 4. *Concentración de rCynD_{PER-URP-08} en cultivos no inducidos e inducidos a diferentes temperaturas.*

Muestra	Temp. (°C)	Nº Ensayo	Intensidad rCynD	Intensidad del Normalizador	Ratio Norm. (rCynD/Normalizador)	Ratio rCynD (Ratio I/NI)	$\bar{x} \pm sd$
No Inducido (NI)	NA	1	6006,70	7259,75	0,83	NA	NA
		2	10404,70	12943,58	0,80	NA	
Inducido (I)	18	1	4815,37	1356,25	3,55	4,29	4,38 ± 0,14
		2	9926,21	2775,68	3,60	4,48	
	30	1	6280,51	2058,86	3,04	3,67	3,87 ± 0,27
		2	12233,27	3764,91	3,26	4,06	
37	37	1	5615,82	2202,99	2,56	3,10	3,06 ± 0,06
		2	10669,24	4415,63	2,42	3,01	

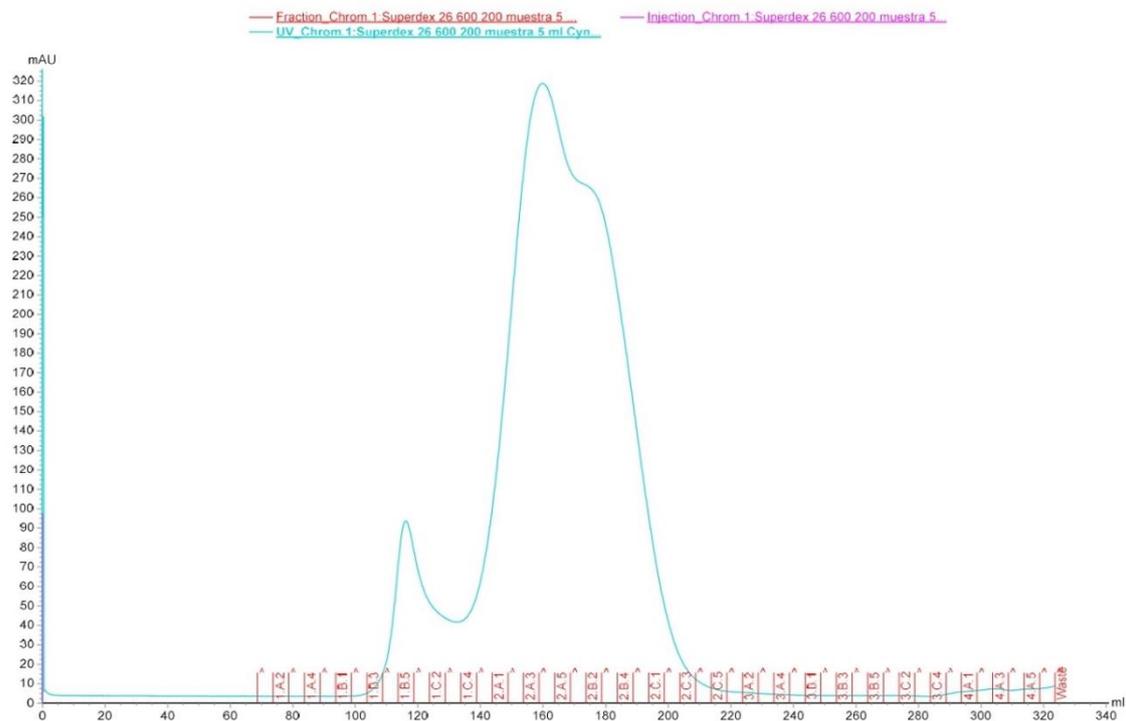
Anexo 5. *Concentración de rCynD_{PER-URP-08} en cultivos no inducidos e inducidos a diferentes temperaturas (tabla extendida).*

Nº Ensayo	Temperatura	Intensidad rCynD	Intensidad del Normalizador	Ratio (rCynD/Norm)	Resultado (Ratio I/NI)
1	No Inducido	6006,70	7259,75	0,83	NA
	18	3670,70	1022,56	3,59	4,34
	18	4352,82	1254,97	3,47	4,19
	18	6422,60	1791,21	3,59	4,33
	30	5073,41	1797,09	2,82	3,41
	30	5454,65	1718,09	3,17	3,84
	30	8313,48	2661,39	3,12	3,78
	37	5166,94	1900,80	2,72	3,29
	37	5259,11	2078,80	2,53	3,06
	37	6421,41	2629,39	2,44	2,95
	2	No Inducido	10404,70	12943,58	0,80
18		7309,36	2132,26	3,43	4,26
18		9407,60	2377,85	3,96	4,92
18		13061,67	3816,92	3,42	4,26
30		9597,48	2771,85	3,46	4,31
30		11186,18	3679,09	3,04	3,78
30		15916,13	4843,80	3,29	4,09
37		7480,94	3139,80	2,38	2,96
37		9845,48	3912,34	2,52	3,13
37		14681,31	6194,75	2,37	2,95

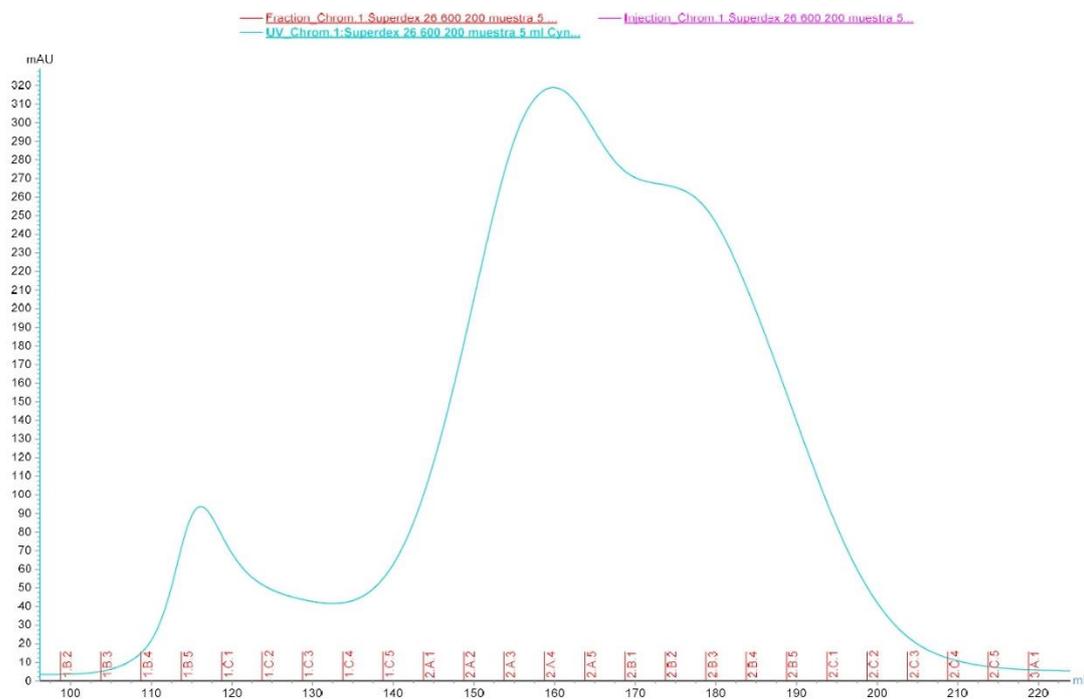
Anexo 6. *Pureza de rCynD_{PER-URP-08} obtenida empleando cromatografía con elución en gradiente e isocrática.*

Tipo de elución	Total	rCynD	Pureza (rCynD/Total)	$\bar{x} \pm sd$
En gradiente	245009,21	131844,41	0,54	0,51 \pm 0,03
	245395,00	123872,24	0,50	
	170901,92	82187,61	0,48	
Isocrática	157333,08	79585,60	0,51	0,50 \pm 0,02
	172805,88	81180,02	0,47	
	152876,64	77905,83	0,51	

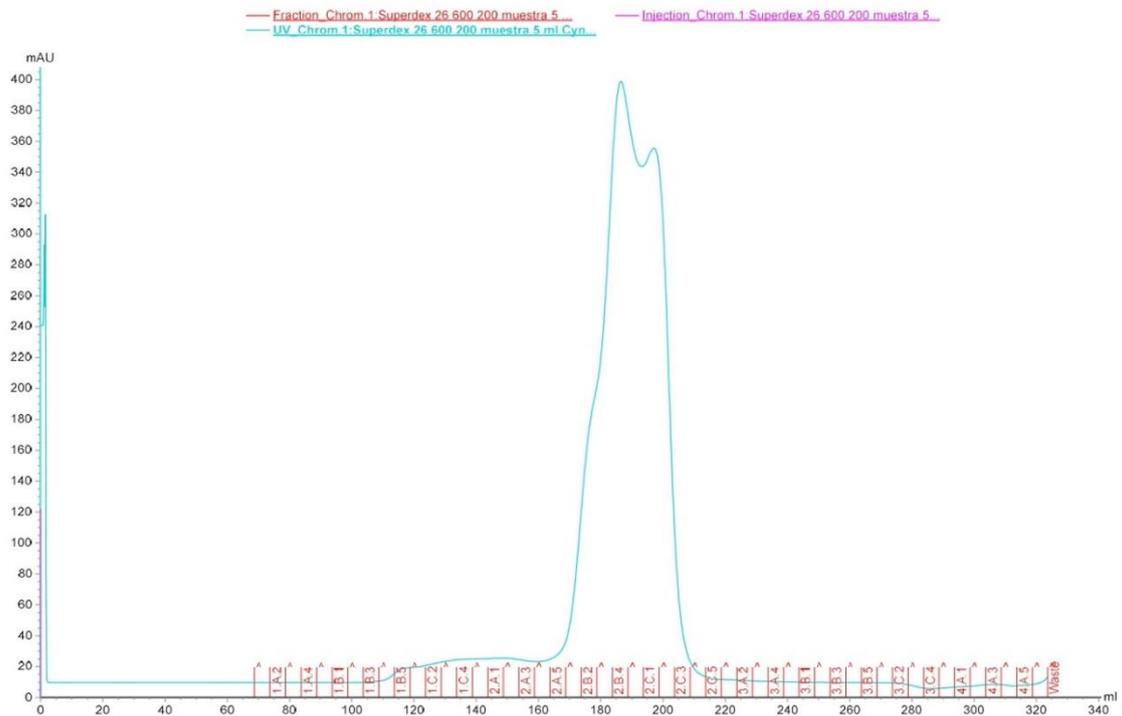
Anexo 7. *Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño.*



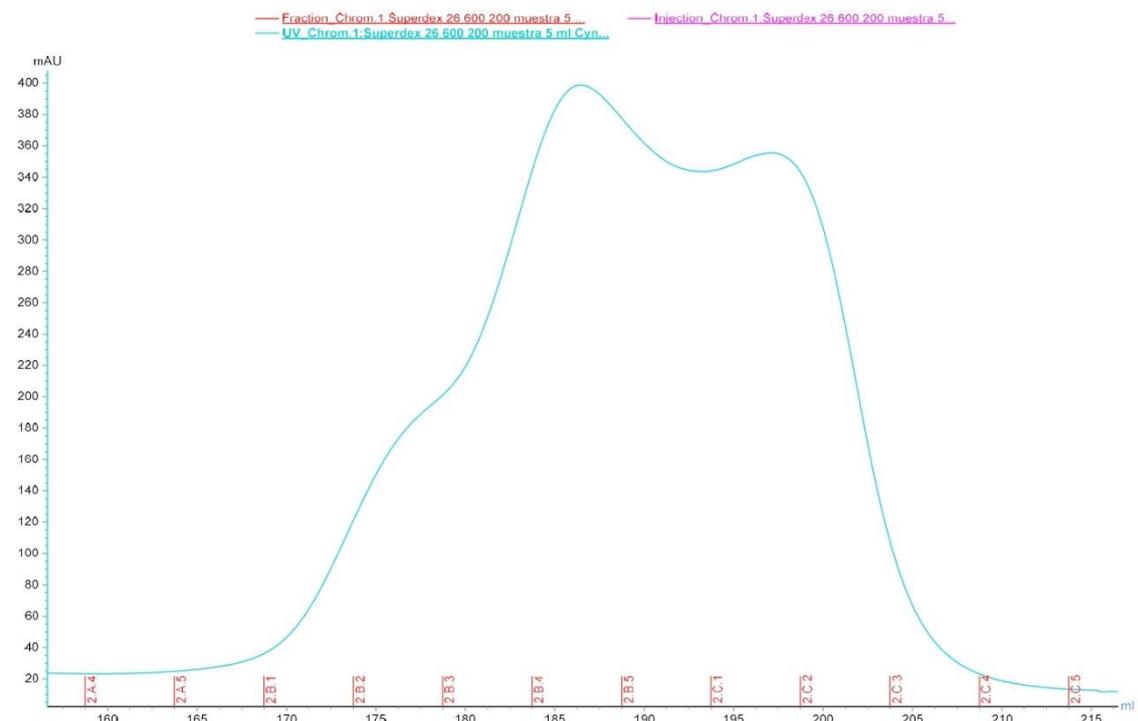
Anexo 8. *Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño (zoom).*



Anexo 9. Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño.



Anexo 10. Cromatograma de cromatografía por exclusión de tamaño (zoom).



Anexo 11. *Análisis cinético de rCynD_{PER-URP-08} empleando pH 8 y 9.*

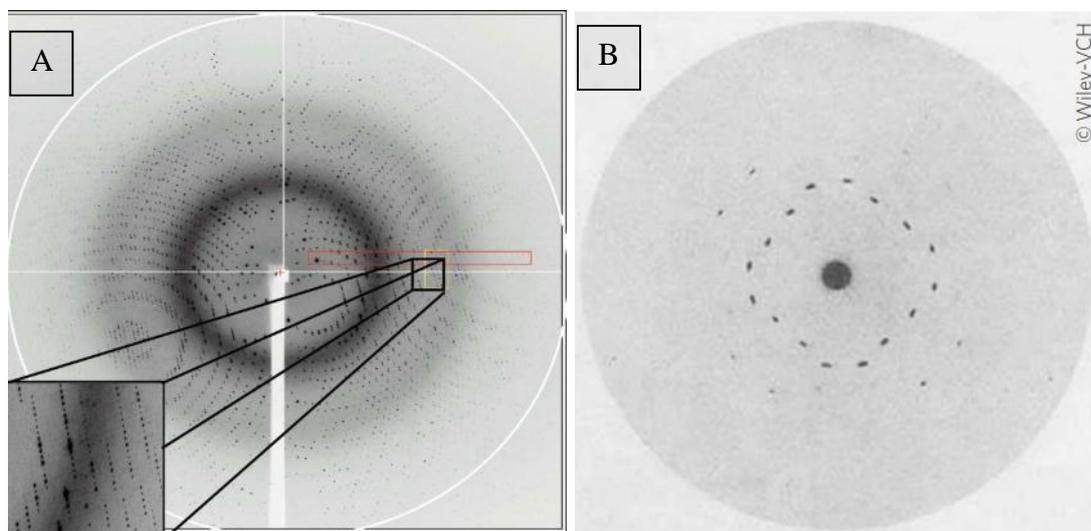
pH	Ensayo	K _m	$\bar{x} \pm sd$	k _{cat}	$\bar{x} \pm sd$
8	Ensayo1	1,65	1,09 ± 0,66	4,6	4,83 ± 1,57
	Ensayo2	0,57		3,65	
	Ensayo3	0,32		3,03	
	Ensayo4	1,74		6,99	
	Ensayo5	0,6		4,25	
	Ensayo6	1,67		6,44	
9	Ensayo1	0,88	0,97 ± 1,20	3,42	2,99 ± 1,41
	Ensayo2	0,13		1,35	
	Ensayo3	3,31		5,03	
	Ensayo4	0,96		4	
	Ensayo5	0,33		2,39	
	Ensayo6	0,22		1,74	

Anexo 12. *Tamaño de los cristales formados en diferentes condiciones de cristalización*

(tabla extendida).

Denominación	Condición de cristalización	Tamaño de los cristales											
Condición 1	6% de PEG 8000, pH 10,5 y stock de aminoácidos como aditivo	70	60	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Condición 2	8% de PEG 8000, pH 11 y stock de aminoácidos como aditivo	100	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Condición 3	12% de PEG 8000, pH 10,5 y cationes divalentes como aditivo	30	20	30	30	30	30	30	30	20	-	-	-
Condición 4	10% de PEG 8000, pH 11 y cationes divalentes como aditivo	40	30	30	30	30	20	30	40	20	30	20	-

Anexo 13. Patrón de difracción de rayos X de un cristal de (A) Amidasa de *Pseudomonas aeruginosa* y (B) Sulfuro de Zinc.



Nota: Se observa una menor distancia entre las reflexiones del patrón de difracción en la proteína Amidasa en comparación con la sal ZnS, lo cual indica un mayor tamaño de la célula unitaria del cristal de proteína. Tomado de *Crystallization, diffraction data collection and preliminary crystallographic analysis of hexagonal crystals of Pseudomonas aeruginosa amidase* (p. 214), por Andrade *et al*, 2007, Acta Crystallographica y de *A photograph of crystal order* (p.7) Martiradonna, L. A, 2014, Nature 511.