

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Carrera Bioquímica
Cátedra Biotecnología

Biodegradación enzimática del cianuro utilizando *Escherichia coli* recombinante

Docentes

Quintero, Cristian
Rinaldini, Estefanía

Autores

Giner, Martín
González, Estefanía
Mestre, Eliana

Mendoza, Argentina
2022

Índice

1. Introducción	3
2. Desarrollo	3
• Bacterias y vectores utilizados	3
• Expresión de CynD en <i>E.coli</i>	3
• Determinación de cianuro	4
• Actividad de <i>E. coli-CynD</i> y su relación con el pH alcalino	4
• Termoestabilidad y temperatura óptima	4
• Inhibición enzimática por metales pesados	4
• Muestras de aguas residuales	5
• Ensayo de viabilidad celular en las muestras	5
3. Resultados y discusión	5
• Sobreexpresión de CynD y su cinética	5
• Degradación enzimática de cianuro	5
• Actividad a pH alcalino	6
• Termoestabilidad de la enzima	6
• Efecto inhibitorio de metales pesados	6
• Biorremediación aplicada al agua residual de minas de oro	6
• Viabilidad de <i>E. coli-CynD</i> en aguas cianuradas	7
4. Conclusión	7
5. Bibliografía	7

Introducción

El cianuro es un compuesto químico de alta toxicidad para los seres vivos. Para los seres humanos la dosis tóxica es de 1mg/kg de peso corporal, dosis más elevadas son letales en pocos minutos. Sin embargo, el cianuro se utiliza en gran diversidad de procesos industriales, como la extracción de oro, las cuales generan grandes cantidades de residuos contaminados que representan un gran riesgo para el medio ambiente.

Debido a fallas en el control de las actividades industriales, la contaminación ambiental con cianuro y otros metales pesados han resultado perjudiciales para los seres humanos y la biodiversidad del área contaminada. La búsqueda de una solución eficaz, veloz y sustentable es una necesidad de carácter urgente para la descontaminación del agua residual generada por la actividad industrial.

El tratamiento de estos desechos mediante procesos convencionales es limitado, ya que son de gran costo económico, los reactivos empleados presentan un riesgo por sí mismos para el ambiente y requieren de una infraestructura especializada. Por estos motivos, la utilización de métodos biológicos, en específico el uso de la enzima cianuro dihidratasa (CynD) sin necesidad de adicionar cofactores para degradar al cianuro en amoníaco y formiato, posee un gran potencial para solucionar esta problemática.

La enzima CynD proveniente de *Bacillus pumilus* fue expresada en *E. coli* por Jandhyala *et al.* (2003) y purificada por marcación con histidina. La enzima obtenida presenta una gran inhibición por iones mercúricos (Hg^{2+}) e inactivación a un pH

mayor a 8,5, con actividad máxima en el rango de temperatura de 37-42 °C. Otras investigaciones lograron mejorar la

actividad de la enzima en pH alcalinos y aumentaron su termorresistencia, lo cual aún no es suficiente para la biorremediación del agua contaminada con cianuro.

El empleo de células enteras que sean capaces de sobreexpresar el producto de interés en la industria, permite la protección de las enzimas ante condiciones desfavorables, debido a la presencia de la membrana celular y el citoplasma.

Con lo expuesto anteriormente y los descubrimientos de Vargas-Serna y Panay (2019), se hipotetiza que células enteras de *E. coli*, capaces de sobreexpresar CynD, son más aptas para la degradación del cianuro ante las condiciones adversas del agua residual.

Desarrollo

Bacterias y vectores utilizados

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5a para replicar el ADN plasmídico y BL21(DE3) para la expresión de las proteínas.

A la secuencia genética de la enzima CynD proveniente de *Bacillus pumilus* C1 se le añadió una marca de hexahistidina en el extremo C-terminal y fue optimizada para su expresión en *E. coli*. Luego de su síntesis, fue clonada en el plásmido PD451-BpumCynD.

Expresión de CynD en *E. coli*

Las colonias de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido PD451 se cultivaron en caldo lisogenia a 37 °C por 16 horas y 300 rpm. Del cultivo anterior se tomaron diluciones 1:100 y se añadieron a otro medio LB suplementado con

Kanamicina, para obtener nuevas colonias. Al obtener una lectura de la densidad óptica (a 600 nm) de 0,5, se

añadió al medio IPTG para inducir la expresión de CynD. La expresión fue monitoreada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, y a las 4 horas se recolectaron las células por centrifugación a 5800 rpm a 20 °C durante 30 minutos.

Como control negativo se utilizó un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar en medio LB sin adición de antibióticos ni IPTG.

Determinación de cianuro

Utilizando el método del ácido pícrico (Fisher y Brown, 1952) se determinó la concentración de cianuro por medición de la absorbancia a 520 nm utilizando una curva estandarizada para concentraciones entre 0 y 4,0 mM. Para concentraciones mayores, se realizaron diluciones de la muestra para que la absorbancia se encuentre en el rango de la curva estándar.

Actividad de *E. coli-CynD* y su relación con el pH alcalino.

Las reacciones para el cálculo de la cinética de las bacterias enteras se realizaron en soluciones con concentraciones variables de cianuro. La determinación de la velocidad inicial se llevó a cabo utilizando la porción lineal de gráficos de concentración de cianuro en función del tiempo.

La cinética se calculó mediante el uso de gráficos de velocidad inicial en función de la concentración de cianuro siguiendo la ecuación de Michaelis-Menten. La degradación total del cianuro se evaluó para distintos estadios celulares, en medio LB para células en crecimiento; en tampón tris para células en reposo y tampón tris con

Para los controles negativos se utilizaron células de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar y soluciones sin adición de células la cual compensa la disminución en la concentración de cianuro por evaporación.

Los resultados obtenidos provienen de tres mediciones individuales. El cianuro removido se expresó como porcentaje mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{cianuro removido} = \frac{[\text{cianuro inicial}] - [\text{cianuro final}]}{[\text{cianuro inicial}]} * 100$$

tolueno y EDTA para células permeabilizadas, determinada a los 10 minutos de reacción.

Las reacciones de degradación total del cianuro se realizaron por resuspensión de células de *E. coli-CynD* en tampón tris para pH 8,0 y glicina para pH 9,0 o 10,0; todas en presencia de cianuro. En cada una de estas condiciones se determinó la degradación total del cianuro en intervalos de 10 minutos por una hora. La actividad obtenida se informó en relación a la de pH8,0.

Termoestabilidad y Temperatura óptima

Las células de *E. coli-CynD* se resuspendieron en una solución con cianuro y tampón tris (pH 8,0) y se incubaron a 42 °C por 75 horas. La actividad enzimática se determinó cada 5 horas.

En un rango de temperaturas de 35 °C a 60 °C se determinó la actividad de *E. coli-CynD*, aumentando 5 °C por intervalo. Los resultados se informan relativos a la medición de 35 °C.

La determinación de ambos parámetros se realizó por triplicado.

Inhibición enzimática por metales pesados

El ensayo se realizó por resuspensión de células de *E. coli-CynD* en soluciones que contenían cianuro, FeCl₃, HgCl₂ y NiSO₄

con tampón tris a pH 8,0, incubadas durante una hora. Cada ensayo se realizó tres veces. La actividad se informó en relación con células incubadas en ausencia de metales pesados.

Muestras de aguas residuales

Se tomaron muestras de aguas residuales que contenían cianuro de una planta de procesamiento de oro. Mediante espectroscopía de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) se determinó el contenido total de metal en las muestras.

Utilizando el método del ácido pícrico se obtuvo la concentración de cianuro libre.

Las células de *E. coli-CynD* fueron resuspendidas en tampón tris, pH 8,0 y añadidas a muestras de aguas residuales contaminadas con cianuro y se determinó su concentración a los 30 minutos.

Además, se realizaron reacciones utilizando muestras de aguas residuales diluidas 30 veces con agua y distintas concentraciones de *E. coli-CynD*.

Se utilizó una resuspensión que contenía *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli-CynD* para controlar el efecto de las células sobre los inhibidores presentes en el agua residual cianurada.

Ensayo de viabilidad celular en las muestras

En soluciones de aguas residuales contaminadas con cianuro se añadieron células de *E. coli-CynD* permeabilizadas y sin permeabilizar en una proporción 1:10. Estas soluciones se dejaron crecer a 25 °C por tres días y agitación constante. Posteriormente, en placas de agar LB con

kanamicina se cultivó la solución y se incubó a 37 °C por dos días para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Aplicando una metodología similar se utilizaron células de *E. coli-CynD* cultivadas en caldo LB para realizar el control. Todos los ensayos se realizaron tres veces.

células no transformadas la eliminación del cianuro fue igual a la provocada por evaporación. El resto de las experimentaciones realizadas y

Resultados y Discusión

Sobreexpresión de CynD y su cinética

Se observó una expresión cuantiosa de la enzima en *E. coli*, con un máximo a las cuatro horas luego de la adición de IPTG. En la electroforesis se observó una fuerte banda a 38 kDa correspondiente al producto predicho por la secuencia del gen.

CynD mostró una saturación a valores de V_{max} de $8,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_M de 2.1 mM. Estos resultados se pueden comparar con los valores de la enzima purificada: V_{max} $88 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y K_M 2.56 mM. La similitud entre ambos resultados parece demostrar que el cianuro difunde rápidamente a través de la membrana citoplasmática, igualando las concentraciones internas y externas pudiendo contribuir a la toxicidad celular del cianuro.

Degradación enzimática del cianuro

Se observó la actividad de la enzima en células en reposo, en crecimiento y en células permeabilizadas. Midiendo la velocidad inicial en células en crecimiento y en reposo, se observó que la actividad fue similar, pero en células permeabilizadas la actividad fue menor. Todos los tipos celulares degradaron la totalidad del cianuro en un tiempo no mayor a 10 minutos luego del agregado de una solución de este compuesto. En

presentadas a continuación utilizaron células en reposo.

Actividad a pH alcalino

A un pH elevado el cianuro se encuentra ionizado en las especies HCN y CN⁻, con predominancia del anión, el cual presenta alta volatilidad. Se observó la actividad de las células transformadas a valores de pH iguales a 8, 9 y 10. La alcalinidad del medio inactivó o degradó a la enzima intracelular, pero a pH la enzima conservó el 20% de su actividad. A pesar de esto, la actividad residual de la enzima intracelular pudo eliminar casi el 100% del cianuro a los 20 minutos en un medio con pH 9,0 y cerca del 78% al transcurrir 40 minutos a pH 10. Se han desarrollado enzimas CynD mutantes resistentes a un pH 9,5. (Crum et al., 2015 ; Crum et al., 2016).

Termoestabilidad de la enzima

Las enzimas que degradan cianuro suelen inestables frente a elevadas temperaturas. La CynD posee una baja estabilidad térmica y su actividad se pierde luego de incubarla por 5 horas a 42 °C (mostrando una actividad máxima entre 37 °C y 42 °C). Por su parte, la CynD intracelular se mostró más resistente a la temperatura elevada y conservó más del 60% de su actividad a 50 °C, permaneciendo activa a 42 °C por 72 horas. A 60 °C, la enzima muestra una actividad del 30%.

Efecto inhibitorio de metales pesados

Los iones Hg²⁺ y Pb²⁺ inhiben fuertemente a la enzima purificada. En una muestra de una mina oro, el análisis reveló que la misma era abundante en iones Fe²⁺, Hg²⁺ y Ni²⁺. La degradación del cianuro por *E. coli-CynD*

se experimentó en soluciones separadas de cada ión con concentraciones mayores a la de la muestra. Como resultado, la enzima CynD

mostró menor inhibición que la enzima purificada.

Biorremediación aplicada al agua residual de minas de oro

El agua obtenida de las minas de oro posee un pH mayor a 11 y altas concentraciones de cianuro, metales pesados y minerales. Al agregar CynD directamente sobre las muestras, la enzima se inhibía completamente (ensayo A).

Para solucionarlo, se diluyeron las muestras con agua 30 veces. En estas soluciones las células solo pudieron degradar el 14% del cianuro (ensayo B). Al aumentar tres veces la concentración de células añadidas, el cianuro degradado aumentó al 70% (ensayo C). En estas condiciones, la mayor actividad se debería a la interacción de las células con los componentes inhibitorios de las soluciones cianuradas.

En una dilución 1:2:10 de *E. coli* – células CynD (ensayo D) se observó que la propia CynD tiene un efecto quelante sobre los inhibidores de la solución y no los componentes de *E. coli*.

Otro motivo por el cual la inhibición puede ser superada utilizando concentraciones elevadas de células transformadas es que las enzimas sobreexpresadas pueden unirse a los iones metálicos inhibitorios y dejar disponible una cantidad suficiente de enzima libre para degradar al cianuro.

Como resultado de la experimentación se observó que se puede lograr la degradación del cianuro al adaptar la proporción de células vivas en las

soluciones cianuradas.

Viabilidad de *E. coli-CynD* en aguas cianuradas

La aplicación de microorganismos recombinantes, como *E. coli-CynD*, en espacios abiertos está estrictamente regulada, debido al incierto destino de estos en el medio ambiente. La viabilidad de las células transformadas se evaluó en muestras cianuradas de residuos industriales. Se observó que las células permeabilizadas no son viables luego del transcurso de 72 horas.

Conclusión

La utilización de células de *E. coli* que sobreexpresan CynD muestran una mejora en la termoestabilidad en comparación con la enzima purificada. La conservación de más del 60% de su actividad a 60 °C puede ser aprovechada para inmovilizar al catalizador en termogeles. A pH fuertemente alcalino, la enzima mostró un incremento en su resistencia. Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que *E. coli-CynD* es una potencial vía para la biorremediación de desechos industriales contaminados con cianuro.

Bibliografía

1. Claudia L. Vargas-Serna; María L. Carmona-Orozco; Aram J. Panay. (2020). *Biodegradación de cianuro por la enzima cianuro dihidratasa de Bacillus pumilus expresada heterológicamente en Escherichia coli* Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XXII, no. 1, pp. 27-35.