



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS RESIDUOS DE  
AMINOÁCIDOS DETERMINANTES EN LA  
ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA CIANURO  
DIHIDRATASA DE *Bacillus pumilus***

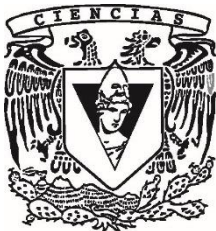
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**KARLA JAZMÍN ZEPEDA GARCÍA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. GEORGINA REGINA GARZA RAMOS  
MARTINEZ**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*“Los científicos no estudian la naturaleza porque sea útil; la estudian porque les place, y les place porque es bella. Si la naturaleza no fuese bella, no valdría la pena conocerla, no valdría la pena vivir la vida”.*

*Henri Poincaré*

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme desde mis inicios en esta carrera en CCH (como bióloga, porque en CCH comencé como “Proto-Bióloga”) y a mi amada Facultad de Ciencias, por ofrecerme un lugar en donde aprendí y fui formada (mi *Alma Mater*).

A la Dra. Georgina Regina Garza-Ramos Martínez, por permitirme trabajar en su grupo de investigación; por la paciencia, tolerancia y apoyo brindado durante todo este proceso.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, por realizar los experimentos de acoplamiento molecular de los que deriva este proyecto.

Al Dr. Menandro Camarillo por el apoyo para estandarizar el método OPA-NAC, vital para para este proyecto.

A los miembros de mi jurado por sus comentarios, retroalimentación y consejos brindados:

- Dr. Saúl Gómez Manzo
- Dra. María de los Ángeles Cancino Rodezno
- Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez
- Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
- Dra. Laura Kawasaki Watanabe

A las técnicas académicas de Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP), Dra Isabel Velázquez y M. en C. Laura Álvarez, por el apoyo brindado en la realización de este proyecto

## AGRADECIMIENTO PERSONALES

¡Madres!, Que complicado fue llegar hasta aquí, siempre decía que cuando tuviera que escribir los agradecimientos de mi tesis lo haría con chela o mezcal en mano, la verdad es que no es así (triste, jajaja).

A mis padres, **Paty** y **Alfredo** por siempre estar a mi lado y a pesar de mis momentos más oscuros seguir ahí conmigo. Estoy muy orgullosa de ustedes, gracias a su esfuerzo esto se ha hecho realidad y si bien es cierto que no es el final de mi carrera si no el comienzo y que debo seguir sola, sin ustedes no podría continuar. Espero que se sientan orgullosa de mi.

Papá, gracias por trabajar muy duro para brindarnos una buena vida y educación a Erik y a mí, sé que muchas veces tal vez, te hubiera gustado que fuese mejor, pero créeme, ya es y ha sido la mejor, gracias por mantenerte aquí conmigo a pesar de mis innumerables faltas, gracias por ser mi ejemplo de lucha y esfuerzo para seguir, gracias por mostrarme como se trabaja muy duro para tener lo que desea. Te Amo.

Mamita, mucho de lo que soy como persona te lo debo a tí, me has enseñado a perdonar y a reconocer cuando me equivoco. Gracias por mantener los abrazos abiertos siempre para mí, estoy orgullosa de la mamá que eres ¡Mucha Madre!. Te Amo Dinosuria

*Erik*, gusanito. Gracias por soportarme y por tolerar muchas cosa de mí y de mis momentos pasados. Gracias por las buenas charlas que en ocasiones tenemos, por explicarme cosas bien voladas que no entiendo, y aunque sé que diferimos en muchas cosas me encanta ser tú hermana mayor. Te Amo.

**Geo**, muchas gracias por soportarme, sé que fue un proyecto complicado y largo, durante el cual aprendimos mucho tanto académica como personalmente. Gracias por todo lo que me brindaste durante estos años, gracias por apoyarme como tutora y como amiga. Geo eres un ejemplo a seguir como mujer y como profesionalista. Gracias por ser mi tutora. Te quiero Geo.

A mi mejor amiga **Lilia** (Lilo), gracias por estar ahí siempre a pesar de nuestras nulas coincidencias para vernos, siempre has estado ahí, eres alguien bien especial en mi vida, ¡nunca te vayas!, Te amo montones amiga.

A **Dupnia's Clan**: Mireya, Adriana y Dunia, ¡feitas!, tengo tan hermosos recuerdos con ustedes, le doy gracias a la vida por ponerlas en mi camino (o ponerme en su camino?, como sea) estoy tan orgullosa de ustedes, de ver en las mujeres en las que se han convertido, es hermoso tenerlas y haber crecido juntas (y lo que nos falta). Las amo bellas.

A todas las personas que conocí durante mi paso por ciencias y con las que compartí muchas experiencias de las cuales aprendí mucho. En especial a mis amigos: **Carlos**, mostro, gracias por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas, gracias por ser mi mejor amigo siempre, recuerdo cuando cantábamos Vivir la Vida y todas las rolas de Jenny and the mexicans, ¡estás bien loco!. Mostro, gracias por abrazarme o regañarme siempre. Te amo mostro. Bicha **Ali**, pequeña Ali, gracias por ser mi hermana adoptada, por desvelarte conmigo mientras hacíamos los eternos exámenes de Animales (jajajaja estuvo rudo), por siempre tener un detalle el día de mi cumple, 14 de febrero, 2 de noviembre etc., tu siempre bien mona “Ali Cositas”, gracias por brindarme tú casa y un lugar en tú familia como hermana adoptada, por las excelentes platicas y por tú confianza. Te amo Bicha.

A los **integrantes del LFQIP** por los momentos compartidos, el aprendizaje y el desmadre también: A mis Nitri-Hermanos: **Agustín, Alex, Julio, Dany, Huguito, Meny, Sergio**; con una mención especial para Agus, Huguito y Dany, por ser además de mis hermanitos académicos mis amigos, los quiero un montón chicos. A la familia TIM: **Sergio R<sup>2</sup>, Renán, Ricardo, Bryan, Susana, Octavio y Alex**, con una mención especial para: Ricardo, Bryan y Susana, por los buenos momentos bailando, riendo, en el chisme y en las pláticas serias, y por formar junto con Agustín el Gpo de Corredores (estaba bien padre) Gracias mushashos!!!. A papá Renán por siempre mostrar disponibilidad para resolver mis dudas, por escucharme y darme un consejo cuando lo necesite y por salvarnos de morir por las vacas en la pista. A Sergio Romero, por ayudarme con dudas, con experimentos y en la revisión de este trabajo (Te voy a abrazar siempre). A Alex, por soportar mi mal humor y estrés durante este proceso tan exhaustivo de la titulación, Besos!. A Hugo Santillán, Iris, Zac, Maribel y Saira por siempre tener disponibilidad para platicar, resolver dudas o solo reír. Por último Quiero hacer una mención muy especial a dos personas que comenzaron siendo mis compañeros y ahora son mis amigos y una parte especial de mi vida: A **Dana**, gracias por ser mi amiga, por apoyarme y ayudarme siempre, por escucharme y por brindarme tanta confianza, por abrirme las puertas de tú casa y de tú familia; te admiro y te quiero mucho Danita. **Banda**, muchas gracias por el apoyo durante estos años, gracias por acompañarme en los momentos imposibles de purificación, pero muchas más gracias por las excelentes platicas, por compartir tú forma de ver la vida y tú filosofía de vida. Dana y Banda, gracias por ser mis amigos, por estar conmigo en mis momentos difíciles, gracias por enseñarme el significado de compartir y dar sin esperar nada a cambio. Espero tener un poco de lo que ustedes son como profesionistas y como personas. Los quiero muchísimo siempre.

A todas las personas que a lo largo de estos años me encontré en el camino y por causalidad tuve la oportunidad de conocer pero que por diferentes circunstancias ya no están pero que dejaron un buen recuerdo o un buen aprendizaje.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
CIANURO.....	11
IMPORTANCIA BIOLOGIA DEL CIANURO.....	12
CIANURO: CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE.....	13
ENZIMAS Y BIOCATÁLISIS.....	14
MICROORGANISMO DEGRADADORES DE CIANURO.....	14
<i>BACILLUS pumilus</i> .....	15
CIANURO DIHIDRATASA - CIANURO HIDRATASA.....	16
MECANISMO DE REACCIÓN.....	20
ANTECEDENTES.....	22
CIANURO DIHIDRATASA DE <i>BACILLUS PUMILUS</i> GMA1.....	22
DETECCIÓN DE CIANURO.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
HIPÓTESIS.....	26
MÉTODO.....	27
CRECIMIENTO DE CÉLULAS Y SOBREEXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS.....	27
COSECHA DE CÉLULAS.....	27
FRAGMENTACION CELULAR.....	27
PURIFICACIÓN DE ENZIMAS.....	28
PRUEBAS DE ACTIVIDAD PARA CIANURO.....	28
DICROISMO CIRCULAR (DC).....	29
DISPERSIÓN DINAMICA DE LUZ (DLS).....	29

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS: $K_M$ y $k_{CAT}$ .....	29
METODO COLORIMÉTRICO (ÁCIDO PÍCRICO). CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE KCN.....	29
PARÁMETROS CINÉTICOS.....	30
MÉTODO FLUORIMÉTRICO (OPA-NAC).....	30
PRUEBAS DE ACTIVIDAD PARA NITRILOS.....	31
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA NITRILOS.....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	32
SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENZIMAS.....	32
PRUEBAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA CIANURO.....	33
DICROISMO CIRCULAR (CD).....	34
DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	37
CURVA PATRÓN DE KCN.....	38
VELOCIDADES INICIALES.....	39
MÉTODO FLUORIMÉTRICO (OPA-NAC).....	39
INTERFERENCIA DEL CIANURO CON EL MÉTODO FLUORIMÉTRICO.....	39
PARÁMETROS CINÉTICOS: ENZIMA SILVESTRE.....	41
PARÁMETROS CINÉTICOS: MUTANTE A <sub>133</sub> G.....	42
PARÁMETROS CINÉTICOS: MUTANTE A <sub>133</sub> V.....	43
PARÁMETROS CINÉTICOS: MUTANTE H <sub>308</sub> S.....	44
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA NITRILOS.....	47
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA DIFERENTES NITRILOS.....	48
<b>DISCUSIÓN</b> .....	53
INFLUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	55
NITRILOS Y ACTIVIDAD.....	61
<b>CONCLUSIONES</b> .....	62
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>FIGURA 1.</b> IÓN CIANO .....	II
<b>FIGURA 2.</b> VÍAS DE DEGRADACIÓN DE CIANURO.....	15



FIGURA 3. LA CONVERSIÓN DEL CN/NITRILO.....	16
FIGURA 4. IDENTIFICACIÓN DE LA TRIADA CATALÍTICA .....	17
FIGURA 5. DIMERO DE NITRILASA DE SYECHOCYSTIS PCC6803 (3WUY).....	18
FIGURA 6. ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA ENZIMA CynD.....	19
FIGURA 7. MECANISMO DE REACCIÓN.....	20
FIGURA 8. EXPERIMENTOS DE ACOPLAMIENTO DE LA CynD.....	22
FIGURA 9. REACCIÓN DEL MÉTODO OPA-NAC .....	23
FIGURA 10. MUESTRAS ANTES Y DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DE CADA ENZIMA.....	31
FIGURA 11. PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS.....	32
FIGURA 12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA CN.....	33
FIGURA 13. DICROÍSMO CIRCULAR DE LA ENZIMA SILVESTRE Y LAS ENZIMAS MUTADAS.....	34
FIGURA 14. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS PATRÓN PARA KCN.....	37
FIGURA 15. CURVAS DE VELOCIDADES INICIALES.....	38
FIGURA 16. INTERFERENCIA DEL CIANURO CON EL MÉTODO FLUORIMÉTRICO.....	39
FIGURA 17. PARÁMETROS CINÉTICOS ENZIMA SILVESTRE.....	40
FIGURA 18. PARÁMETROS CINÉTICOS MUTANTE A <sub>133</sub> G.....	41
FIGURA 19. PARÁMETROS CINÉTICOS MUTANTE A <sub>133</sub> V.....	42
FIGURA 20. PARÁMETROS CINÉTICOS MUTANTE H <sub>308</sub> S.....	43
FIGURA 21. SELECTIVIDAD PARA NITRILOS.....	46
FIGURA 22. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA SILVESTRE PARA NITRILOS ALIFÁTICOS.....	47
FIGURA 23. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA MUTADA A <sub>133</sub> G.....	48
FIGURA 24. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA MUTADA A <sub>133</sub> V.....	49
FIGURA 25. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA MUTADA H <sub>308</sub> S.....	50
FIGURA 26. ESTRUCTURA DE LA MUTANTE H <sub>308</sub> S.....	55
FIGURA 27. ESTRUCTURA DE LA MUTANTE A <sub>133</sub> G YA <sub>133</sub> V.....	57
FIGURA 28. ESTRUCTURA DE LA ENZIMA SILVESTRE Y LA MUTANTE W <sub>165</sub> F.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> PROPORCIÓN DE MEZCLA DE ÁCIDO PÍCRICO Y MEZCLA DE REACCIÓN.....	<b>29</b>
<b>TABLA 2.</b> ELEMENTOS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	<b>35</b>
<b>TABLA 3.</b> DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	<b>36</b>
<b>TABLA 4.</b> CONSTANTES CATALÍTICAS.....	<b>44</b>
<b>TABLA 5.</b> ESTRUCTURA DE NITRILOS.....	<b>45</b>
<b>TABLA 6.</b> ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA DIFERENTES NITRILOS.....	<b>51</b>

## ABREVIATURAS

**%Pd:** Porcentaje de Polidispersidad

**AcrCN:** Acrilonitrilo

**AdiCN:** Adiponitrilo

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BzCN:** Benzonitrilo

**CD:** Dicroísmo Circular

**CHT:** Cianuro hidratasa

**CN:** Cianuro, anión monovalente

**CNCl:** Cloruro cianógeno

**CynD:** Cianuro dihidratasa

**Cys:** Cisteína

**DLS:** Dispersión Dinámica de Luz

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**Glu:** Glutámico

**HCN:** Cianuro de hidrógeno

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry

**KCN:** Cianuro de potasio

**kDa:** KiloDalton

**LB:** Luria-Bertani

**Lys:** Lisina

**NAC:** N-acetyl-cysteine

**NaCN:** Cianuro de sodio

**NH<sub>3</sub>:** Amonio

**OPA:** Ophthaldialdehyde

**PDB:** Protein Data Bank

**PropCN:** Propionitrilo

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

*“El hombre de ciencia no aspira a un resultado inmediato. No espera que sus avanzadas ideas estén listas para ser asumidas. Su trabajo es como el del sembrador: para el futuro. Su deber es poner los cimientos para los que están por venir y señalar el camino. Vive y trabaja y mantiene la esperanza como el poeta que dice:*

*Procura que el trabajo diario de mis manos,*

*¡Oh, fortuna!, yo lo complete.*

*¡no me dejes, no, desfallecer*

*no, estos no son vanos sueños:*

*Lo que ahora son solo varas, estos árboles,*

*un día darán fruta y sombra”.*

*Nikola Tesla*

## RESUMEN

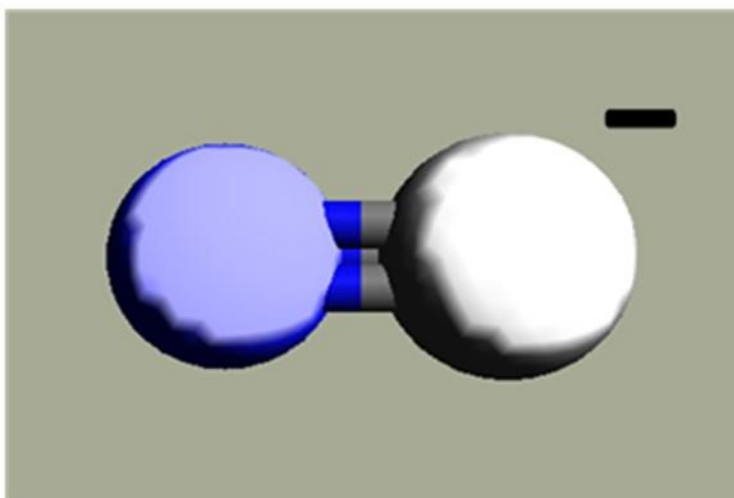
El cianuro es abundante en la naturaleza y se presenta como cianuro inorgánico (HCN) y como nitrilo orgánico (RCN). No obstante su alto grado de toxicidad, se usa en una gran variedad de procesos industriales, principalmente mineros para la lixiviación de metales preciosos, por lo que si no es manipulado de manera adecuada puede originar considerables problemas ambientales. El cianuro se produce también de forma natural, aunque en pequeñas cantidades, por una variedad de plantas, animales y microorganismos como moléculas de defensa o como productos del metabolismo del nitrógeno. Para “convivir” o lidiar con la toxicidad del cianuro, estos organismos han desarrollado enzimas y vías para su degradación o transformación. Las cianuro dihidratasas comprenden un grupo de enzimas bacterianas que catalizan la hidrólisis del cianuro a ácido fórmico y amonio, con una alta especificidad. Pertenecen a la familia conocida como Nitrilasa/Cianuro Hidratasa, que a su vez pertenece a la superfamilia Nitrilasa. Las estructuras cristalográficas de veinte homólogos distantes, sugieren que este grupo de enzimas poseen una triada catalítica particular Glu-Lys-Cys, y una conformación multimérica que presenta un motivo estructural único formado por cuatro capas alfa-beta-beta-alfa ( $\alpha\beta\beta\alpha$  sándwich).

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar cinéticamente 4 enzimas con una mutación de sitio dirigido de la cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* GMA1. Los aminoácidos seleccionados se eligieron a partir de los resultados de un análisis de dinámica y acoplamiento (docking) molecular del modo de unión del sustrato al sitio activo de la enzima. Estudios in silico mostraron que los residuos A133, H308 y W165 se encuentran en contacto con el cianuro durante su entrada al sitio activo, muestran interacciones que estabilizan la unión con el ligante y que pueden ser determinantes en la especificidad por el sustrato. Las mutaciones propuestas fueron: A133V, A133G, H308S y W165F. Las mutantes se purificaron a homogeneidad, se establecieron los métodos para determinar el cianuro consumido o el amonio producido en la reacción y se obtuvieron los parámetros cinéticos para cianuro y algunos nitrilos alifáticos. Observamos que la mutante H308S presenta actividad para CN un orden de magnitud superior a la enzima silvestre, así como también alta especificidad para nitrilos alifáticos, 8 veces mayor a la enzima silvestre y al resto de las mutantes. La mutante W165F no presenta actividad para CN ni para ningún nitrilo. Sugerimos que el triptófano 165 juega un papel importante en la entrada y permanencia del cianuro en el sitio activo, funcionando como compuerta que impide que el sustrato escape del sitio y permanezca dentro el tiempo suficiente para ser hidrolizado.

## INTRODUCCIÓN

### *Cianuro*

El cianuro es un anión monovalente de representación  $\text{CN}^-$ , formado átomo de carbono unido a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple (Figura 1).



**Figura 1. Ión ciano.** Estructura tridimensional del ion ciano cargado negativamente: Un átomo de Nitrógeno (azul) unido por un triple enlace a un átomo de Carbono (gris).

De forma orgánica, estos compuestos son llamados nitrilos de acuerdo a la nomenclatura IUPAC ("International Union of Pure and Applied Chemistry", 2017). El cianuro se puede encontrar en fase acuosa como ácido cianhídrico, formando compuestos como el cloruro cianógeno ( $\text{CNCl}$ ) o en complejos cristalinos tetraédricos como el cianuro de sodio ( $\text{NaCN}$ ) y cianuro de potasio ( $\text{KCN}$ ). El cianuro es un producto químico ampliamente utilizado por la industria minera para la lixiviación de metales preciosos y oro. Su alto grado de toxicidad lo convierte en un compuesto de gran peligrosidad si no es manipulado de manera adecuada, pudiendo originar considerables problemas ambientales. Alrededor del 80% del cianuro fabricado en el mundo se emplea en la producción de químicos orgánicos como nitrilo, nylon y plásticos acrílicos; así como en distintas técnicas de impresión, revelado de fotografías y la producción de goma sintética. Además, el cianuro se utiliza en diversos productos farmacéuticos como el laetril que se utiliza en el

tratamiento de cáncer y el nitroprusiato para reducir la presión arterial (Akcil, 2003). Las formas más comunes de cianuro en el medio ambiente son como complejos de metalocianuros y nitrilos. El cianuro libre comúnmente como HCN a pH de 9.2 o inferiores se vuelve un agente tóxico para el medio acuático (Gurbuz, Ciftci, & Akcil, 2009).

### ***Importancia biológica del cianuro***

El cianuro es un compuesto tóxico que inhibe la respiración y otros procesos del metabolismo celular como la cadena respiratoria; a nivel tisular, el cianuro actúa sobre el sistema respiratorio, impidiendo el uso del oxígeno que se encuentra en el torrente sanguíneo. El cianuro forma un complejo estable con la enzima citocromo oxidasa impidiendo la transferencia de electrones al oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que se inhibe la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP. Las consecuencias de la intoxicación por cianuro son debidas a la hipoxia citotóxica o asfixia celular que provoca, al imposibilitar la utilización del oxígeno en la cadena respiratoria celular. La falta de oxígeno promueve que el metabolismo cambie de aerobio a anaerobio, lo que conlleva a la acumulación de ácido láctico (algo muy parecido a lo que sucede cuando realizamos un esfuerzo muscular muy grande) que desencadena una depresión en el sistema nervioso central que puede causar paro respiratorio y provocar la muerte. La exposición a periodos de inhalación prolongados afecta principalmente el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular.

La intoxicación por cianuro en la especie humana causa efectos nocivos, afectando a los sistemas vitales; de forma natural podemos encontrar que existen organismos como plantas, hongos, algas, insectos y principalmente bacterias para los cuales no resulta ser tóxico, estos organismos presentan mecanismos para utilizarlo como fuente de nitrógeno o lo sintetizan como mecanismo de defensa ante depredadores; también encontramos cianuro de forma sintética, producido de forma antropogénica en industrias como la minera para la extracción de oro principalmente.

Paradójicamente el cianuro resultó de gran importancia para el origen de la vida sobre la Tierra, ya que este compuesto se formó durante las primeras fases de la evolución química a partir de dinitrógeno y metano o de amoníaco y monóxido de carbono (Oró. J., & Lazcano-Araujo. A., 1978).

Existen alrededor de 2000 fuentes de cianuro en la naturaleza, en plantas hongos, bacterias y animales. Cerca de 1.1 millones de toneladas de cianuro de hidrógeno (HCN) son producidas anualmente en todo el mundo de las cuales cerca de 900,000 toneladas se originan ya sea de la producción primaria o como un subproducto en múltiples instalaciones industriales (Mudder, T.I., & Botz, M.M. 2004 Cyanid-Significant). Actualmente existen diversos métodos de tratamiento de eliminación de cianuro: la degradación natural (consta de la volatilización con

posteriores transformaciones atmosféricas y efectos de la luz solar a sustancias menos tóxicas); oxidación química ( $\text{SO}_2/\text{Aire}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ); la precipitación (consta del agregado de otros metales como el hierro para formar complejos); reciclado (consta de la recuperación y reutilización de cianuro para así disminuir la cantidad total de cianuro utilizado) y por último la biodegradación (sistemas activos y pasivos de tratamiento biológico, empleado microorganismos tanto aerobios como anaerobios que remueven el cianuro) (Logsdon, Mark.J. 1999). Los tratamientos para la eliminación de cianuro pueden ser clasificados como destructivos y de recuperación. En los primeros, reacciones químicas o biológicas son utilizadas para convertir al cianuro en un compuesto menos tóxico; mientras que en los segundos, el proceso de reciclaje involucra la remoción del cianuro de la solución (Guerrero Rojas. 2015).

Si hablamos de aquellos microorganismos que emplean CN como fuente de nitrógeno es necesario mencionar que estos poseen una ruta degradativa de cianuro y diversos mecanismos de resistencia, como oxidasas, defensas antioxidantes y sideróforos para la captación de hierro. Durante el metabolismo del cianuro, este induce una respuesta compleja en la que participan proteínas relacionadas con la adquisición de hierro, el estrés oxidativo y la disponibilidad de nitrógeno (Bonete & Martínez-Espinosa, 2009).

### ***Cianuro: Contaminación y Medio Ambiente***

Como ya explicamos, el cianuro se emplea para la fabricación de medicamentos y diferentes procesos durante la extracción de oro en las minas, como consecuencia de ello, ha habido muchos accidentes en el mundo debido a la manipulación incorrecta o falla durante el transporte; si bien es cierto que actualmente existen gran número de procesos para la eliminación de cianuro (químicos y físicos) el problema de la contaminación por cianuro, es que las normas medioambientales son estrictas y el costo del cumplimiento de estas excesivo, por lo que las industrias mineras aún siguen generando químicos con alto impacto ecotoxicológico (Gurbuz, Ciftci, & Akcil, 2009). En el mundo se han presentado diversas crisis ambientales por derrames de cianuro que contaminan mantos freáticos y suelos, que dañan el metabolismo de los organismos que ahí habitan, por lo que es muy importante tomar medidas para el control de las aguas residuales. El tratamiento biológico se ha considerado como técnica de remediación en muchas condiciones: *in situ*, en condiciones aerobias, anaerobias, de forma activa y de forma pasiva (Gurbuz, Ciftci, & Akcil, 2009).



## **Enzimas y Biocatálisis**

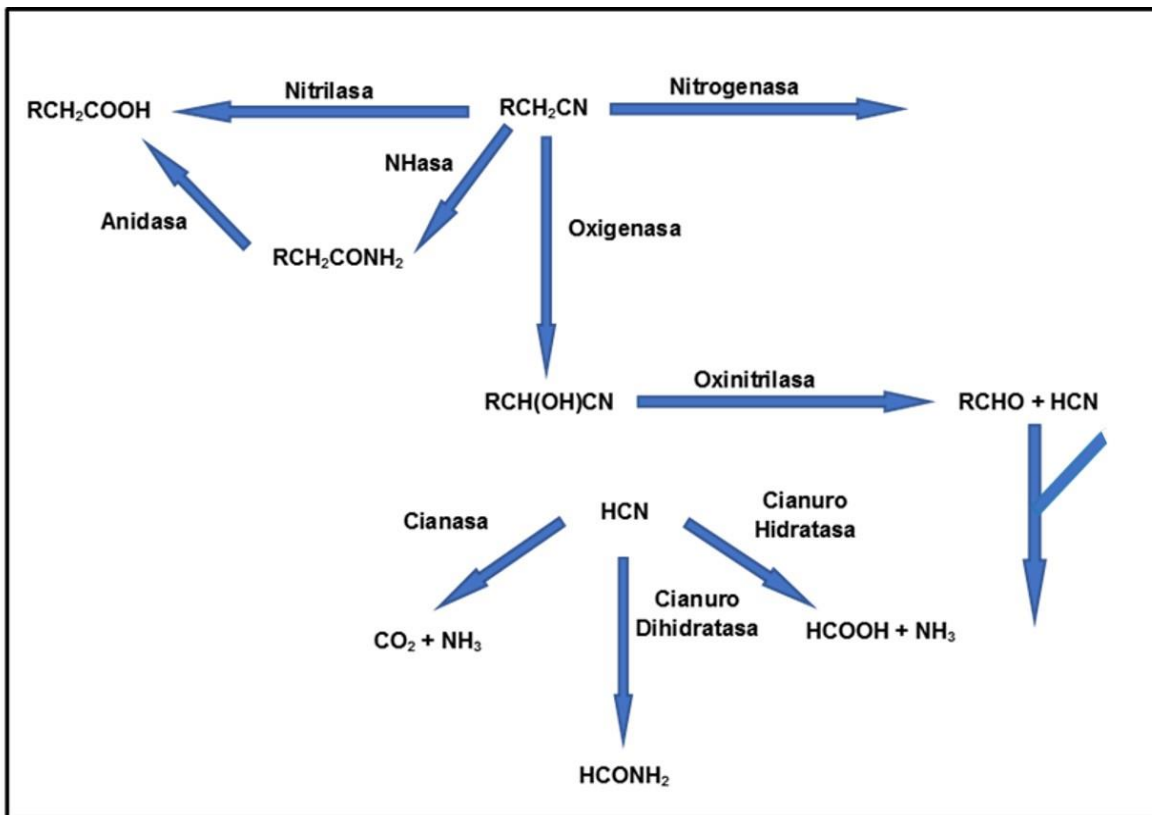
Las proteínas son polímeros de aminoácidos, en los que cada aminoácido está unido con otro por medio de enlaces covalentes, llamados enlaces peptídicos. Estas moléculas o biomoléculas son la base estructural de todas las formas y procesos biológicos en los seres vivos. Para clasificar de forma práctica a las proteínas podemos hacerlo en dos grandes grupos: estructurales y enzimas; las proteínas estructurales son en nuestras células como los bloques, vigas y andamios de un edificio en construcción y las enzimas como todo aquello que produce, suministra y distribuye energía al edificio, las enzimas se encargan de que todas y cada una de las reacciones químicas de nuestras células se lleven a cabo de manera correcta y lo más importante, de forma eficiente, en tiempos sumamente cortos. Las enzimas presentan una alta especificidad hacia su sustrato, funcionan en condiciones bastante específicas de temperatura y pH. Si las enzimas no encuentran las condiciones necesarias ya sea dentro o fuera de la célula no llevan a cabo la reacción catalítica que les corresponde.

Los catalizadores biológicos o enzimas, fueron descritos hasta el siglo XVIII en estudios de digestión de la carne por secreciones del estómago. En 1850 Pasteur llegó a la conclusión de que la fermentación del azúcar en alcohol por la levadura, estaba catalizada por “fermentos”. El descubrimiento de Edward Buchner en 1897 de que los extractos de levadura pueden fermentar azúcar, demostró que las moléculas que intervienen en este proceso pueden seguir funcionando aun cuando se separan de las células vivas; Frederick W. Kühne (1878) llamo a estas moléculas “enzimas”. Varios años más tarde, el aislamiento y cristalización de la ureasa por James Sumner (1926) proporciono un gran avance en el estudio de las enzimas; observó que los cristales de esta enzima estaban constituidos de forma semejante a los de las proteínas y postulo que “todas las enzimas son proteínas”. Alrededor del año de 1930 J. B. S. Haldane escribió un tratado denominado “*Enzimas*”, en este se sugería que la enzima y el sustrato mantenían contacto por interacciones de enlaces débiles y que estos podían catalizar la reacción, esta sería la base de la “Catálisis enzimática” (Cox, Lehninger, & Nelson, 2005).

## **Microorganismos degradadores de cianuro**

Muchos microorganismos tienen de forma intrínseca, la capacidad para degradar compuestos orgánicos que entran en el ambiente como consecuencia de la contaminación y de actividades naturales (Dubey, & Holmes, 1995); dentro del grupo de compuestos orgánicos utilizados por estos microorganismos encontramos al cianuro. Los organismos con la capacidad para transformarlo poseen sistemas enzimáticos específicos y vías para degradarlo. Algunas especies de hongos como *Fusarium sp.* y *Hansenula anomala* o bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Cifrobacter freundii* y diferentes variedades de *Bacillus*, pueden utilizar cianuro como fuente de nitrógeno y/o carbono generando en la mayoría de los casos  $\text{NH}_3$  como intermediario (Dubey, & Holmes, 1995). Algunos de

estos microorganismos han sido utilizados para la degradación de cianuro contaminante, proporcionando oportunidades para el desarrollo de métodos biológicos de degradación y detoxificación en aguas y suelos contaminados. En la Figura 2 se muestran las vías de degradación de cianuro hasta el momento conocidas, las enzimas involucradas y los productos obtenidos en las reacciones (Gupta, Balomajumder, & Agarwal, 2010).



**Figura 2. Vías de degradación de cianuro.** Rutas de degradación de cianuro por distintas enzimas que hidrolizan cianuro y compuestos derivados. El cianuro se convierte en primer lugar en  $\text{CO}_2$ , amoníaco y ácido fórmico que requieren los microorganismos para su crecimiento. (Figura modificada de Gupta, Balomajumder, & Agarwal, 2010).

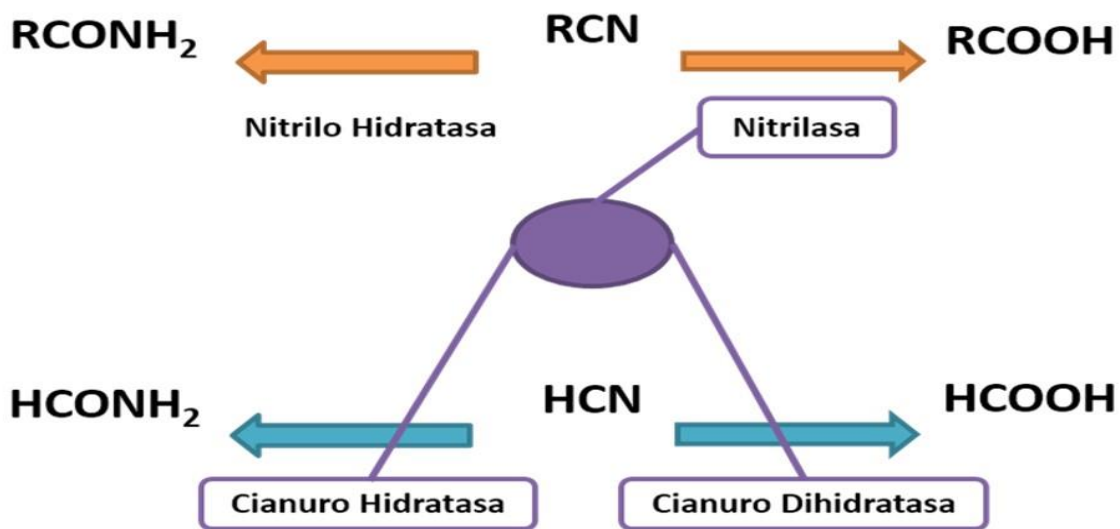
### ***Bacillus pumilus***

El género *Bacillus* spp., está formado por bacterias móviles por flagelos periticos (flagelos que rodean el perímetro de la célula) en su mayoría aerobios estrictos. Algunos miembros de este género son capaces de producir endosporas que resisten altas temperaturas, desecación, radiación, ácidos y desinfectantes químicos (SNEATH, 1989). *Bacillus pumilus* es una bacteria gram negativa que forma endosporas. Se encuentra en suelos y en la raíz de plantas presentando una actividad antibacteriana y antifúngica.

En 1993 Meyers y colaboradores identificaron una cepa de *B. pumilus* C1 con la capacidad de degradar altas concentraciones de cianuro, aislada de una presa de aguas residuales de cianuro. Posteriormente se aisló, purificó y caracterizó a la enzima responsable de esta actividad, una cianuro dihidratasa llamada también cianidasa, que cataliza la conversión de cianuro en formamida y amonio (Meyers 1993). Las cianuro dihidratasas descritas a la fecha, comprenden un grupo de enzimas bacterianas que incluyen a organismos como *Alcaligenes xylosoxidans* subsp *denitrificans*/DF3, *B. pumilus* C1, *Pseudomonas stutzeri* AK61 y *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764.

### **Cianuro dihidratasa - Cianuro hidratasa**

Las primeras cianuro dihidratasas descritas, comprenden un grupo de enzimas bacterianas que incluyen a organismos como *Alcaligenes xylosoxidans* subsp *denitrificans*/DF3, *Bacillus pumilus* C1 y *Pseudomonas stutzeri* AK61. Como se mencionó anteriormente la hidrólisis enzimática del cianuro (HCN) es catalizada por un grupo de enzimas específicas (ver Figura 2). Las cianuro dihidratasas (CynD) producidas por bacterias, y las cianuro hidratasas (CHT) producidas exclusivamente por hongos, catalizan la hidrólisis específica del cianuro inorgánico. Las CynD lo hidrolizan en ácido fórmico y amonio, mientras que las CHT lo convierten a formamida (Figura 3).

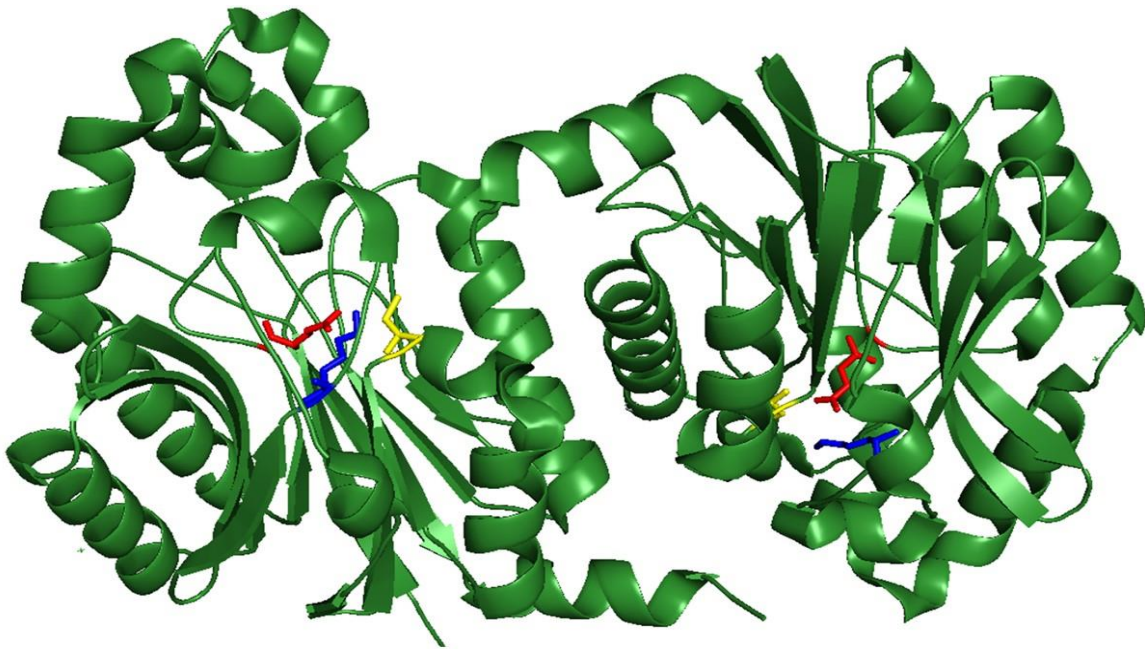


**Figura 3. Conversión del CN/nitrilo.** La conversión enzimática de HCN/Nitrilo a su correspondiente ácido puede llevarse a cabo en un paso, como es el caso de las nitrilasas y las dihidratasas, o en dos pasos con una amida de intermediario como en el caso de las nitrilo hidratasas y las cianuro hidratasas.

Tanto las CynDs como las CHTs se agrupan en una familia llamada Nitrilasa/cianuro hidratasa, que incluye a las nitrilasas, enzimas que catalizan la transformación de nitrilos orgánicos en sus correspondientes ácidos carboxílicos y amonio. Esta familia pertenece a su vez, a la superfamilia Nitrilasa, que agrupa en trece ramas distintas a las hidrolasas carbono-nitrógeno (Pace, 2001). Sólo una de las ramas contiene a las nitrilasas/CynD y CHT, mientras que en las otras restantes están representadas entre otras, las amidasas, carbamilasas y *N*-aciltransferasas . Más de un centenar de secuencias, además de las estructuras cristalográficas de once homólogos y de dos nitrilasas microbianas permitieron identificar en las distintas familias, una triada catalítica particular E-K-C (Figura 4), y una conformación multimérica que presenta en su plegamiento un motivo estructural único formado por cuatro capas  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  (Figura 5), denominado ABBA “sándwich”.

1 - Nitrilase	f P E a f	h R K I . p T	l . C W E n . . p
2 - Aliphatic Amidase	F P E Y S	Y R K i P W c	i l C d D G n y P
3 - N-terminal Amidase	F P E . .	Y r K . F L .	. l C M D . . P Y
4 - Biotinidase	f P E d .	Y r K . h L y	F t C F D i l f y
5 - Beta-ureidopropionase	. Q E A W	. R K N H I P	N i C Y G R H H P
6 - Carbamylase	F p E L A	Y R K i H L P	f l C N D R R W P
7 - Pro. NAD+ Synthetase	f P E L .	. . K . . L P	. l C E D . w . p
8 - Euk. NAD+Synthetase	G P E L E	R p K m . l a	E i C E E L w . p
9 - ALP N-acyltransferase	w p E . a	. . K . . l v	. i C y E . . f .
10 - Nit and NitFhit	L P E . f	y r K . H I F	. i C Y D . R F p
11 - NB11	. q E l f	Y R K . H I P	. i C w D q w f p
12 - NB12	F P E i F	Q y K l H i T	q l C Y D i E F P
13 - Non-fused Outliers	l P E . .	y r K . h L f	. i C y d . r F p

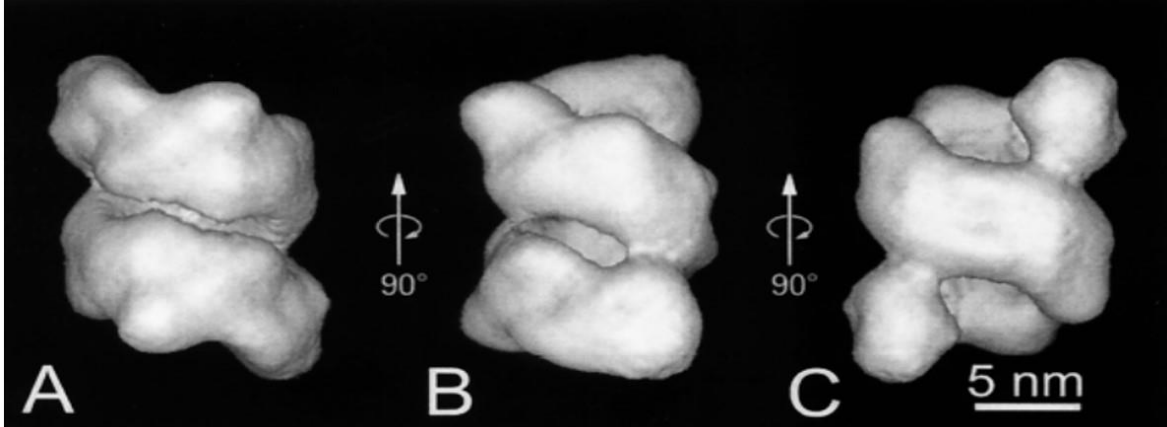
**Figura 4. Identificación de la triada catalítica.** En letras rojas se muestran los residuos altamente conservados en las trece ramas (Modificado de Pace y Brenner, 2001).



**Figura 5. Dímero de nitrilasa de *Syechocystis PCC6803* (3wuy).** Los residuos de la triada catalítica se muestran en cada uno de los monómeros E53 (rojo), K135 (azul) y C169 (amarillo).

Las nitrilasas están formadas por subunidades de aproximadamente 37 kDa que se asocian en homooligómeros de diferentes tamaños (Dubey, & Holmes, 1995). Una característica particular de las CynD es su capacidad para formar estructuras cuaternarias en forma de espirales. Los monómeros de *P. stutzeri* y *B. pumilus* C1 forman espirales con un tamaño definido, 14 y 18 subunidades respectivamente. La estructura cuaternaria se determinó por microscopía electrónica con tinción negativa y reconstrucción tridimensional (Figura 6). En el caso de la CynD de *B. pumilus* C1, los agregados espirales de 18 subunidades pueden formar fibras helicoidales regulares de mayor tamaño, al incubar la enzima a pH 5.4. El modelo estructural generado revela que cada vuelta de hélice comprende 4.9 dímeros. (Jandhyala, et al. 2003).

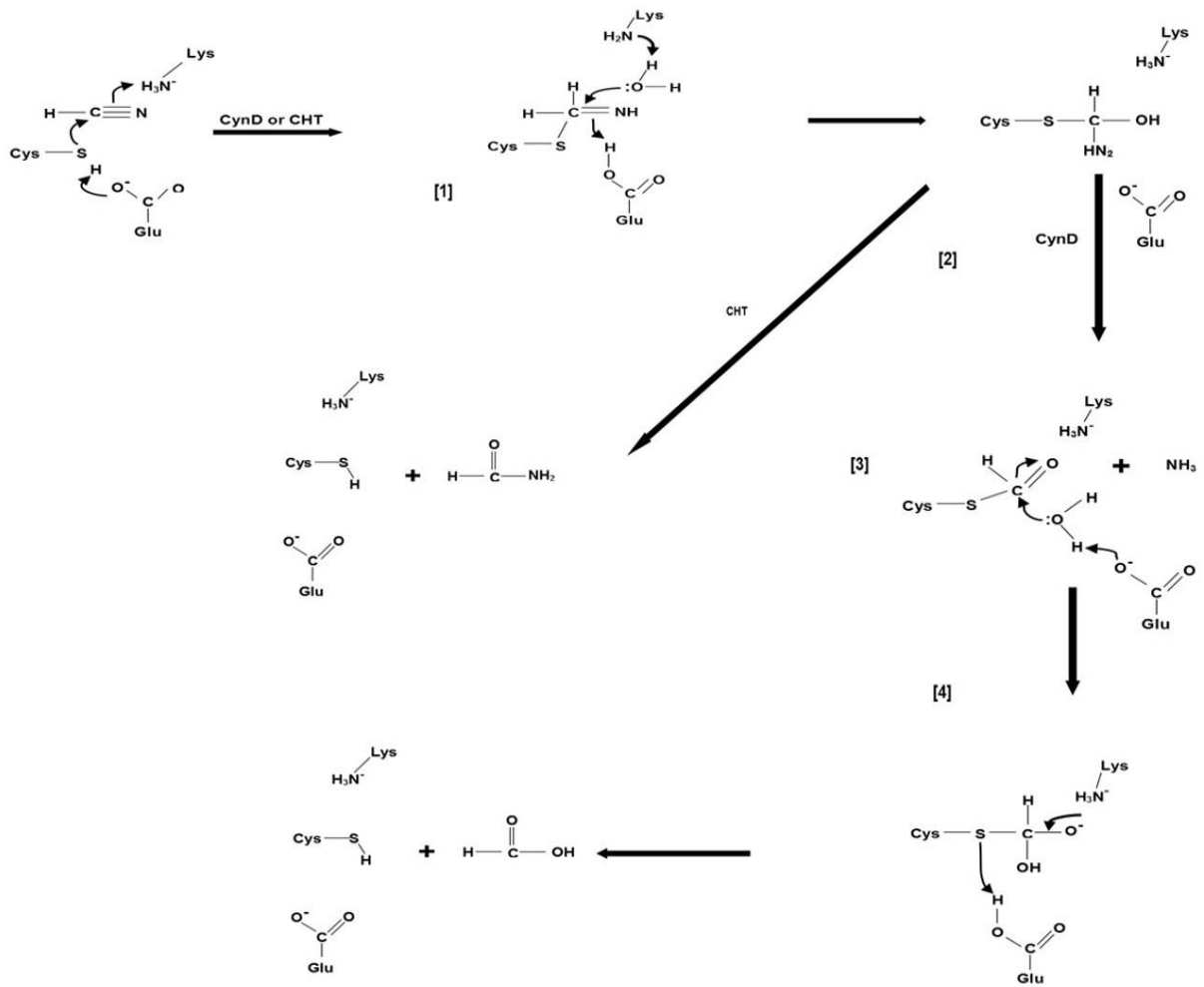




**Figura 6. Estructura cuaternaria de la enzima CynD.** Tres reconstrucciones tridimensionales a partir de micrografía de electrones con tinción negativa de la CynD de *B. pumilus* C1 a 3.2 nm de resolución. Vistas hacia abajo (A y C) y perpendicular (B) del eje de simetría de orden dos. La estructura es un espiral de dos vueltas formadas por 18 subunidades. (Imagen tomada de Jandhyala 2003).

### ***Mecanismo de reacción***

Jandhyala y colaboradores (2005) propusieron un mecanismo de reacción para las CHD y CynD, considerando la presencia de la tríada catalítica. En la Figura 7 se muestra el mecanismo propuesto: El glutamato actúa como base general activando un ataque nucleofílico por la cisteína al nitrilo formando un tioamidato (Paso 1). Después la lisina, actúa como base general catalizando una hidrólisis para producir un intermediario tetraédrico (Paso 2). En el caso de las cianuro hidratatasas el enlace C-S se rompe y provoca la liberación de formamida, mientras que en las cianuro dihidratatasas se rompe el enlace C-N dando lugar a la liberación de amonio y la formación de una acilenzima (Paso 3). El glutamato activa una segunda hidrólisis que conduce a la formación de un segundo intermediario tetraédrico (Paso 4) que se rompe para formar ácido fórmico (Jandhyala, Willson, Sewell, & Benedik, 2005). Mutaciones en alguno de estos residuos causan la pérdida total de la actividad enzimática (Watanabe, et al.1998), así como la adición de metales pesados, principalmente el  $Hg^{2+}$  disminuyen de manera considerable la actividad de este grupo de enzimas.



**Figura 7. Mecanismo de reacción.** Propuesta del mecanismo de reacción para las Cianuro dihidratasas y las Cianuro hidratasas. (Modificado de Jandyala et al. 2005).

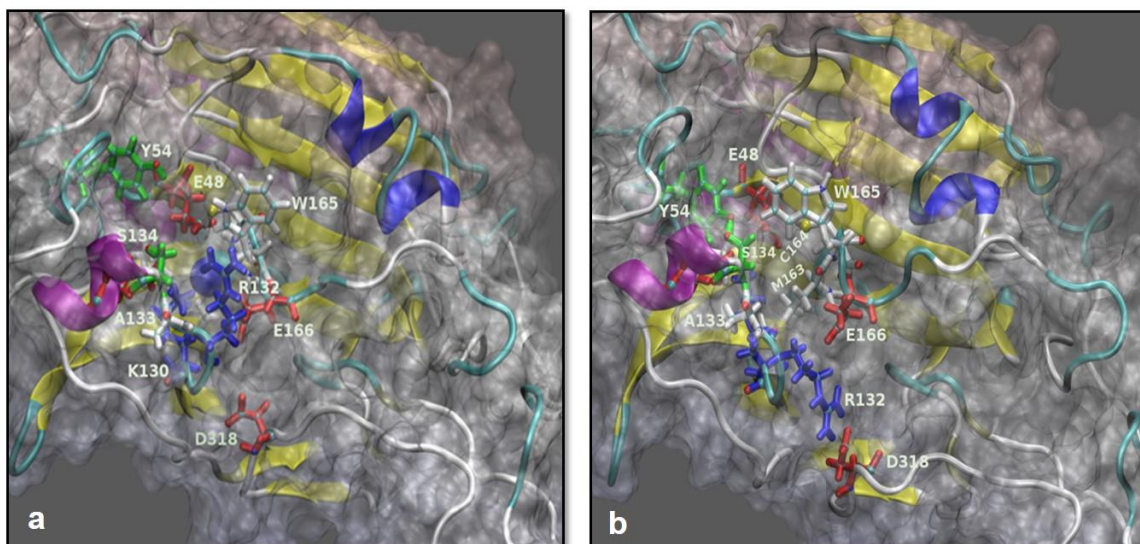
## ANTECEDENTES

### **Cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* GMA1**

En el laboratorio se clonó y caracterizó cinéticamente la enzima CynD silvestre de *Bacillus pumilus* GMA1, bacteria aislada de aguas termales mexicanas (Granados 2009). La enzima recombinante expresada con una etiqueta de histidina (His-tag) en el extremo C-terminal presentó actividad con cianuro. Los parámetros cinéticos reportados,  $K_M$  de 8.8 mM y  $k_{CAT}$  de 228 s<sup>-1</sup> se obtuvieron empleando el método colorimétrico para la detección de cianuro con ácido pícrico (Fisher & Brown, 1952) estos valores son comparables con los reportados para la CynD de *B. pumilus* C1 y de *P. stutzeri* (Jandhyala, 2005).

Actualmente no se cuenta con la estructura cristalográfica de ningún miembro de este grupo de enzimas, por lo que fue necesario emplear herramientas de modelado por homología y dinámica molecular para predecir su conformación. En colaboración con el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres de la Facultad de Química de la UNAM, se obtuvo un modelo estructural del monómero de la CynD de *B. pumilus* GMA1, a partir del cual se determinó, mediante experimentos de dinámica molecular (cada átomo del sistema que se simula incluyendo a las moléculas de iones y solvente, se representa con una partícula. El tiempo de simulación se divide en pequeños lapsos en cada uno de los cuáles se obtiene la posición y velocidad de las partículas que se describen mediante principios de física clásica. El resultado de estas simulaciones es una trayectoria que especifica la evolución espacial del sistema, Dror et al., 2012) y acoplamiento molecular (docking), la forma en la que el cianuro se une al sitio activo. Los resultados de las simulaciones mostraron las interacciones de los aminoácidos pertenecientes a la triada catalítica y de algunos de los residuos de la cavidad del sitio activo que parecen estabilizar la unión del ligante, y que pueden ser determinantes en la especificidad por cianuro. En la Figura 8a se muestra el sitio activo de la enzima modelada, ligado al CN y 10 ns después de que el CN salió del sitio activo. En la apoenzima se puede ver un bolsillo estrecho formando la cavidad del sitio activo en el que está presente la tríada catalítica canónica. Al menos uno de los residuos, triptófano 165, estéricamente obstaculiza la entrada a la cavidad del sitio activo, lo que sugiere que su movilidad funciona como una compuerta para la unión del sustrato (Figura 8b). La arginina 132 y la alanina 133 también mostraron cambios conformacionales significativos tras la unión del cianuro, girando su orientación cuando se encuentra ligado al sitio activo (Figura 8a) y regresando a su posición original cuando abandona el sitio (Figura 8b). Un caso especial es la histidina 308, residuo que forma parte de la cavidad por donde entra el cianuro, pero se encuentra 8 a 10 Å del sitio activo. Sin embargo, en todas las simulaciones realizadas se observó consistentemente la interacción de la H308 con el cianuro.





**Figura 8. Experimentos de acoplamiento de la enzima CynD.** **a)** Sitio activo ocupado por una molécula de CN (esfera azul), se muestran algunos residuos pertenecientes a la triada catalítica: Glu 48 y Lys 130; así como también los residuos seleccionados para realizar las mutaciones sitio dirigidas: Trp 165 y A133. **b)** Apoenzima 10 ns después de la salida del CN del sitio activo; además se observan algunos los residuos pertenecientes a la triada catalítica: Glu 48 y Cys 164; e igualmente los residuos A133 y Trp 165. Los residuos de aminoácidos se muestran de acuerdo al código de colores (Corey, Pauling, Koltun).

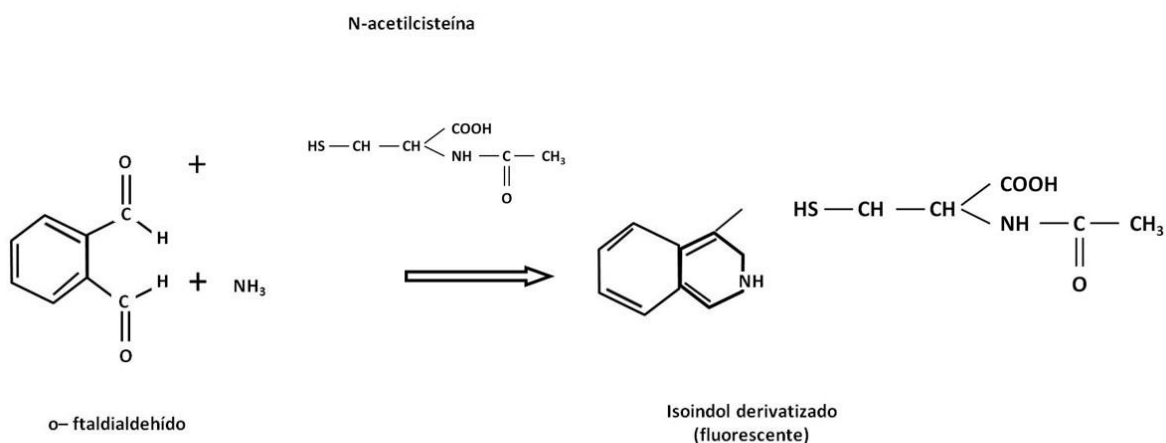
### ***Detección de cianuro***

Dada la importancia del cianuro en la industria minera, el análisis químico resulta ser complejo y de gran importancia para su control durante la cianuración y la descarga de efluentes. Para el análisis de cianuro existen una gran variedad de métodos analíticos disponibles, sin embargo estos presentan dificultades a causa de la interferencia de algunos elementos presentes en la solución, por lo que el análisis resulta complicado y los resultados pueden variar de forma significativa según el método utilizado (Nava-Alonso, Elorza-Rodríguez, Pérez-Garibay, & Uribe-Salas, 2007). En la hidrólisis enzimática del HCN se han reportado diferentes métodos para medir la desaparición del cianuro, o la aparición del amonio o ácido fórmico, productos de la reacción catalizada por la CynD. Los métodos más comunes son colorimétricos como el de ácido pícrico para cuantificar el cianuro o el del fenol-hipoclorito para el amonio. En este apartado nos enfocaremos específicamente en el método de detección de cianuro por ácido pícrico y un método fluorimétrico de detección de amonio por o-Ftaldialdehído.

En 1952 Fisher & Brown propusieron un método de detección de cianuro que tendría ciertas ventajas sobre otros métodos colorimétricos. El principal atractivo analítico del picrato como reactivo radica en los cambios de coloración que sufre durante la reacción, la cual puede ser registrada fácilmente y correlacionada con la concentración del analito; en general los procedimientos que involucran ácido pícrico implican la destilación de ácido cianhídrico de la muestra acidificada en una solución de carbonato de sodio a la que se añade ácido pícrico. El picrato entonces

se reduce por el cianuro para formar un compuesto colorido que se compara con el color producido en una solución estándar de cianuro (Fisher & Brown 1952).

El método de detección de amonio por espectrometría permite una gran selectividad espectral, dos monocromadores se utilizan, uno para la longitud de onda de excitación y el otro para la fluorescencia emitida (Stokes). Este método se puede utilizar como una buena alternativa para la determinación de la actividad enzimática de los sistemas productores de  $\text{NH}_3$  (Banerjee, Sharma & Banerjee, 2003). En colaboración con el Dr. Menandro Caramillo se estandarizó y ajustó el método de detección de amonio por medio de la formación de un complejo estable amonio-o-ftaldialdehído (OPA); en esta reacción el OPA actúa primero como un agente reductor con el N-acetil-cisteína (OPA-NAC) que en presencia de amonio produce un isoindol del cual se mide su emisión a 415 nm (Figura 9). La aplicación de este método reduce las posibles interferencias con aminas, amidas y otros compuestos, por lo que fue empleado en la determinación de los parámetros cinéticos en este trabajo.



**Figura 9. Reacción del método OPA-NAC.** Formación del isoindol derivatizado que emite la señal de fluorescencia.

## JUSTIFICACIÓN

A partir de los resultados de los experimentos de dinámica y acoplamiento molecular en el modelo estructural del monómero de la CynD de *B. pumillus* GMA1, se diseñaron mutantes sitio-específicas de algunos de los aminoácidos que mostraron cambios conformacionales significativos al unir el cianuro (Figura 8). Las mutaciones seleccionadas permitirán validar los resultados de las simulaciones y determinar la contribución de estos residuos en la afinidad y especificidad por el cianuro. Las cuatro mutantes propuestas fueron: A133G, A133V, W165F y H308S. Estas mutaciones buscan mantener casi en su totalidad las características químicas de los residuos de aminoácidos de la enzima silvestre, como son polaridad, aromaticidad y nucleofilicidad, modificando esencialmente el tamaño de las cadenas laterales. El cambio propuesto debería mantener la estructura nativa de las mutantes, afectando el grado de interacción con el sustrato, los contactos con los aminoácidos que los rodean y el volumen de la cavidad del sitio activo; si esto es así, la actividad catalítica de la enzima y la afinidad por el sustrato se verán afectadas, así como también la actividad frente a diferentes nitrilos.

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de las mutaciones individuales A133G, A133V, H308S y W165F en la actividad y especificidad de la CynD de *B. pumilus* GMA1

### OBJETIVOS PARTICULARES

- i) Sobreexpresar y purificar la enzima silvestre y las enzimas mutantes: A133V, A133G, H308S y W165F.
- ii) Corroborar los parámetros cinéticos reportados  $V_{\text{máx}}$ ,  $k_{\text{CAT}}$  y  $K_{\text{M}}$  de la enzima silvestre.
- iii) Estandarizar los métodos para determinar el cianuro consumido o el amonio liberado en los ensayos de actividad.
- iv) Determinar los parámetros cinéticos  $V_{\text{máx}}$ ,  $k_{\text{CAT}}$  y  $K_{\text{M}}$  de las enzimas mutantes.
- v) Probar y evaluar la actividad sobre nitrilos alifáticos y aromáticos para determinar cambios en la especificidad del sitio activo.

## ***HIPÓTESIS***

De acuerdo con los resultados mostrados por experimentos de acoplamiento molecular en la CynD silvestre, algunos aminoácidos parecen estar en contacto con el sustrato (CN) durante la entrada a la cavidad del sitio activo, se identificaron tres aminoácidos que sufren los mayores cambios conformacionales: A133, H308 y W165. Si estos aminoácidos están relacionados con la entrada y unión del sustrato al sitio activo, mutaciones puntuales modificarán la actividad catalítica y la especificidad por el sustrato.

## **MÉTODO**

### ***Crecimiento de células y sobreexpresión de las enzimas***

Los genes se mandaron a sintetizar en la empresa Epoch Life Science, en un vector de expresión pET22b (Novagen®) (de manera independiente, un gen para cada mutación). Para la sobreexpresión de cada enzima se transformaron células de *E. coli* BL21 pLysS, con el vector correspondiente a cada una de los genes. A partir de una colonia del cultivo en medio sólido LB-ampicilina se inocularon 50 mL de medio líquido LB-ampicilina y se mantuvieron en incubación durante 12 horas a 37 °C en agitación constante (250 rpm). Una vez transcurridas las 12 horas, se centrifugó el precultivo durante 15 minutos a 5000 rpm y las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB, con éste se inoculó 1 L del mismo medio con ampicilina, el cultivo se mantuvo a 37 °C en agitación constante hasta que alcanzó una  $D_{0.600} \approx 0.6$ , y se adiciono como inductor, IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) a una concentración de 0.4 mM para promover la sobreexpresión proteica. La sobreexpresión se llevó a cabo a 37 °C en agitación constante (250 rpm) durante 4 horas.

### ***Cosecha de células***

Una vez transcurridas las 4 horas de sobreexpresión, las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min. Para corroborar la sobreproducción de las proteínas se tomaron muestras antes y después de la inducción, para posteriormente ser analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% con dodecilsulfuro de sodio (SDS-PAGE).

### ***Fragmentación celular***

Después de centrifugar las células, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 40 mL de solución amortiguadora de lisis/lavados ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, pH 7.5). Las células se rompieron con el método de sonicación a 4 °C con 10 pulsos a 35% de amplitud y 45 segundos de duración con 2 minutos de espera entre cada intervalo. El extracto celular total se centrifugó a 15000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se tomó una alícuota de 1mL del sobrenadante para su posterior análisis en gel de poliacrilamida, el resto se utilizó para la purificación de la proteína.

### ***Purificación de las enzimas***

El sobrenadante resultante se pasó por una columna de afinidad de níquel con una resina Protino Ni-TED, ya que las enzimas presentan cola de histidinas en el carboxilo terminal para facilitar su purificación. La columna fue previamente equilibrada con 60 mL de solución amortiguadora 1: lisis/lavados ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, pH 7.5), para después pasar el resto de la muestra. Antes de la elución de la enzima, se realizaron lavados con 2 concentraciones distintas de Imidazol: solución amortiguadora 1 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, pH 7.5) y solución amortiguadora 2 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 15 mM, pH 7.5). Para la elución de la enzima se realizó un lavado con 100 mL de solución amortiguadora 3 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 100 mM, pH 7.5), las fracciones de elución se colectaron en tubos de ensayo, obteniendo 4 mL en cada una de ellas, hasta colectar 100 mL totales.

Las fracciones obtenidas en cada paso de purificación fueron analizadas por medio de SDS-PAGE al 12.5% para detectar las fracciones en donde la enzima se encontrara más pura y en mayor concentración. Una vez detectadas, se colectaron y concentraron utilizando cartuchos de filtración (Amicon Ultra de 15 mL, con 10 kDa de MWCO), hasta alcanzar un volumen final de 10 mL. Para la obtención de la muestra final, se realizó una diálisis de 12 horas realizando dos cambios de solución amortiguadora de fosfatos + NaCl ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM), al finalizar la diálisis se centrifugó la muestra durante 10 min a 14000 rpm a una temperatura de 4 °C y se recuperó el sobrenadante, obteniendo así la muestra final.

### ***Pruebas de actividad enzimática para cianuro***

Las pruebas de actividad enzimática para cianuro se realizaron con el método colorimétrico propuesto por Fisher & Brown en 1952, mediante el cual se determina el cianuro residual en un tiempo determinado de reacción. Para la realización de este método, se prepararon tubos de 1.5 mL con una mezcla de reacción de 1 mL con solución amortiguadora de fosfatos y NaCl con un pH de 7.5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM+NaCl 300 mM), 2.5 mM de cianuro de potasio (KCN 50 mM) y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de enzima. El ensayo se llevó a cabo a una temperatura de 30 °C durante 30 minutos. Pasado dicho tiempo de incubación se tomaron 0.05 mL de la reacción y se adicionaron 0.1 mL de una mezcla de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$  0.5 M) y ácido pícrico 1% (p/v) en una relación 1:1. Las muestras se colocaron en baño maría durante 6 min, inmediatamente después se añadieron 850  $\mu\text{L}$  de agua y se dejaron a temperatura ambiente para finalmente medirse a  $\lambda_{520}$ . La actividad catalítica de cada una de las enzimas, se determinó bajo las mismas condiciones, tomando como el 100% la actividad de la enzima silvestre.

### ***Dicroísmo circular (DC)***

Las enzimas se dializaron en solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM + NaCl 300 mM, después se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se filtraron a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  500  $\mu\text{L}$  de cada enzima, se realizaron diluciones para tener una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; las mediciones se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-715 equipado con un portaceldas tipo Peltier. La elipticidad molar  $[\theta]$  por residuo se calculó utilizando una masa promedio de 110-111 gramos por mol de aminoácido.

El análisis de deconvolución de los espectros de DC se realizó con la paquetería CDPro (disponible en <http://lamar.colostate.edu/Bsreeram/CDPro/ListPro.htm>), con los programas CONTINLL, CDSSTR y SELCON3.

### ***Dispersión dinámica de luz (DLS)***

Las enzimas se dializaron en solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM + NaCl 300 mM, después se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min en centricones, se recuperó el sobrenadante y se filtraron a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ . Cada enzima se ajustó a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para después ser transferidas a cubetas de cuarzo rectangulares para realizar la lectura en un equipo Zetasizer (Malvern) a 25 °C.

### ***Determinación de parámetros cinéticos: $K_M$ y $k_{CAT}$***

*Método colorimétrico (ácido pícrico). Construcción de la curva patrón de KCN*

Para obtener una curva patrón que nos mostrara la sensibilidad de este método, su estabilidad en el tiempo y la proporción adecuada entre las muestras de reacción y la mezcla de ácido pícrico-bicarbonato de sodio se construyeron distintas curvas patrón con distintas concentraciones de KCN y variando la proporción entre la reacción y la mezcla de ácido pícrico-carbonato de sodio: en tubos de 1.5 mL se preparó una mezcla de reacción con distintas concentraciones de KCN que iban de 0 a 15 mM (solución stock de 50 mM) ajustadas a 1 mL de volumen final con solución amortiguadora de MOPS-NaCl pH 8.0 (MOPS 170 mM + NaCl 50 mM) se incubaron durante 30 min a 30 °C. Para la detección del cianuro presente se prepararon tubos de 0.6 mL con distintas cantidades de mezcla de ácido pícrico-carbonato de sodio, a estos tubos igualmente se añadieron distintas cantidades de muestra de reacción (Tabla 1). Una vez tomadas las alícuotas se colocaron en baño maría durante 6 minutos, inmediatamente después se añadieron 0.85 mL de agua y se dejaron a temperatura ambiente para finalmente medirse a  $\lambda_{520}$ .

**Tabla 1. Proporciones de mezcla de ácido pícrico y mezcla de reacción.** Se realizaron diferentes combinaciones de mezcla de reacción y mezcla de ácido pícrico para la construcción de las curvas patrón.

Proporción	
Reacción (μL)	Mezcla pícrico (μL)
50	200
200	100
200	500
300	500
100	50
80	100

#### *Parámetros cinéticos*

Para determinar los parámetros cinéticos de la enzima silvestre por el método colorimétrico de Fisher & Brown se implementó el siguiente protocolo: en tubos de 1.5 mL se preparó una mezcla de reacción con solución amortiguadora de MOPS-NaCl a un pH de 8.0 (MOPS 170 mM + NaCl 50 mM), KCN en concentraciones de 0 a 5 mM (KCN stock 50 mM) y 25 μg/mL de enzima, teniendo un volumen final de 1 mL. La reacción comienza con la adición de la enzima a la mezcla de reacción (solución amortiguadora + KCN) incubando durante 3 min a 30 °C; al finalizar el tiempo de reacción se tomaba una alícuota de 0.05 mL de la reacción final y se colocaban en tubos de 1.5 mL a los que ya previamente se les había colocado 0.1 mL de la mezcla de ácido pícrico (NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M + ácido pícrico p/v), inmediatamente se hervían en baño maría durante 6 minutos, después se les añadían 0.85 mL de agua destilada y se dejaban enfriar a temperatura ambiente para posteriormente ser leídos en el espectrofotómetro a λ<sub>520</sub>.

#### **Método fluorimétrico (OPA-NAC)**

La medición fluorimétrica para detectar el amonio producto de la reacción enzimática se llevó a cabo preparando la mezcla de detección de amonio, en una celda de cuarzo de 10 mm de paso de luz en agitación continua, en el siguiente orden: 1.9 mL de agua desionizada, 0.1 mL de la muestra, 0.1 mL de solución



amortiguadora de Boratos 0.5 M pH 10.8 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.5M) y finalmente 0.96 mL de una mezcla de OPA-NAC 8.8 mM disuelta en solución amortiguadora de boratos 0.5 M pH 10.8, teniendo así, una reacción con un volumen final de 3 mL, toda la mezcla se mantiene en agitación constante a una temperatura de 25 °C; para la lectura se utilizó una apertura (slit) de 8 nm de excitación y 4 nm de emisión, con  $\lambda_{415}$  de extinción y a  $\lambda_{485}$  de emisión. Los datos se colectaron cada 5 segundos durante 500 segundos de lectura en cada medición.

### ***Pruebas de actividad para nitrilos***

Para comprobar la actividad enzimática hacia diferentes nitrilos, se utilizó el kit Spectroquant de Merck® de cuantificación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), en el cual una mezcla alcalina de fenol e hipoclorito reacciona con el amonio de la muestra usando nitroprusiato de sodio como catalizador y desarrollando una coloración azul que es directamente proporcional a la cantidad de amonio presente. Los nitrilos empleados para determinar la actividad tipo nitrilasa son los siguientes: Benzonitrilo, Valeronitrilo, Acrilonitrilo, Propionitrilo y Adiponitrilo. Para realizar este ensayo, se preparó una mezcla de reacción en tubos de 1.5 mL con solución amortiguadora de fosfatos y cloruro de sodio a un pH de 7.5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM + NaCl 300 mM), una solución stock de 100 mM de cada nitrilo y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de enzima, teniendo una concentración final de 1 mM de sustrato y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de enzima en una reacción con un volumen final de 1 mL. La reacción comienza con la adición de la enzima en la mezcla de reacción, incubando a 30 °C durante 60 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se agregan 0.1 mL de ácido clorhídrico 2N para detener la reacción. Posteriormente, cada reacción se cambia a tubos de ensayo a los cuales previamente se les añadió 3.9 mL de agua destilada. Para llevar a cabo la detección de amonio producido durante la reacción se emplea el protocolo del kit de detección, al finalizar cada uno de los pasos de detección se incuban las muestra a temperatura ambiente por 5 minutos para ser medidos a  $\lambda_{690}$ .

### ***Determinación de parámetros cinéticos para nitrilos: $V_{\text{máx}}$ y $K_M$***

Una vez comprobada la actividad para nitrilos, se llevaron a cabo los ensayos de cinética, para cada sustrato (Adiponitrilo, Acrilonitrilo y Propionitrilo). Se utilizó el método de cuantificación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) utilizando el kit Spectroquant de Merck®. Al igual que para las pruebas de actividad con nitrilos, se preparó una mezcla con solución amortiguadora de fosfatos y cloruro de sodio a un pH de 7.5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM + NaCl 300 mM), una solución stock de 100 mM de cada nitrilo y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de enzima a excepción de la mutante A133V, en la cual se utilizó una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; las concentraciones de sustrato se variaron en cada mezcla de reacción; la reacción comenzó adicionando la enzima en la mezcla en una reacción con un volumen final de 1 mL, con un tiempo de 30 minutos a 30 °C en agitación constante, al finalizar la reacción se añadían 0.1 mL de HCl 2N para detener la reacción. A continuación se aplicaba el protocolo del kit de detección para

medir las muestras a  $\lambda_{690}$ . Es importante mencionar que los stock de nitrilos se preparaban en su límite de solubilidad en H<sub>2</sub>O, en el caso del Benzonitrilo y el Valeronitrilo, no fue posible ajustar un protocolo que nos permitiera aumentar la concentración de estos sustratos sin sobrepasar el límite de solubilidad (10 mg/mL), por lo cual fueron descartados para los ensayos cinéticos. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado, por lo que en los resultados se muestran los promedios con sus respectivas barras de error.

## RESULTADOS

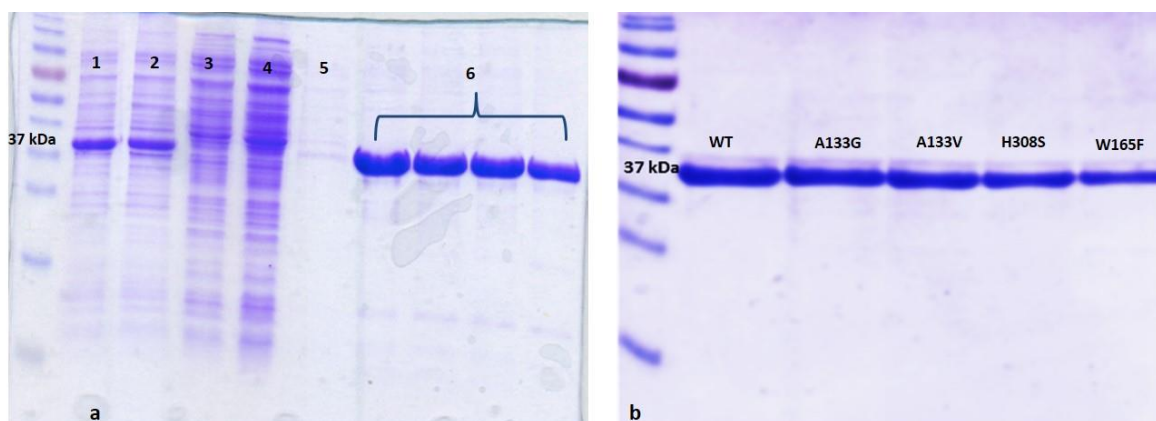
### ***Sobreexpresión y purificación de las enzimas***

Se transformaron células electrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) plys con el gene correspondiente a cada una de las enzimas. Las enzimas se sobreexpresaron de forma exitosa después de 4 horas de inducción con IPTG. En la Figura 10 se muestra la diferencia entre las muestras antes de la inducción y después de la sobreexpresión de cada enzima.



**Figura 10. Muestras antes y después de la inducción de cada enzima.** SDS-PAGE al 12% que muestra la sobreexpresión de cada enzima. AD (antes de inducir), DI (después de inducir), enzimas WT, A133G, 133V, H308S y W165F.

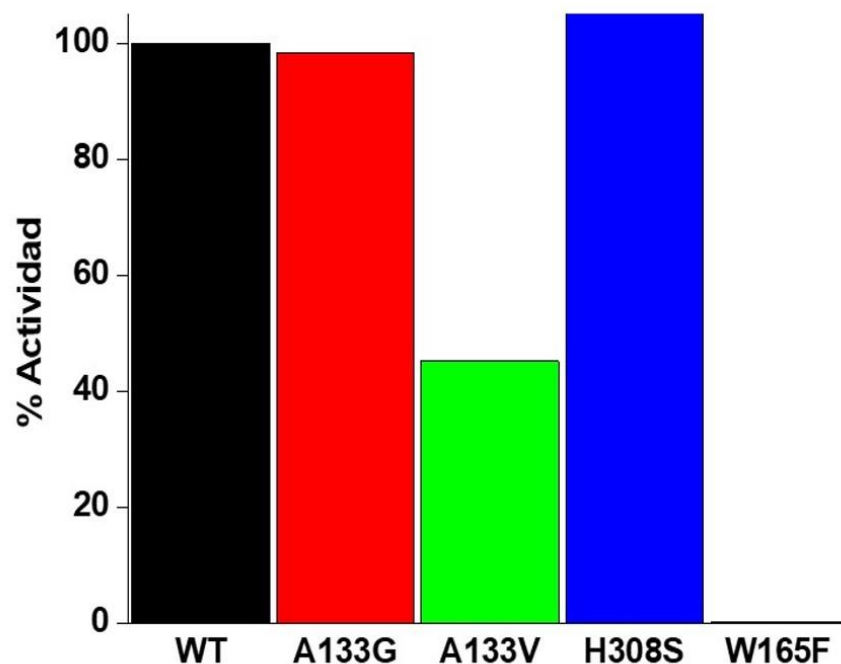
Para llevar a cabo la purificación de las enzimas se recuperó la fracción soluble y se pasaron a través de una columna de afinidad a níquel (resina Protino Ni-TED), dado que las enzimas tienen una etiqueta de histidinas aseguramos que quedan unidas a la resina; una vez pasado el sobrenadante se realizaron los lavados previos a la elusión de la enzima: Primer lavado con solución amortiguadora 1 (lisis/ lavados,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 5 mM, pH 7.5), segundo lavado con solución amortiguadora 2 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 15 mM, pH 7.5) y finalmente el lavado de elusión con el amortiguador 3 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  35 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 100 mM, pH 7.5), obteniendo aproximadamente 25 fracciones de 4 mL con la enzima pura (Figura 11).



**Figura 11. Purificación de las enzimas.** a) SDS-PAGE al 12% que muestra las fracciones obtenidas en cada paso de purificación de la enzima mutada H308S como representación de la purificación del resto de las enzimas. Extracto total (1); Sobrenadante (2); Solución de lavados (3); Lavado con solución amortiguadora, imidazol [5 mM] (4); Lavado con solución amortiguadora, imidazol [15 mM] (5); Elusión de la proteína imidazol, [100 mM] (6); b) SDS-PAGE al 12%, en cada carril se muestran las enzimas purificadas: enzima silvestre (WT), A133G, A133V, H308S y W165F.

### ***Pruebas de actividad enzimática para cianuro***

Una vez purificadas las enzimas, estas fueron sometidas a pruebas de actividad con el sustrato tipo (CN) para determinar si durante la purificación no se vio afectada su actividad y para tener una aproximación del porcentaje de actividad respecto a la enzima silvestre, tomada como el 100% (Figura 12).



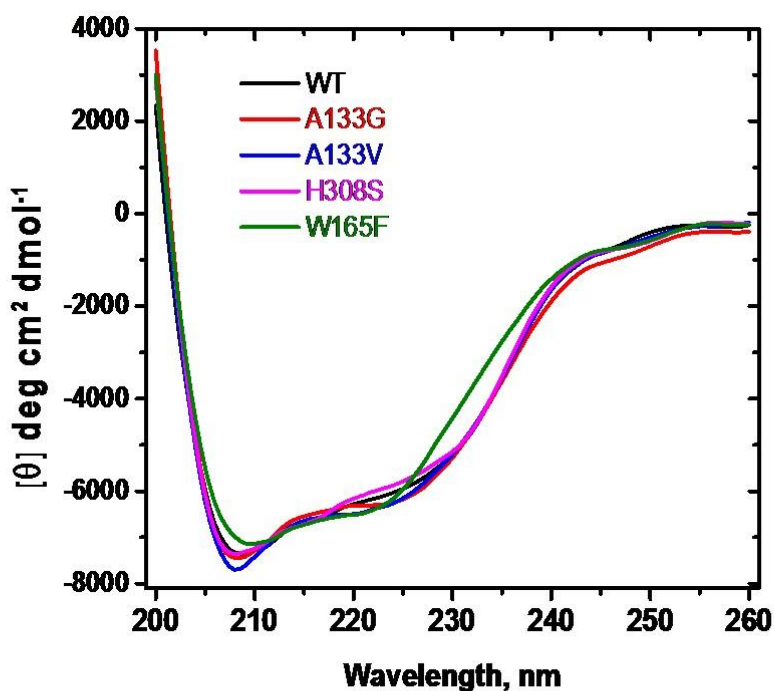
**Figura 12. Determinación de la actividad enzimática para CN.** Se determino la actividad para CN de la enzima silvestre y las enzimas mutadas en una mezcla de reacción de K-fosfatos 50 mM-NaCl 300 mM, pH 7.5, 10 µg/mL de encima y cianuro 2.5 mM. El cianuro residual se determinó mediante la absorción del complejo de ácido pícrico a 520 mM.

Podemos notar que las mutantes H308S y A133G presentan actividades catalíticas similares a la enzima silvestre. La mutante A133V presenta una actividad considerablemente menor en relación a la enzima silvestre, con una disminución de aproximadamente el 60%. Finalmente tenemos a la mutante W165F que no presenta actividad para cianuro. Es importante mencionar que se realizaron varios ensayos de actividad con la mutante W165F, se aumentó la concentración de proteína hasta alcanzar concentraciones de 100 µg/mL, se probaron diferentes concentraciones de cianuro y se alargaron los tiempos de incubación hasta por más de 24 horas, y en ninguna de estas pruebas se obtuvo actividad para cianuro.

### ***Dicroísmo Circular (CD)***

Para asegurarnos que la nula actividad de W165F no se debía a un plegamiento incorrecto o pérdida de estructura provocada por las mutaciones procedimos a realizar pruebas de Dicroísmo Circular. Esta técnica permite llevar a cabo estudios estructurales de las proteínas en solución y nos brinda información sobre cambios estructurales esenciales para su función biológica bajo el siguiente fundamento: un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos

componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda; si los componentes circularmente polarizados son absorbidos en diferentes grados por la solución de una muestra, la luz que pasa a través de la misma estará polarizada elípticamente y se dice que la muestra presenta dicroísmo circular (DC), magnitud expresada en unidades de elipticidad molar ( $\theta$ ). Los espectros de dicroísmo circular se obtienen en las regiones del ultravioleta cercano (250-350 nm) y del ultravioleta lejano (170-250 nm) de la radiación electromagnética. Para este análisis nos interesa el espectro en la región del UV lejano, ya que su aportación se debe a la presencia de enlaces amida que unen los residuos de aminoácidos entre sí, es decir el arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo tanto las señales del dicroísmo circular se pueden interpretar en términos de aportación de estructura secundaria presentes o porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación, ya sea hélices  $\alpha$ , hojas  $\beta$ , giros y estructura desordenada. En la Figura 13 se muestran los espectros de dicroísmo circular de la enzima silvestre y las enzimas mutadas.



**Figura 13. Dicroísmo circular de la enzima silvestre y las enzimas mutadas.** Espectros de dicroísmo circular (CD) en el UV lejano (170-250 nm). Cada espectro representa el promedio de 5 barridos consecutivos.



De acuerdo a los espectros de CD de la figura anterior constatamos que el plegamiento de las todas las enzimas mutadas es similar al de la enzima silvestre. Se observan dos mínimos, a 208 nm y a 222 nm característicos de la contribución de estructura hélice  $\alpha$ ; la intensidad de la banda a 208 nm es mayor con respecto a la banda en 222 nm, lo que significa que la contribución entre estructura de hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  es la misma, característico de proteínas con plegamiento  $\alpha+\beta$ . Como se mencionó, el objetivo de realizar este ensayo fue comprobar que la inactivación de la mutante W165F no se debía a un plegamiento incorrecto o pérdida de estructura que afectara al sitio activo y por tanto la actividad de la proteína, observando al espectro correspondiente a esta mutante (espectro en color verde) podemos asegurar que la estructura secundaria no se ve afectada por la mutación ya que el espectro aunque de menor intensidad, mantiene el mismo patrón de la enzima silvestre, por lo tanto la falta de actividad para cianuro de esta mutante no es causada por un mal plegamiento de la enzima.

En la Tabla 2 se muestra el contenido de estructura secundaria estimado a partir de la deconvolución de los espectros de CD con el programa CD Pro (Sreerama and Woody, 2000). Podemos observar que el aporte de estructuras  $\alpha$  y  $\beta$  en todas las enzimas es la misma, aumentando ligeramente la estructura desordenada en la mutante W165F.

**Tabla 2. Elementos de estructura secundaria.** Datos obtenidos a partir de la deconvolución de los espectros de CD utilizando el paquete CD Pro. Se hizo un promedio de los tres resultados (CONTINLL, CDSSTR Y SELCOM3) que arroja el programa.

Enzima	Hélice	Beta	*Otras
WT	0.230±0.008	0.287±0.022	0.469±0.001
A133G	0.278±0.034	0.264±0.024	0.452±0
A133V	0.246±0.016	0.270±0.034	0.476±0
H308S	0.234±0.012	0.286±0.031	0.227±0.012
W165F	0.218±0.011	0.275±0.011	0.247±0.005

\*Giros y Estructura desordenada

### **Dispersión dinámica de luz (DLS)**

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica espectroscópica de correlación de fotones empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión (Foord *et al.*, 1970), o macromoléculas en solución como proteínas. La luz láser alcanza muchas partículas que están en suspensión, se dispersa en todas direcciones, la obtención de una intensidad de dispersión determinada es provocada por la interferencia de los haces de luz dispersados por distintas partículas. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí. La velocidad de las partículas se verá afectada por su tamaño de la partícula, siendo las partículas más pequeñas las que se muevan más rápidamente, aumentando también la variación de la intensidad de dispersión; por el contrario las partículas grandes serán partículas más lentas y su variación de intensidad de dispersión será también más lenta.

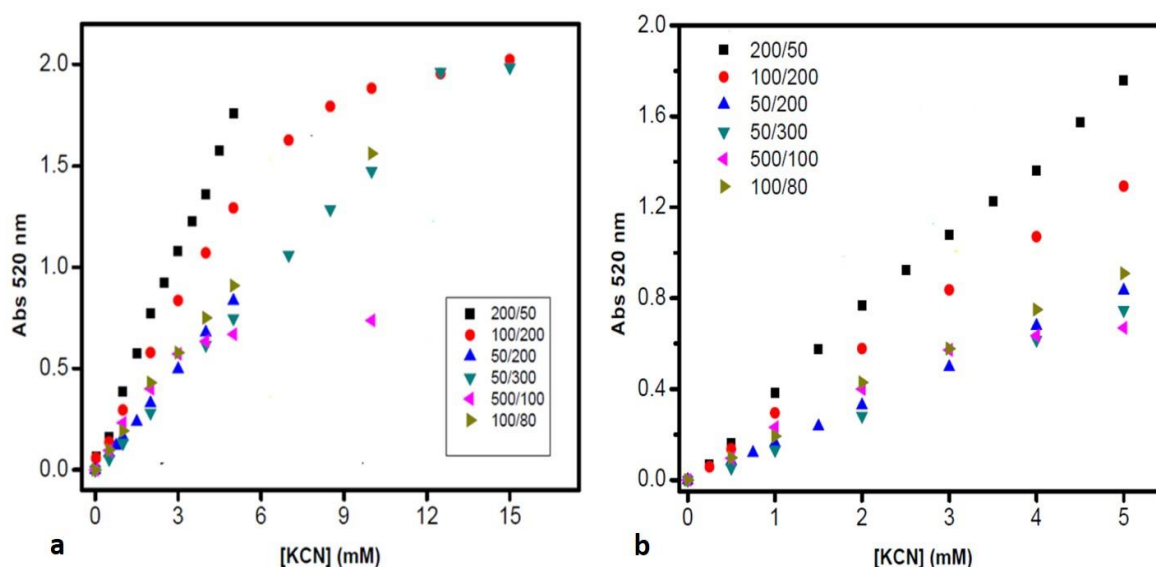
Este ensayo se realizó con el propósito de mostrar el radio promedio de las enzimas purificadas. En la Tabla 3 se muestran los radios hidrodinámicos, los porcentajes de polidispersidad y de masa de las muestras analizadas; un porcentaje de polidispersidad de <20% indica que las poblaciones son bastante homogéneas.

**Tabla 3. Dispersión Dinámica de Luz (DLS).** DLS de la enzima silvestre y las enzimas mutadas. En nm se muestran el Radio hidrodinámico ( $R_h$ ) y el porcentaje de de polidispersidad (%Pd). La concentración de todas las enzimas se ajusto a 100  $\mu\text{g/ml}$ ; los resultados son el promedio de 10 mediciones a 25 °C.

Enzima	$R_h$ (nm)	Pd (%)	Intensidad (%)	Masa (%)
WT	10.3±1.7	12.7	20.1	100
A133G	9.4±1.1	20	86	99.7
A133V	12.3±1.3	7.2	7.6	90.3
H308S	10.7±1.3	14.3	100	99.3

### Curva patrón de KCN

La elaboración de un protocolo que se empleó para determinar la actividad de la enzima silvestre y las mutantes comenzó con la construcción de una curva patrón que mostrara la sensibilidad del método, su estabilidad en el tiempo y la proporción entre la reacción y la mezcla de ácido pícrico-bicarbonato de sodio. En la Figura 14a se muestran las distintas curvas construidas y las proporciones empleadas entre la mezcla de ácido pícrico y la reacción final respectivamente, podemos observar que a concentraciones por arriba de 5 mM las curvas pierden linealidad, con algunos puntos dispersos, ahora bien, si nosotros tomamos los datos hasta la concentración de 5 mM vemos que todas las proporciones son lineales (Figura 14b). Como podemos ver, en esta proporción (la máxima concentración de cianuro en mM) presenta una absorbancia por debajo de 0.6. Como discutiremos más adelante este método presenta problemas de sensibilidad con concentraciones que superen un valor de absorbancia de 1.0 (Jandhyala et al., 2003).

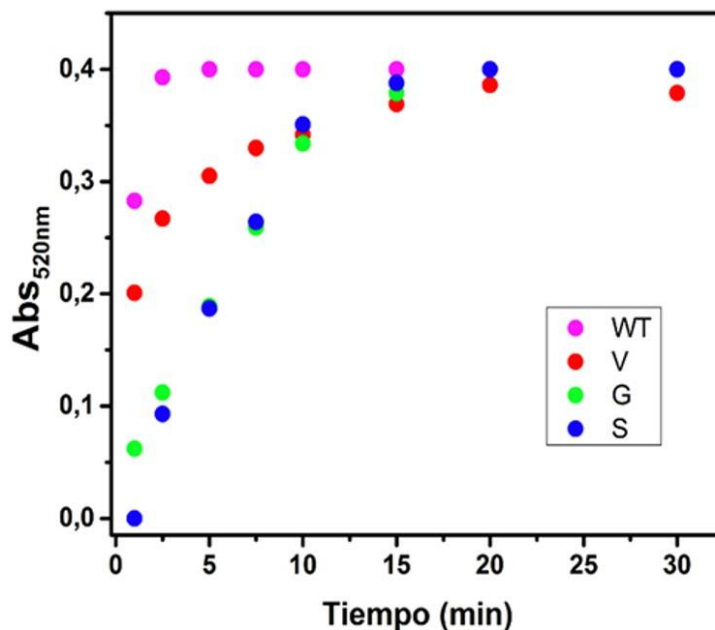


**Figura 14. Construcción de curvas patrón para KCN.** a) Curvas del ensayo colorimétrico de detección de cianuro con ácido pícrico. Ensayo realizado en un tiempo de incubación de 30 min a 30°C, abs. 520 nm; b) Curvas ajustadas a 5 mM de cianuro. En ambas gráficas, se muestran con símbolos los puntos de cada alícuota tomada en un tiempo definido, los símbolos indican las proporciones en microlitros utilizadas entre la reacción y la mezcla de ácido pícrico, respectivamente.



### Velocidades iniciales

Para obtener una aproximación de las velocidades iniciales para cada enzima se realizó un ensayo con el método de ácido pícrico. Para detectar que en la actividad catalítica de una enzima estamos en tiempos de velocidades iniciales, es necesario que dicha enzima consuma aproximadamente el 10% de la concentración total de sustrato. En la Figura 15 se muestran las curvas de las velocidades iniciales para cada enzima.



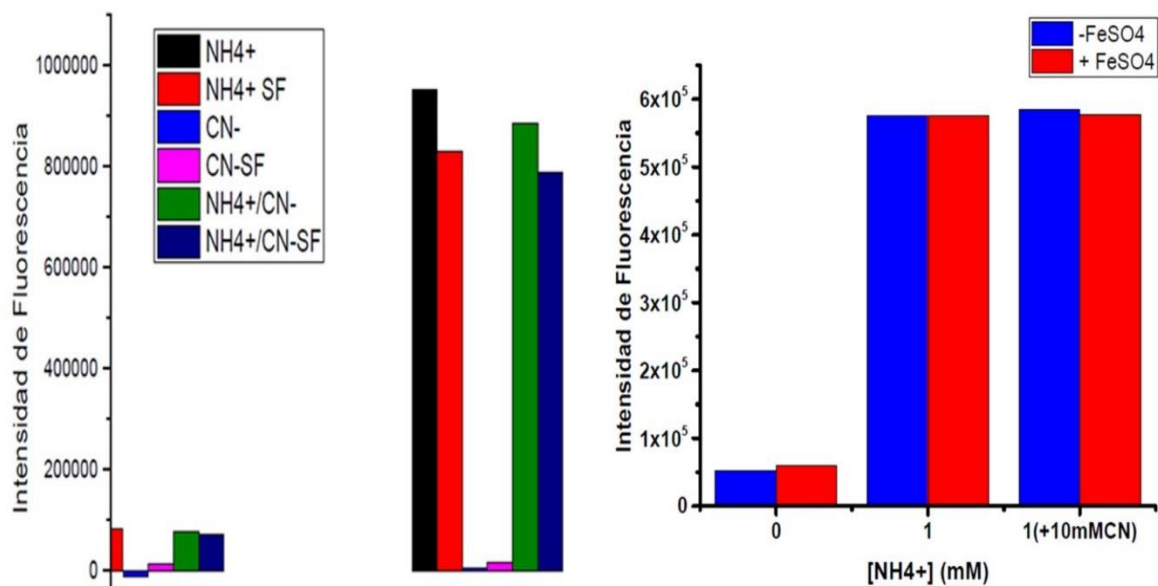
**Figura 15. Curvas de velocidades iniciales.** Determinación de las velocidades iniciales para la enzima silvestre (WT) y las enzimas mutadas: A133V (V), A133G (G) e H308S (S). Ensayos realizados en 30 minutos de incubación a 30 °C. Lecturas realizadas en espectrofotómetro a Abs 520 nm.

### Método fluorimétrico (OPA-NAC)

Para entender la importancia de la utilización de este método, es importante recordar que uno de los productos de la hidrólisis de cianuro de la enzima CynD es el amonio, y este método justamente se emplea para detectar amonio en solución por medio de la formación de complejo estable entre el o-ftaldialdehído-N-acetilcisteína y el  $\text{NH}_4^+$  (OPA-NAC-amonio) liberado en la reacción enzimática.

### Interferencia del cianuro con el método fluorimétrico

Para demostrar que la presencia de cianuro no causaba interferencia con la detección de amonio durante las mediciones, se realizaron distintos controles utilizando sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) como agente precipitante. En la Figura 16a se muestran las reacciones realizadas: amonio; amonio + SF; CN; CN + SF; amonio + CN; amonio + CN + SF, podemos ver que la diferencia entre las reacciones con agente precipitante y sin agente precipitante no muestran diferencias, por lo que podemos asegurar que la presencia de cianuro no interfiere en este método de detección, por otro lado vemos que las reacciones que no presentan amonio (CN y CN-SF) no dan señal de fluorescencia ya que no se forma el complejo OPA-NAC- $\text{NH}_4$  fluorescente. En la Figura 16b podemos observar la intensidad de fluorescencia de las reacciones  $\text{NH}_4^+ + \text{FeSO}_4$  y  $\text{NH}_4^+ + \text{FeSO}_4 + \text{CN}$  10 Mm, podemos ver que igualmente que en la gráfica 6, no hay diferencia entre la reacción con agente precipitante y sin este, lo que nos indica que efectivamente el cianuro no causa interferencia alguna con la fluorescencia.



**Figura 16. Interferencia del cianuro con el método fluorimétrico. a)** Intensidad de fluorescencia dada por las reacciones realizadas usando como agente precipitante sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ). **b)** Intensidad de fluorescencia dada por las mezclas  $\text{NH}_4^+ + \text{FeSO}_4$  y  $\text{NH}_4^+ + \text{FeSO}_4 + \text{CN}$  (10mM).

### Parámetros cinéticos: Enzima silvestre

La actividad enzimática de la enzima CynD silvestre se determinó por dos métodos distintos de detección, el método colorimétrico de ácido pícrico y el método fluorimétrico OPA-NAC. En la Figura 17a se muestra el ensayo colorimétrico ajustado a la ecuación Michaelis-Menten (MM), las constantes catalíticas obtenidas por medio del ensayo colorimétrico (ácido pícrico) son:  $V_{\text{máx}} = 6.2 \text{ mmol CN min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ,  $K_M = 2.5 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{CAT}} = 2.33\text{E}+0.5 \text{ min}^{-1}$ ; en la gráfica 17b vemos los resultados obtenidos por el método fluorimétrico ajustados a una ecuación MM, las constantes catalíticas obtenidas por este método son:  $V_{\text{máx}} = 7.4 \text{ mmol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ,  $K_M = 1.6 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{CAT}} = 2.78\text{E}+05 \text{ min}^{-1}$ . En ambos ensayos los parámetros cinéticos para la enzima silvestre son similares por lo que podemos asegurar que la capacidad de ambos métodos para detectar, por un lado cianuro no hidrolizado (método colorimétrico) y el amonio producido en la reacción (fluorimétrico) es la misma.

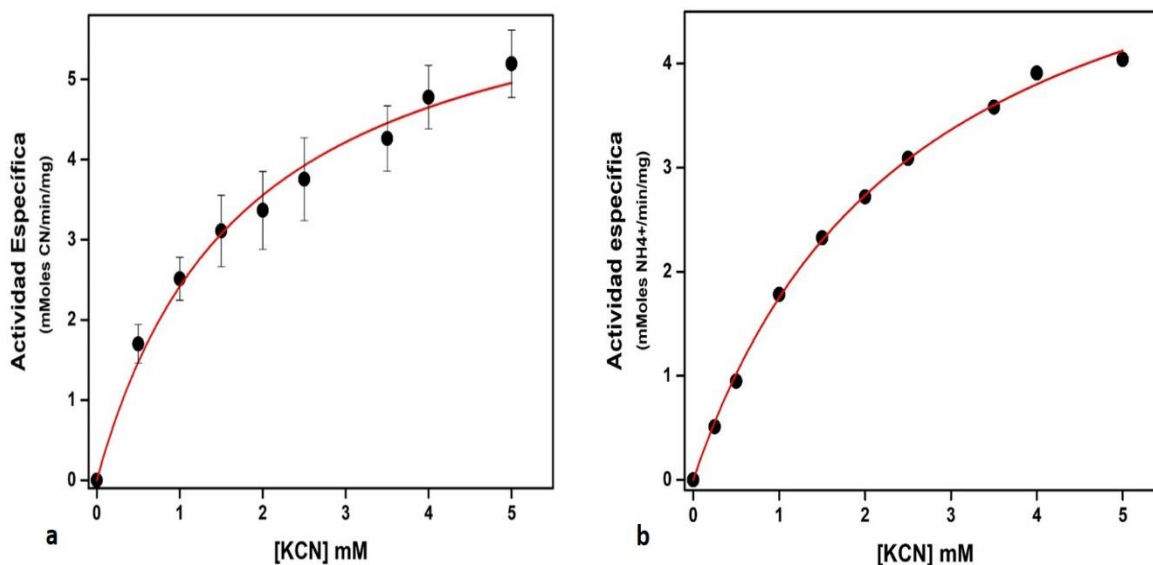
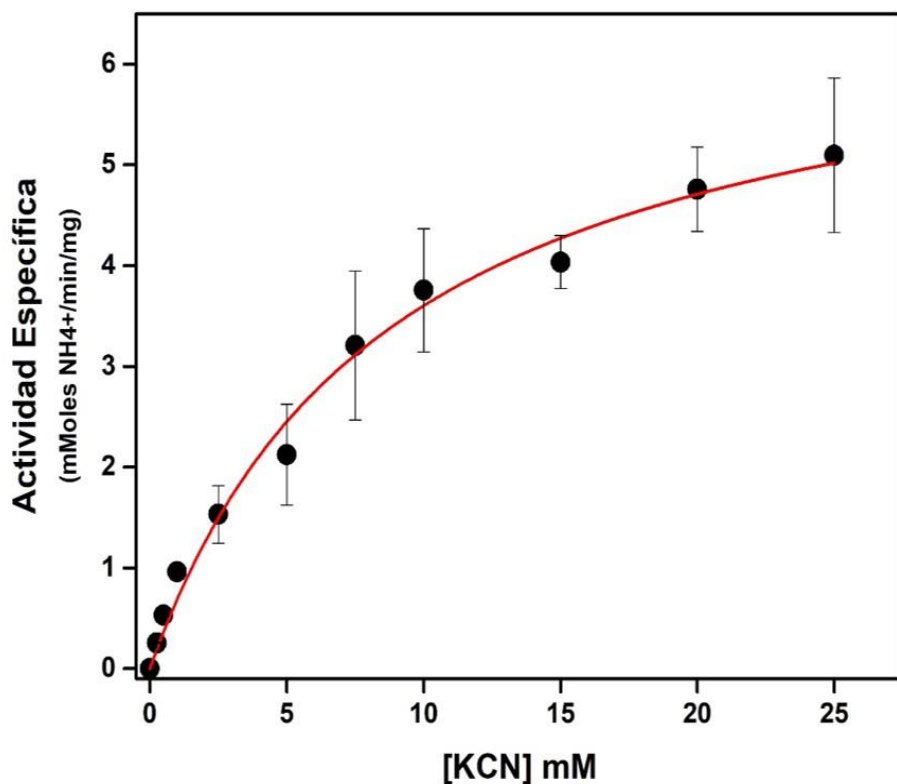


Figura 17. Parámetros cinéticos enzima silvestre. a) Resultados de la actividad enzimática de la enzima silvestre, por el método colorimétrico de ácido pícrico. Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado. b) Resultados de la actividad enzimática de la enzima silvestre por el método fluorimétrico.

### Parámetros cinéticos: Mutante A133G

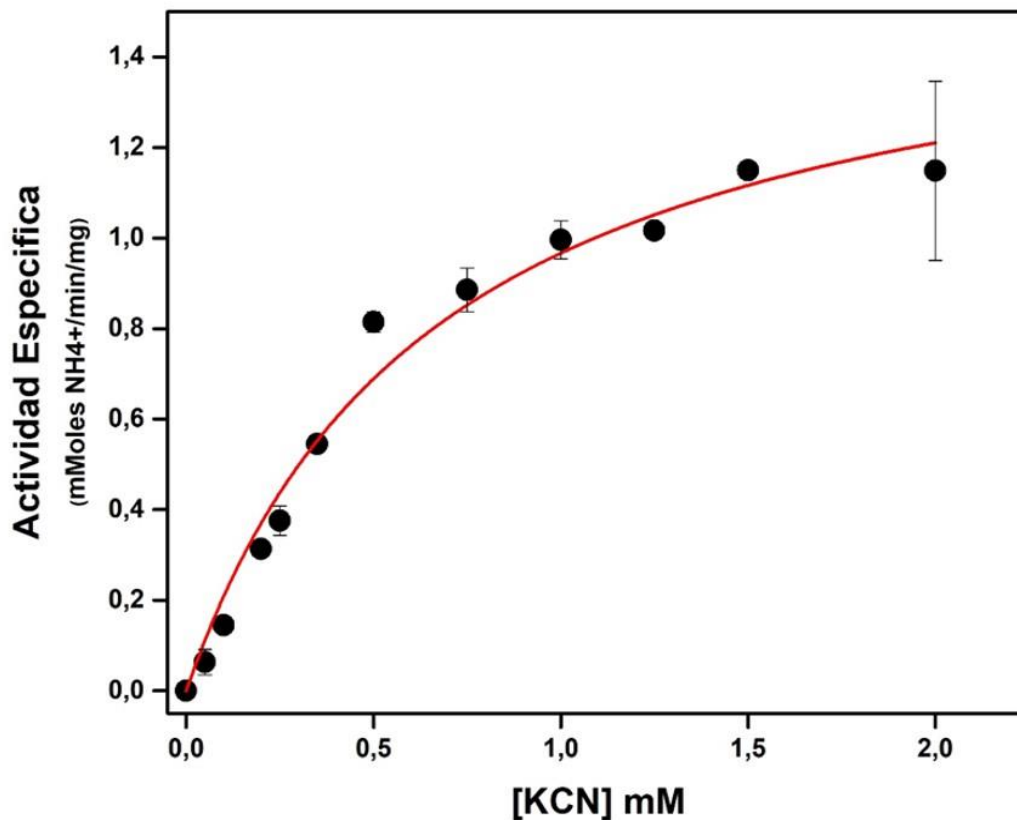
La actividad enzimática de esta mutante se determinó por el método fluorimétrico (OPA-NAC), alcanzando una concentración máxima de 25 mM de KCN. En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos ajustados a una ecuación Michaelis-Menden, las constantes catalíticas obtenidas por este método son:  $V_{\text{máx}} = 6.72 \text{ mmol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ,  $K_M = 8.9 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{CAT}} = 2.53\text{E}+05 \text{ min}^{-1}$ .



**Figura 18. Parámetros cinéticos mutante A133G.** Actividad enzimática para la mutante A133G determinada por el método fluorimétrico. Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado.

### Parámetros cinéticos: mutante A133V

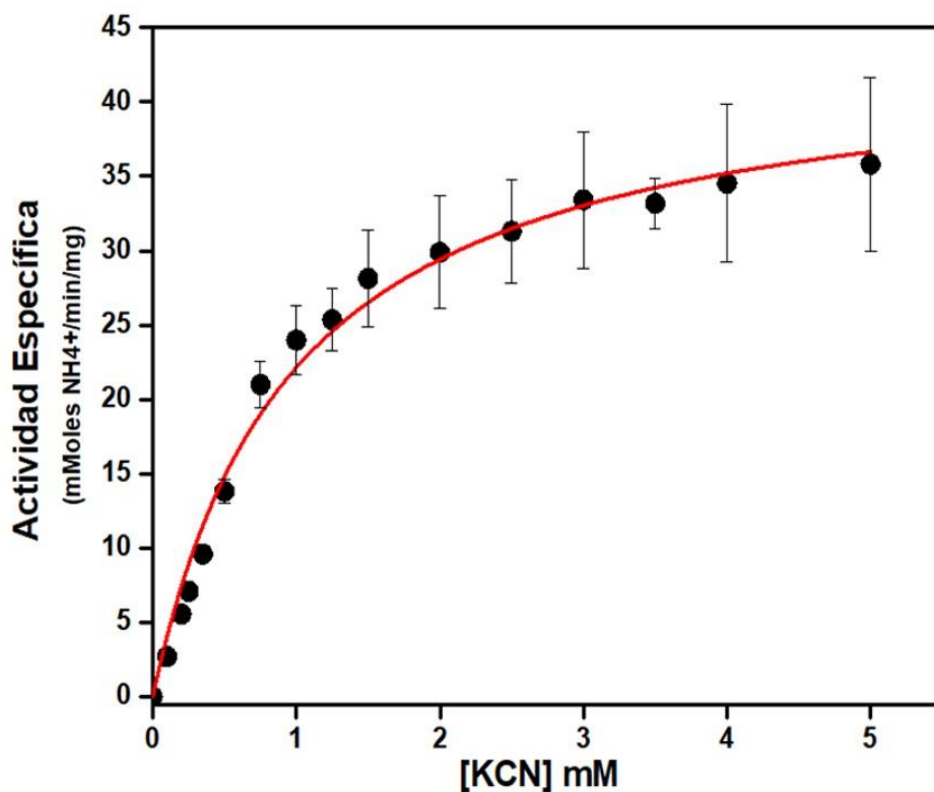
La actividad enzimática de la mutante A133V se realizó con el método fluorimétrico (OPA-NAC). En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos ajustados a una ecuación Michaelis-Menden, las constantes catalíticas obtenidas por este método son:  $V_{\text{máx}} = 1.6 \text{ mmol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ,  $K_M = 0.67 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{CAT}} = 6.02\text{E}+04 \text{ min}^{-1}$ .



**Gráfica 19. Parámetros cinéticos mutante A133V.** Actividad enzima de la mutante A133V determinada por el método fluorimétrico. Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado.

### Actividad enzimática: mutante H308S

LA actividad enzimática de la mutante H308S se realizó con el método fluorimétrico (OPA-NAC). En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos ajustados a una ecuación Michaelis-Menden, las constantes catalíticas obtenidas por este método son:  $V_{\text{máx}}= 43.81 \text{ mmol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ,  $K_M= 0.97 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{CAT}}= 1.65\text{E}+06 \text{ min}^{-1}$ .



**Gráfica 20. Actividad enzimática mutante H308S.** Actividad enzimática de la mutante H308S determinada por el método fluorimétrico. Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado.

En la Tabla 4 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima silvestre y las enzimas mutadas. Los datos presentados son el resultado del promedio de ensayos para cianuro realizados por triplicado.

**Tabla 4. Constantes catalíticas.** Parámetros cinéticos de las enzimas mutadas y enzima silvestre para cianuro.

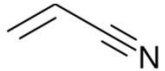


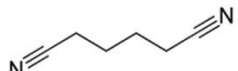
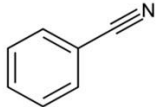
Enzima	Sustrato	$V_{\max}$ (mmolas $\text{NH}_4^+$ $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$k_{\text{CAT}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{CAT}} / K_M$
Silvestre	Cianuro	7,4	1,6	2,33E+05	1,74E+05
A133G	Cianuro	6,7	8,9	2,5E+05	2,84E+04
A133V	Cianuro	1,6	0,67	6,02E+05	8,98E+04
H308S	Cianuro	43,8	0,97	1,65E+06	1,70E+06

Los resultados muestran cambios en los parámetros cinéticos de las enzimas mutantes con respecto a la CynD silvestre. Las mutante A133G tiene un aumento en 5.5 veces el valor de la  $K_M$ , manteniendo una  $k_{\text{CAT}}$  similar a la enzima silvestre, en cambio la mutación por valina disminuye su  $V_{\max}$  4.5 veces y reduce a la mitad la  $K_M$ . El cambio más importante se observa en la mutante H308S, con un aumento considerable en la  $k_{\text{CAT}}$ , 7 veces respecto de la enzima silvestre y una disminución de la  $K_M$ , dando como resultado una eficiencia catalítica ( $k_{\text{CAT}} / K_M$ ) un orden de magnitud mayor.

### Actividad enzimática para nitrilos

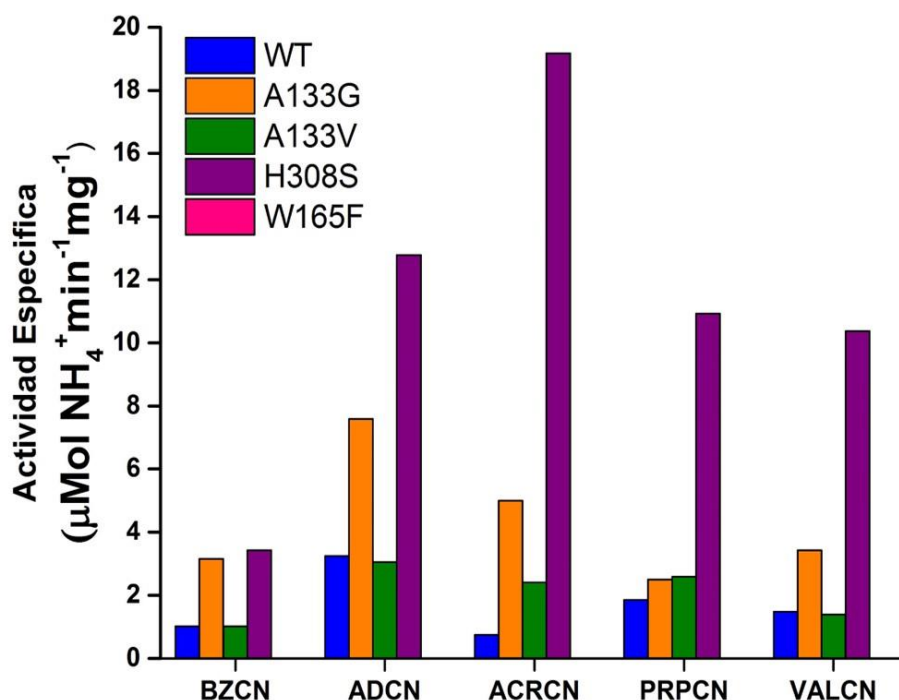
Para determinar si las mutaciones realizadas en las enzimas causaban algún efecto en la selectividad del sitio activo para sustratos distintos al cianuro, se probó la actividad relativa de cinco distintos sustratos: Benzonitrilo (BzCN), Adiponitrilo (AdCN), Acrilonitrilo (AcCN), Propionitrilo (PrCN) y Valeronitrilo (VaCN). En la tabla 5 se muestran las fórmulas de cada uno, el BzCN es un nitrilo aromático, los demás tienen cadenas alifáticas, el acrilonitrilo es el más pequeño y el adiponitrilo es además un dinitrilo.

**Tabla 5. Estructura de Nitrilos.** Fórmula y estructura de los nitrilos utilizados para los ensayos de actividad y cinética.

Nitrilo	Formula Molecular	Estructura
Acrilonitrilo	$C_3H_3N$	
Propionitrilo	$C_3H_5N$	
Valeronitrilo	$C_5H_9N$	
Adiponitrilo	$C_6H_8N_2$	
Benzonitrilo	$C_7H_5N$	



En la Figura 21 podemos observar que tanto la enzima silvestre como todas las mutantes presentan selectividad para todos los nitrilos probados; es importante resaltar tres cosas interesantes de este experimento: 1) respecto a la enzima silvestre, hasta el momento no se tenían reportes sobre la actividad enzimática de una CynD para otro sustrato diferente al cianuro (Thuku et al 2009); 2) la mutante H308S es la enzima que mayor actividad presenta para los cinco sustratos, en comparación con el resto de las enzimas y 3) la mutante W165F no presenta actividad para nitrilos; la mutación realizada impide a la enzima llevar a cabo catálisis, podría indicar que este aminoácido es importante para la permanencia de sustrato dentro del sitio activo en el momento de la hidrólisis química.



**Figura 21. Selectividad para nitrilos.** Actividad específica de la enzima CynD silvestre y las enzimas mutadas, para los nitrilos: benzonitrilo (BzCN), adiponitrilo (AdCN), acrilonitrilo (AcrCN), propionitrilo (PropCN) y valeronitrilo (ValCN). Cada ensayo se llevo acabo con 100  $\mu\text{g/mL}$  de enzima y una concentración de 100 mM de cada nitrilo. Tiempo de incubación 60 min, 30° C.

### Actividad enzimática para diferentes nitrilos

En las Figuras 22 a 25 se presentan los resultados obtenidos de las cinéticas de la CynD silvestre y las mutantes para los nitrilos alifáticos adiponitrilo, acrilonitrilo y propionitrilo. Los datos mostrados son el promedio de ensayos realizados por triplicado. Los parámetros cinéticos se determinaron por el ajuste de los datos a una ecuación de Michaelis-Menten y se muestran en la Tabla 6.

Actividad enzimática: Enzima silvestre.

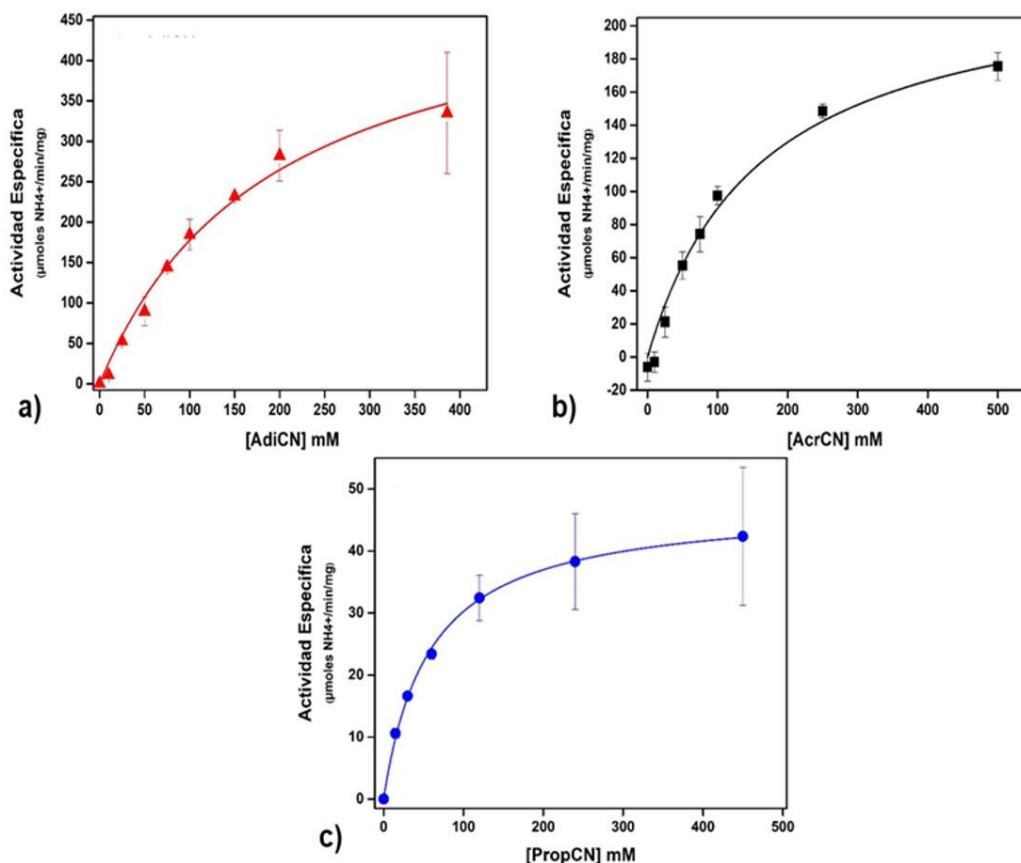


Figura 22. Actividad enzimática de la enzima silvestre (WT) para nitrilos alifáticos. Gráficos ajustados a una ecuación Michaelis-Menten, a) Adiponitrilo (AdiCN), b) Acrilonitrilo (AcrCN) y c) Propionitrilo (PropCN). Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado.

Actividad enzimática: Mutante A133G.

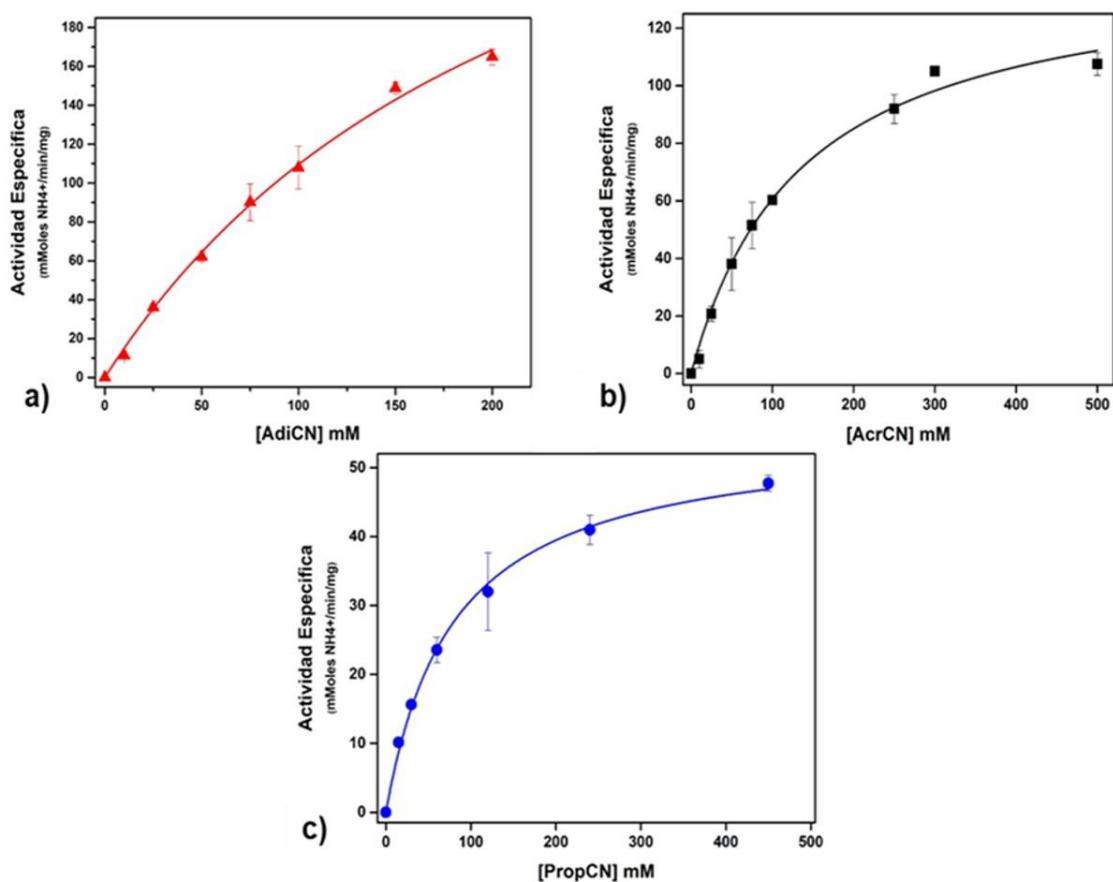


Figura 23. Actividad enzimática de la enzima mutada A133G para nitrilos alifáticos. Gráficos ajustados a una ecuación Michaelis-Menten, a) Adiponitrilo (AdiCN), b) Acrilonitrilo (AcrCN) y c) Propionitrilo (PropCN). Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado.

Actividad enzimática: Mutante A133V.

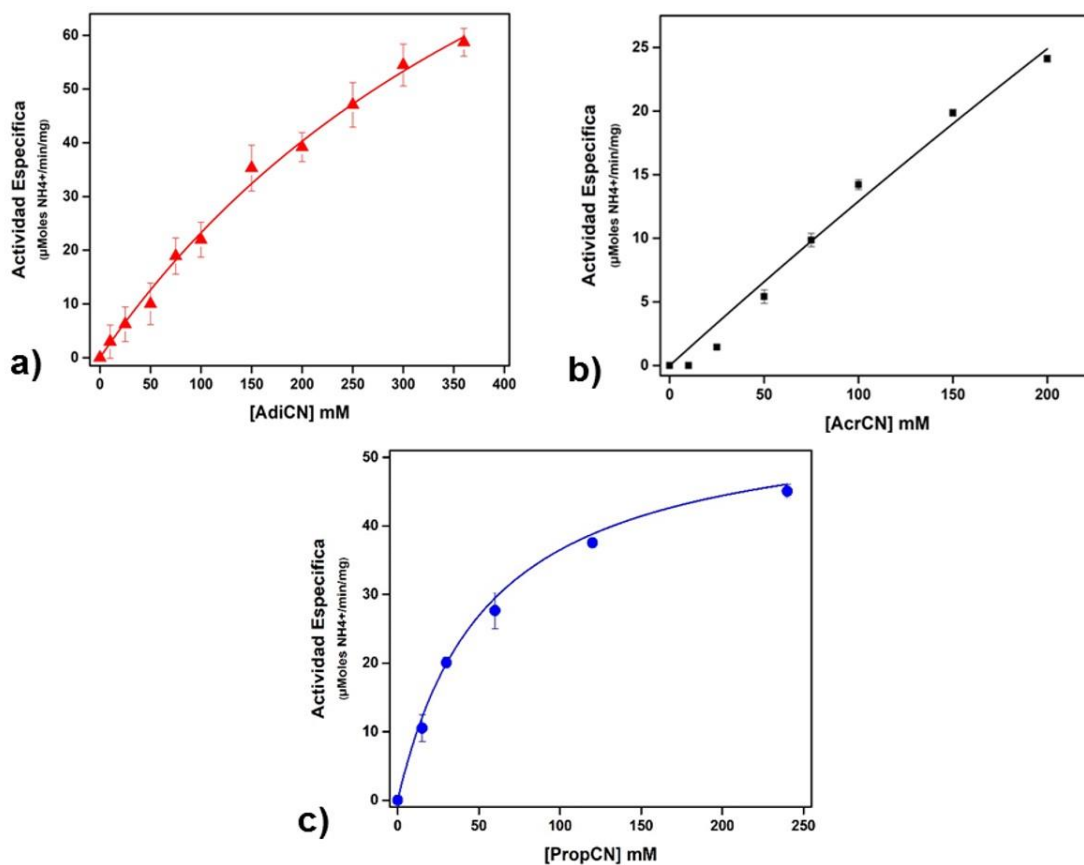


Figura 24. Actividad enzimática de la enzima mutada A133V para nitrilos alifáticos. Gráficos ajustados a una ecuación Michaelis-Menten, **a)** Adiponitrilo (AdiCN), **b)** Acrilonitrilo (AcrCN) y **c)** Propionitrilo (PropCN). Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado

Actividad enzimática: Mutante H308S.

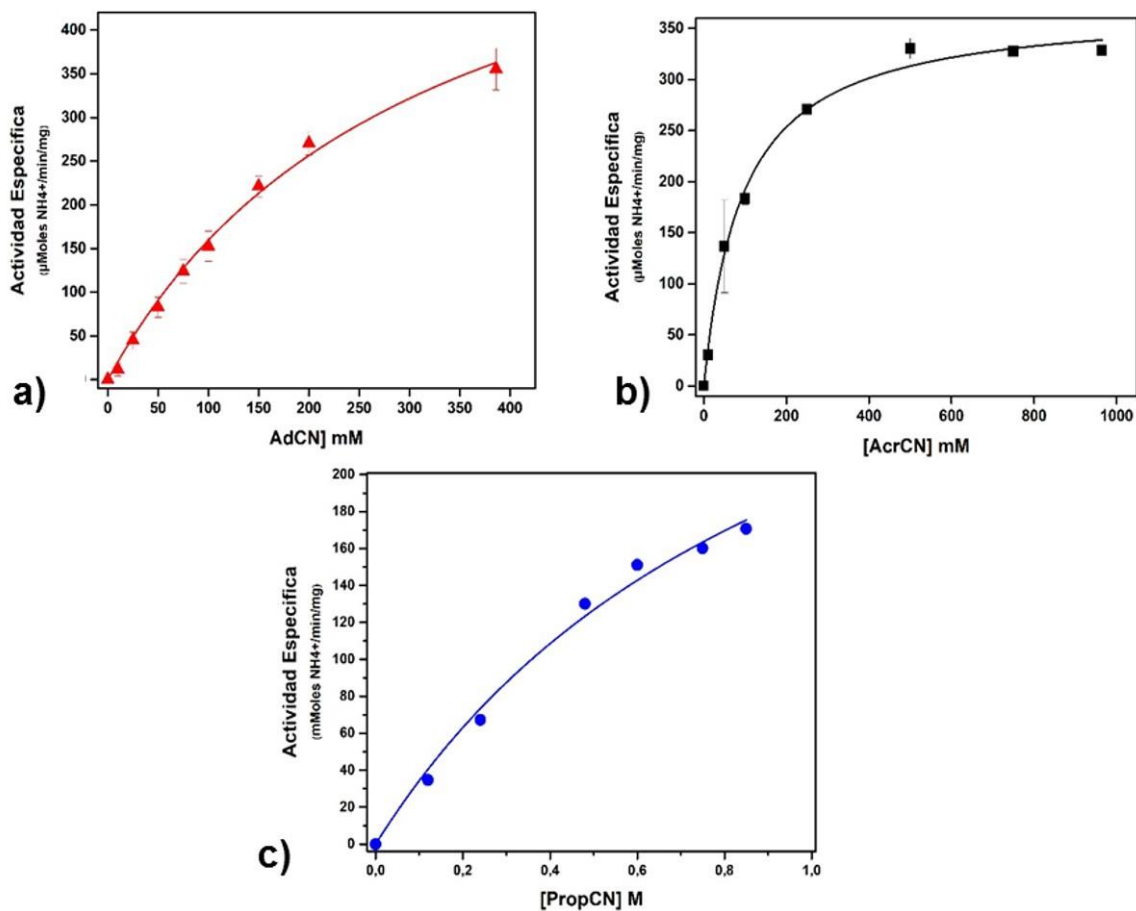


Figura 25. Actividad enzimática de la enzima mutada H308S para nitrilos alifáticos. Gráficos ajustados a una ecuación Michaelis-Menten, **a)** Adiponitrilo (AdiCN), **b)** Acrilonitrilo (AcrCN) y **c)** Propionitrilo (PropCN). Se muestra la desviación estándar del ensayo realizado por triplicado

**Tabla 6. Actividad enzimática para diferentes nitrilos.** Parámetros cinéticos de las enzimas mutadas y enzima silvestre para nitrilos alifáticos. Se incluye la eficiencia catalítica para CN. (ND. No Determinado).

Enzima	Sustrato	$V_{\max}$ (mmolas $\text{NH}_4^+$ $\text{min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$k_{\text{CAT}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{CAT}} / K_M$	CN
						$k_{\text{CAT}} / K_M$
WT	AdiCN	0,513	186	1,93E+04	1,04E+02	1,74E+05
	AcrCN	0,185	104	6,95E+03	6,69E+01	
	PropCN	0,047	57,2	1,77E+03	3,09E+01	
A133G	AdiCN	0,365	233	1,37E+04	5,89E+01	2,84E+04
	AcrCN	0,142	135	5,34E+03	3,95E+01	
	PropCN	0,055	80	2,07E+03	2,58E+01	
A133V	AdiCN	0,15	548	5,64E+03	1,03E+01	8,98E+04
	AcrCN	ND	ND	ND	ND	
	PropCN	0,057	57	2,14E+03	3,76E+01	
H308S	AdiCN	0,655	310	2,46E+04	7,94E+01	1,70E+06
	AcrCN	0,371	93	1,39E+04	1,50E+02	
	PropCN	0,388	1000	1,46E+04	1,46E+01	

Tanto la CynD silvestre como las mutantes presentan una afinidad muy baja por los nitrilos, los valores de  $K_M$  son  $\geq 100$  veces mayores a los obtenidos para cianuro y velocidades casi dos órdenes de magnitud menores con respecto a los valores de  $k_{\text{CAT}}$  para cianuro. La enzima silvestre y la mutante A133G muestran una menor afinidad por el AdiCN, y una mayor afinidad por el PropCN. Es importante hacer notar que la eficiencia catalítica de la mutante H308S para el acrilonitrilo, es mayor al resto de las enzimas. Para el adiponitrilo el valor es muy cercano al de la CynD silvestre. Sin embargo, para el PrpCN la enzima H308S muestra muy poca afinidad, calculando un valor de  $K_M$  cercano a 1M. Por otro lado, la mutante A133V muestra muy baja afinidad por el AdiCN y el AcrCN; de hecho para éste último nitrilo, las concentraciones usadas no alcanzaron a saturar la enzima por lo que no se presentan parámetros cinéticos.

## DISCUSIÓN

Actualmente solo se conocen las estructuras cristalográficas de algunos miembros de la superfamilia Nitrilasa, como las carbamil-D-amino amidohidrolasa de *Agrobacterium* sp. (PDB 1ERZ, la *N*- Nakai *et al.*, 2000) y la proteína NitFhit de *Caenorhabditis elegans* (PDB 1EMS. Pace y Brener 2001), por lo cual el estudio de la estructura de la proteína CynD (y de muchas otras proteínas) se ve limitado al no contar con estructura cristalográfica resuelta; sin embargo, se emplean metodologías para generar modelos que ayuden en la determinación de dichas estructuras. Uno de los métodos empleados para el estudio de la estructura de proteínas es el modelado por medio de homología, en nuestro caso esta metodología nos proporcionó información valiosa acerca de la posición y el movimiento y/o efecto (en cuanto a interacciones con otros aminoácidos) de las mutaciones propuestas. Los resultados de estas simulaciones nos muestran que además de los residuos catalíticos, existen otros que cuando el CN se acerca al sitio activo se mueven de tal forma que parece que promueven la entrada del sustrato al sitio activo. Los residuos que muestran un cambio más grande en su posición antes y después de la hidrólisis del sustrato son: Alanina 133, Histidina 308 y Triptófano 165 (Figura 8).

La sobreexpresión y purificación de las enzimas se llevó acabo de la misma forma que el protocolo empleado para la enzima silvestre, reportado en el laboratorio (Granados 2009); en ningún caso hubo problema para su sobreexpresión y purificación, como vemos en la figura 11 todas las enzimas se purifican con alto rendimiento y pureza, por lo cual estamos seguros que no existen interferencia de impurezas para la realización de los experimentos de caracterización y cinética.

Para la realización de los experimentos de actividad enzimática, se probaron distintos amortiguadores: MOPS, fosfatos+NaCl y TRIS, de acuerdo a las pruebas realizadas, los amortiguadores en los que la enzima no mostraba disminución de actividad fueron: MOPS (experimentos de cinética con CN) y fosfatos+NaCl (experimentos de actividad y cinética con nitrilos); en el caso de los experimentos con CN, tanto el amortiguador de fosfatos como el de TRIS, causan interferencia con los métodos de detección empleados (ácido pícrico y OPA-NAC); la cual no se vio disminuida al emplear amortiguador MOPS.

Para el estudio de la actividad enzimática usando como sustrato cianuro, el método de detección más empleado es el del ácido pícrico que mide el cianuro presente (Fisher & Brown). Por este método se detecta el cianuro que no fue hidrolizado considerado como un método indirecto. Como se mostró en la sección de resultados dicho método presenta problemas de sensibilidad a concentraciones mayores de 5 mM de CN, cuando se obtienen absorbancias mayores de 1.0 (Jandhyala, et al. 2003). Para obtener los parámetros cinéticos tenemos que

manejar concentraciones del sustrato 5-10 veces el valor de la  $K_M$  por lo que fue necesario implementar el método fluorimétrico para determinar el amonio liberado y no el cianuro residual. En la literatura se reportan valores muy diferentes de las constantes cinéticas de la CynD. Estas diferencias dependen principalmente del método de detección usado en los ensayos como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros obtenidos para la enzima CynD.** Métodos de detección empleados para cianuro y amonio.

CynD	$K_M$ (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol/min <sup>-1</sup> /mg <sup>-1</sup> )	Método	Origen	Referencia
<i>B. pumilus</i> C1	2.5	0.088	Pítrico-CN	NR	Meyers 1993
<i>B. pumilus</i> C1	7.3	0.097	Pítrico-CN	His-tag R	Jandhyala 2005
<i>B. pumilus</i> GMA1	8.3	0.35	Pítrico-CN	His-tag R	Granados 2009
<i>B. pumilus</i> C1	3.6	8.2	Nessler-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	His-tag R	Crum, 2016
<i>B. pumilus</i> GMA1	1.6	7.4	OPA-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	His-tag R	Este trabajo

Como primer acercamiento, para conocer un poco sobre el comportamiento de las enzimas, se realizaron pruebas de actividad con el sustrato tipo, este ensayo se realizó en 30 minutos con una concentración de 2.5 mM de cianuro y 10 µg/mL, tomando como referencia del 100% de actividad la enzima silvestre, las mutantes A133V y A133G muestran además de inestabilidad una actividad catalítica un orden de magnitud por debajo de la enzima silvestre.

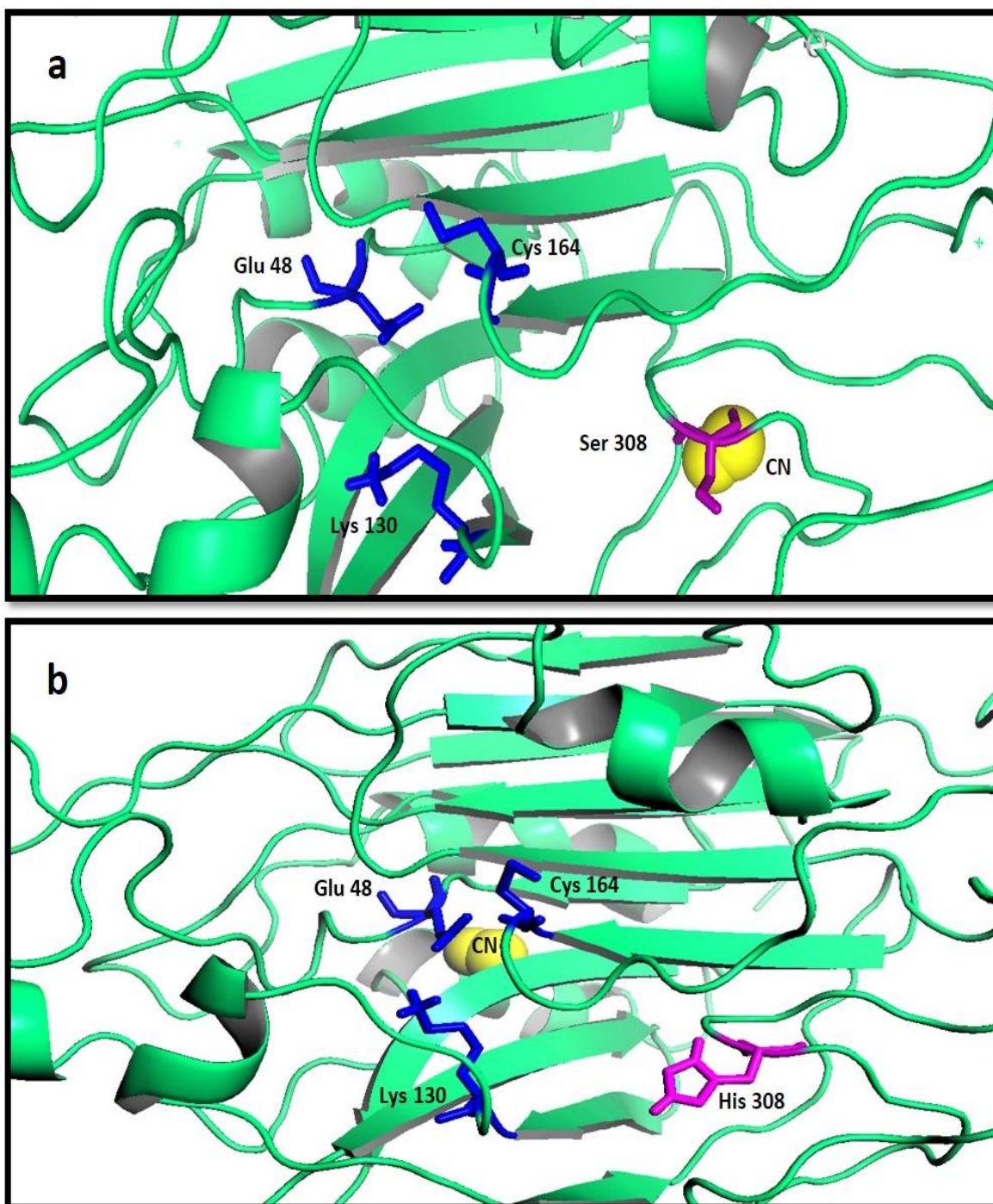
En las pruebas de actividad con nitrilos (Gráfica 21), observamos que la enzima con mayor actividad para nitrilos es la mutante H308S, estos datos posteriormente se corroboran con los ensayos de cinética, en donde se muestra una actividad enzimática un orden de magnitud mayor al resto de las enzimas, para los nitrilos (adiponitrilo, acrilonitrilo y propionitrilo).

La mutante W165F no muestra actividad ni para cianuro ni para los distintos nitrilos, esto puede ser ocasionado debido al impedimento estérico que el segundo anillo presenta en la estructura del triptófano genera; el triptófano funciona como una puerta de entrada al sitio activo, cuando el sustrato se encuentra en el medio este aminoácido “abre” la entrada al sitio, una vez que el sustrato se encuentra dentro del sitio el triptófano se mueve “cerrando” la entrada al sitio; el aminoácido fenilalanina solo presenta un anillo en su estructura, lo que genera que la entrada al sitio no quede totalmente cubierta y el cianuro escape del sitio antes de que se lleve a cabo la catálisis, en el caso de los nitrilos al ser más grandes en ninguno de los casos logre ingresar al sitio.



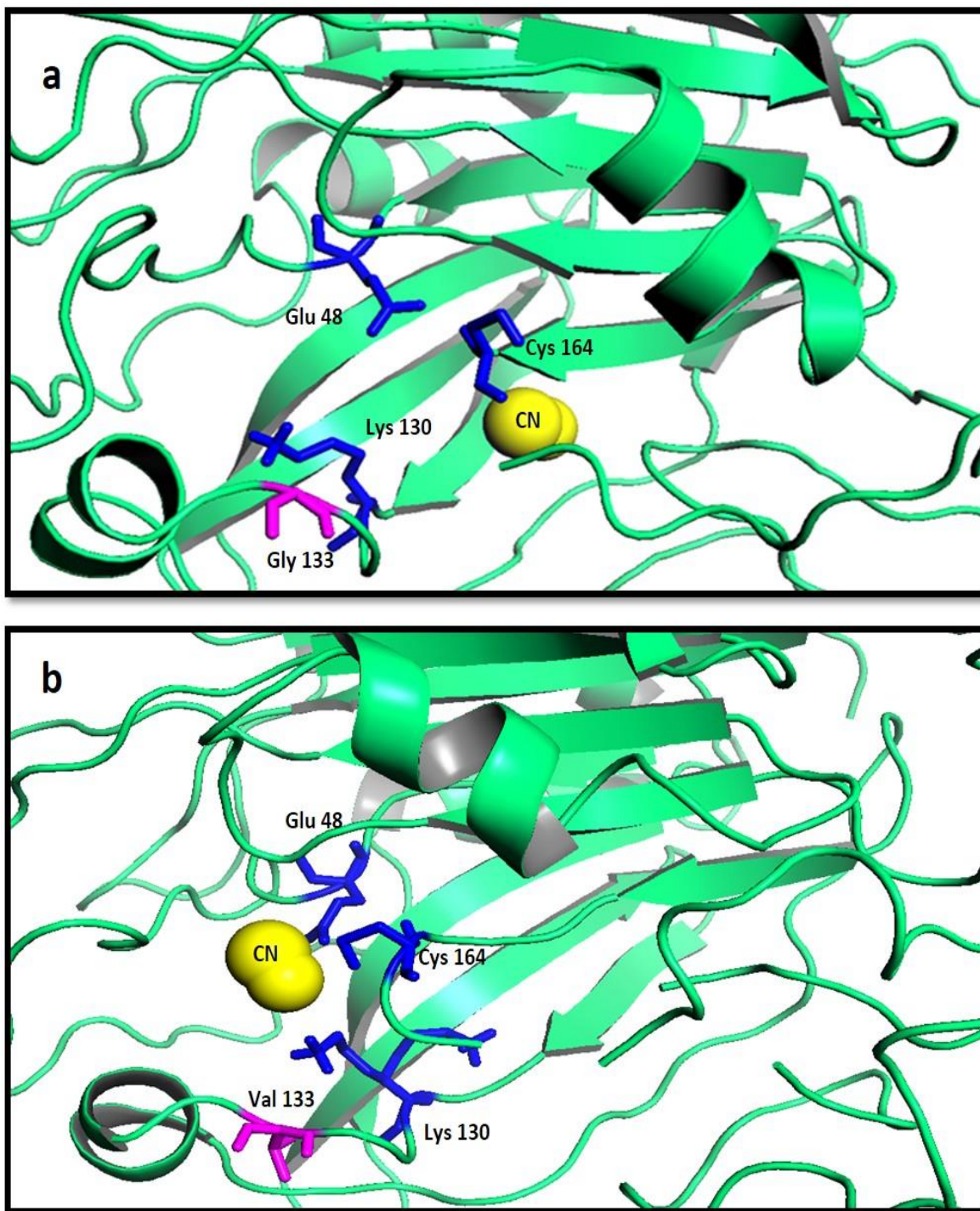
### *Influencia de las mutaciones en la actividad enzimática*

El caso de la serina 308 es interesante, en la figura 26a observamos que este residuo se encuentra alejado del sitio activo (entre 8 y 10 Å) y del resto de los residuos seleccionados, este residuo se encuentra en una cavidad de la enzima, la cual es ocupada por moléculas de sustrato cuando este se encuentra en el medio, la importancia de esta cavidad radica, al parecer en la entrada del cianuro y nitrilos al sitio activo. En la figura 26b podemos observar el residuo H308 presente en la enzima silvestre, este residuo, a diferencia de la serina presenta un anillo imidazol, este anillo provoca impedimentos estéricos en la cavidad, lo que impide la entrada del sustrato por este “túnel” al sitio activo. Usando como sustrato cianuro, el efecto de la apertura en la cavidad que genera esta mutante podemos medirla mediante la obtención de los parámetros cinéticos, al comparar la eficiencia de esta mutante contra la enzima silvestre vemos que esta cavidad permite que la eficiencia catalítica aumente un orden de magnitud (Tabla 4), en el caso de los nitrilos, a excepción del sustrato adiponitrilo, igualmente, la eficiencia aumenta un orden de magnitud (Tabla 6). La mutante H308S es catalíticamente más eficiente que la enzima silvestre y que el resto de las mutantes.



**Figura 26. Estructura de la mutante H308S.** En azul se muestran los residuos de la triada catalítica: Glu 48, Cys 164 y Lys 130. **a)** En color magenta el residuo correspondiente al residuo Ser 308 y la distancia de este respecto a la triada catalítica, en color amarillo se muestra una molécula de cianuro cercana al residuo Ser 308. **b)** En color magenta se muestra el residuo H308.

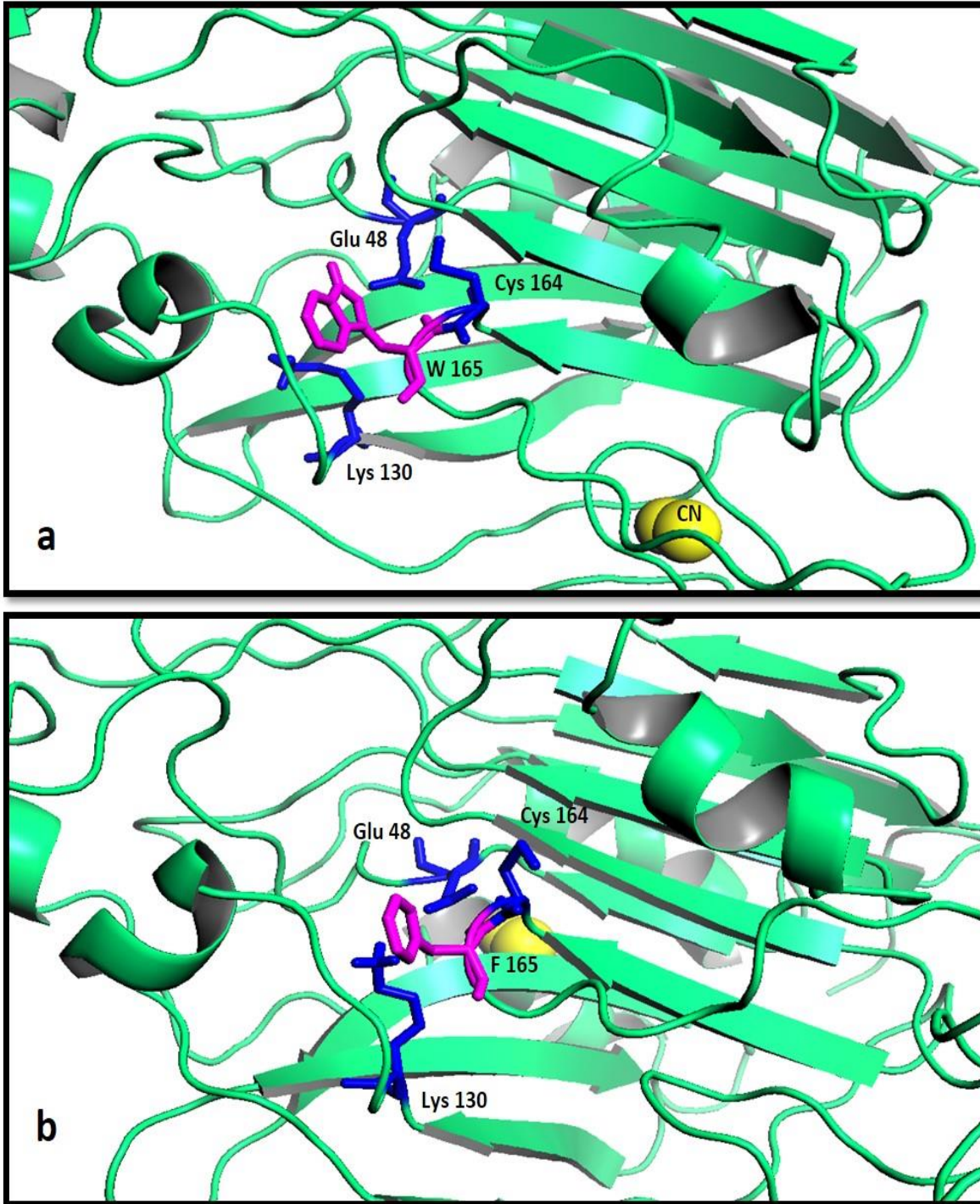
El residuo correspondiente a la alanina 133 cambia su posición cuando el CN se encuentra en el sitio activo sufriendo un ligero giro, regresando a su posición original cuando finaliza la hidrólisis química (Figura 8). Los cambios realizados de este residuo por glicina y valina, guardan las mismas características químicas (polaridad, cargas, nucleoficidad, etc) pero no del todo las características físicas, el tamaño de ambos respecto al residuo alanina cambia. Ambas mutantes presentan además de poca estabilidad (detectamos una considerable pérdida de la actividad 7 días después de ser purificadas) una eficiencia catalítica un orden de magnitud por debajo de la enzima silvestre tanto para cianuro como para nitrilos (Tablas 3 y 4), a excepción de la mutante A133G que presenta una eficiencia catalítica similar al de la mutante H308S y enzima silvestre para el sustrato adiponitrilo. Si pensamos en las cadenas laterales de los residuos alanina, glicina y valina en relación a su tamaño, vemos que la alanina se encuentra en la media de tamaño, la glicina es el residuo más pequeño y la valina el de mayor tamaño y si eso lo trasladamos al medio en donde se está llevando a cabo la entrada de los sustratos al sitio activo vemos que la glicina genera menores interacciones tanto con el sustrato como con los residuos a su alrededor, al observar el residuo de valina, vemos que pasa lo contrario, se generan mayores interacciones con el sustrato y con los residuos circundantes, esto lo vemos reflejado en la eficiencia catalítica, de ambas mutantes la que presenta una mayor eficiencia es la mutante A133G, el residuo glicina es muy pequeño, lo cual aparentemente “ayuda” o facilita que la apertura sea mayor y los sustratos escapen del sitio con mayor facilidad (Figura 27a); el caso de la mutante A133V su eficiencia es menor ya que aparentemente se genera mayor impedimento para que ingrese el sustrato a la cavidad del sitio activo (Figura 27b).



**Figura 27. Estructura de la mutante A133G y A133V.** En azul se muestran los residuos de la triada catalítica: Glu48, Cys 164 y Lys 130. **a)** En color magenta el residuo correspondiente al residuo Gly 133. **b)** En color magenta se muestra el residuo Val 133. En ambas imágenes se observa que este residuo se encuentra en la misma asa que al residuo Lys 130.

El efecto causado por el cambio de triptófano por fenilalanina se ve reflejado en la actividad con la pérdida total de esta en la enzima mutada. En los resultados de las simulaciones de acoplamiento se observa como el residuo W165 se mueve de tal forma que permite la entrada al sitio activo como una especie de compuerta. En la figura 8-a podemos observar que el residuo W165 se encuentra en una posición “abierta” respecto al sitio, en la figura 8-b observamos que su posición cambia a un estado “cerrado” una vez que el CN ha entrado al sitio activo. Los resultados de las pruebas de actividad sugieren que el doble anillo del aminoácido triptófano impide que una vez que el sustrato ingrese al sitio activo este escape, en la enzima mutante este efecto de compuerta no se ve reflejado, ya que el cambio por fenilalanina provoca un efecto en la cobertura que impide que el sustrato permanezca el tiempo necesario dentro del sitio para que se lleve a cabo la hidrólisis (Figura 28).





**Figura 28. Estructura de la enzima silvestre y la mutante W165F** En azul se muestran los residuos de la triada catalítica: Glu48, Cys 164 y Lys 130. **a)** En color magenta el residuo correspondiente al W 165. **b)** En color magenta se muestra el residuo F165. En ambas imágenes se muestran los residuos W165 y F165 en posición cerrada respectivamente.

## Nitrilos y actividad

Los resultados muestran que la CynD de *B. pumillus* GMA1 tiene muy poca pero significativa actividad de nitrilasa. De forma general podemos observar cierta especificidad a nitrilos, la enzima silvestre y las mutantes (excepto la mutante W165F) son capaces de reconocerlos y procesarlos debido a la naturaleza química que tienen en común, sin embargo es evidente la quimioselectividad que existe, esto lo vemos en la actividad relativa que cada enzima presenta para cada uno de los sustratos. Si comparamos estructuralmente a cada nitrilo (tabla 4), a excepción del benzonitrilo (que es un compuesto aromático) el resto son compuestos alifáticos, las actividades específicas son distintas para cada uno de ellos, lo que indica que las enzimas poseen afinidad que depende de la naturaleza química del radical presente, la estructura y el tamaño de cada uno de ellos que provoca impedimentos estéricos que aumentan o disminuyen la eficiencia catalítica. El propionitrilo es el nitrilo alifático más sencillo, de hecho para la enzima silvestre y las mutantes en la posición A133, se observan los valores más bajos de  $K_M$  pero también de  $V_{máx}$ . Cabe señalar que el propionitrilo es considerado un solvente aprótico, similar al acetónitrilo, y posiblemente esto afecte la actividad de las enzimas. El acrilonitrilo, es de tamaño similar al propionitrilo, tiene un grupo vinilo unido a un nitrilo, esto puede verse reflejado en el aumento de la  $K_M$ , sin embargo la velocidad aumenta al doble con respecto al propionitrilo. El adiponitrilo es el sustrato más grande pero además es un dinitrilo, su tamaño se refleja en los valores de  $K_M$ , menor afinidad; pero se obtienen las velocidades más altas. Esto posiblemente se debe a que una molécula de adiponitrilo libera los dos amonios de forma secuencial, antes de que el ácido monocarboxílico deje el sitio activo.

Las cianuro dihidratasa y las cianuro hidratasa catalizan la hidrólisis del cianuro con alta especificidad. La cianuro hidratasa del hongo *Fusarium lateritium* tiene una actividad 3000 veces mayor frente a KCN en comparación con benzonitrilo (Nolan et al., 2003), mientras que la cianuro hidratasa de *Aspergillus niger* K10 hidroliza la 2-cianopiridina y el fumaronitrilo con una actividad 500 veces menor con respecto al KCN (Rinágelová et al., 2014). Hasta ahora, son los únicos trabajos donde se muestra que una cianuro hidratasa puede hidrolizar nitrilos orgánicos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la CynD de *B. pumillus* GMA1 puede hidrolizar preferentemente nitrilos alifáticos con actividades 15 a 25 veces menores en comparación con KCN. Por último, se probó la actividad de una nitrilasa frente a KCN. La nitrilasa de *Rhodococcus* sp. V51B hidroliza preferentemente nitrilos aromáticos como el benzonitrilo y la 3-cianopiridina, aunque también presenta algo de actividad para nitrilos alifáticos como el valeronitrilo, acrilonitrilo, adiponitrilo y propionitrilo, sin embargo, no presentó actividad por KCN. Estos resultados indican que la cavidad del sitio activo de la CynD da cabida a nitrilos orgánicos, todos de tamaño mayor al cianuro. Aun cuando las actividades frente a estos sustratos son mucho menores que para cianuro, podemos clasificar a la CynD como una enzima con una especificidad amplia o promiscuidad de sustratos.

## CONCLUSIONES

- ❖ El método de detección de cianuro por ácido pícrico es eficiente si tenemos enzimas con valores de  $K_m$  pequeñas, ya que con una baja afinidad debe aumentarse la concentración de cianuro y el método pierde sensibilidad.
- ❖ El método de detección OPA-NAC permite utilizar altas concentraciones de cianuro, sin causar interferencia y es altamente reproducible.
- ❖ La mutante H308S es un orden de magnitud más eficiente para cianuro que la enzima silvestre, lo que la hace un excelente candidato para aplicación en biorremediación.
- ❖ La enzima CynD silvestre muestra promiscuidad para nitrilos aromáticos y alifáticos.
- ❖ Las mutantes A133V, A133G y H308S son promiscuas para nitrilos aromáticos y alifáticos.
- ❖ El residuo W165 es clave para la permanencia del cianuro en el sitio activo y por tanto para la actividad enzimática.



## Bibliografía

Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21(6), 501-511.

Banerjee, Sharma, R., & Banerjee, U. (2003). A rapid and sensitive fluorometric assay method for the of nitrilase activity. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 37(3), 289.

Bonete, M., & Martínez-Espinosa, R. (2009). *Avances en el metabolismo de nitrógeno* (1st ed.). [San Vicente del Raspeig, Alicante]: Club Universitario.

Brenner, C. (2002). Catalysis in the nitrilase superfamily. *Current Opinion In Structural Biology*, 12(6), 775-782

Cox, M., Lehninger, A., & Nelson, D. (2005). Lecture notebook for Lehninger principles of biochemistry (1st ed.). New York, NY: Freeman.

*Daños por derrame en río Sonora asciende a mil 870 mdp: Comisión.* (2017). *La Jornada*. Retrieved 7 February 2017. From: <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2015/01/20/danos-por-derrame-en-rio-sonora-asciende-a-mil-870-mdp-4238.html>

Dror RO, Dirks RM, Grossman JP, Xu H, Shaw DE (2012) Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. *Annu Rev Biophys* 41: 429–452.

Dubey, S., & Holmes, D. (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 11(3), 257-265.

Fisher, F., & Brown, J. (1952). Colorimetric Determination of Cyanide in Stack Gas and Waste Water. *Analytical Chemistry*, 24(9), 1440-1444.

Granados Hernández Marco Vladimir. (2009). Clonación de la cianuro dihidratasa de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de licenciatura. UNAM.

Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal Of Hazardous Materials*, 176(1-3), 1-13

Gurbuz, F., Ciftci, H., & Akcil, A. (2009). Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal Of Hazardous Materials*, 162(1), 74-79.

*International Union of Pure and Applied Chemistry.* (2017). *IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry*. Retrieved 1 June 2017, from <http://iupac.org/>

Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P., Sewell, B., Willson, R., & Benedik, M. (2003). CynD, the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene Cloning and Structural Studies. *Applied And Environmental Microbiology*, 69(8), 4794-4805.

- Jandhyala, D., Willson, R., Sewell, B., & Benedik, M. (2005). Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 68(3), 327-335.
- Kao, C., Liu, J., Lou, H., Lin, C., & Chen, S. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*, 50(8), 1055-1061.
- Logsdon, Mark.J. et. al., (1999). *The Management of Cyanide in Gold Extraction. Ontario, Ottawa .ICME.*
- Meyers, P., Gokool, P., Rawlings, D., & Woods, D. (1991). An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. *Journal Of General Microbiology*, 137(6), 1397-1400.
- Meyers, P., Rawlings, D., Woods, D., & Lindsey, G. (1993). Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. *Journal Of Bacteriology*, 175(19), 6105-6112.
- Mudder, T.I., y Botz, M.M., (2004). Cyanide and society: a critical review. *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, Vol. 4, No. 1, 62-74.
- Nava-Alonso, F., Elorza-Rodríguez, E., Pérez-Garibay, R., & Uribe-Salas, A. (2007). Chemical analysis of cyanide in cyanidation process: Review of methods. *Revista De Metalurgia*, 43(1).
- Nolan, L., Harnedy, P., Turner, P., Hearne, A. and O'Reilly, C. (2003). The cyanide hydratase enzyme of *Fusarium lateritium* also has nitrilase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), pp.161-165.
- Oró. J., y Lazcano-Araujo. A., (1978). *The role of HCN and its derivatives in prebiotic evolution. Nature*, 266 (43), 519-441.
- Rinágelová, A., Kaplan, O., Veselá, A., Chmátal, M., Křenková, A., Plíhal, O., Pasquarelli, F., Cantarella, M. and Martínková, L. (2014). Cyanide hydratase from *Aspergillus niger* K10: Overproduction in *Escherichia coli*, purification, characterization and use in continuous cyanide degradation. *Process Biochemistry*, 49(3), pp.445-450.
- Thuku,R.N., Brady, D., Benedik, M.J., and Sewell, B.T. (2009). Microbiol nitrilase: versatile, spiral forming industrial enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 106, 703-727.
- Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., & Karube, I. (1998). Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology*, 144(6), 1677-1682
- Pace, H., and Brenner, C. (2001). The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol.* 2, 1-9.

