

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



Degradación de nitrilos y compuestos
inorgánicos de cianuro por una arquea
hipertermófila aislada de Isla Decepción,
Antártica.

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

PATRICIO ADOLFO URIBE REDLICH



Profesor Patrocinante:

Dr. Mauricio Báez

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile

Director de Memoria:

Dra. Jenny Blamey

Fundación Biociencia

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE MEMORIA

Con el presente se informa a la Dirección de la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Memoria de Título presentada por el candidato

PATRICIO ADOLFO URIBE REDLICH

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Memoria como requisito para optar al Título Profesional de Bioquímico, en el examen rendido el día

Director de Memoria:

Dra. Jenny Blamey _____

Comisión Evaluadora de Memoria:

Dr. Mauricio Báez _____

Dr. Davor Cotoras _____

Dr. Sergio Álvarez _____

AGRADECIMIENTOS

A la profe Jenny por la oportunidad.

A Max por el compromiso.

A mi familia.

TABLA DE CONTENIDOS

Informe de aprobación de memoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Tabla de contenidos.....	iii
Índice de figuras.....	vi
Índice de tablas.....	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Generalidades sobre <i>Pyrococcus</i> sp.....	4
1.2. <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 y su nitrilasa.....	5
1.3. Reacción catalizada por nitrilasas.....	6
1.4. Clasificación de nitrilasas.....	7
1.5. Nitrilasas y sus aplicaciones biotecnológicas.....	8
1.6. Cianuro inorgánico: Toxicidad, aplicaciones y contaminación.....	9
1.7. Nitrilos o cianuro orgánico: Toxicidad, aplicaciones y contaminación.....	12
HIPÓTESIS	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19

2.1. Cultivo de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13.....	17
2.2. Preparación de reactivos.....	19
2.3. Curvas de crecimiento.....	19
2.3.1. Evaluación de crecimiento celular.....	20
2.4. Medición de amonio en el medio.....	21
2.5 Cultivo de <i>E. coli</i> y obtención de nitrilasa recombinante.....	21
2.6. Purificación de nitrilasa endógena.....	23
2.6.1. Determinación de concentración de proteínas.....	24
2.6.2. SDS PAGE.....	25
2.7 Determinación de actividad enzimática.....	26
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Crecimiento de cultivos de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con distintos nitrilos y cianuro inorgánico, como fuentes principales de nitrógeno.....	28
3.2. Generación de NH ₄ ⁺ por <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con distintos nitrilos y cianuro inorgánico, como fuentes principales de nitrógeno.....	34
3.3. Purificación de nitrilasa endógena.....	37
3.4. Obtención de nitrilasa recombinante.....	37
3.5. Inducción de nitrilasa recombinante de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 para biocatálisis de nitrilos y cianuro inorgánico.....	39
3.6 Evaluación de la generación de NH ₄ ⁺ por <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 y su nitrilasa endógena y recombinante.....	42

4. DISCUSIÓN	45
4.1. Condiciones de cultivo de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13.....	45
4.2. Nitrilos como fuente principal de nitrógeno.....	46
4.3. Purificación de nitrilasa de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13.....	50
4.4. Posible rol de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 y su nitrilasa en la biorremediación de nitrilos y cianuros inorgánicos.....	51
5. CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones catalizadas por nitrilasas.....	7
Figura 2A. Curva de crecimiento de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con benzonitrilo como fuente principal de nitrógeno.....	29
Figura 2B. Curva de crecimiento de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con fenilglicinonitrilo como fuente principal de nitrógeno.....	29
Figura 2C. Curva de crecimiento de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con butironitrilo como fuente principal de nitrógeno.....	29
Figura 2D. Curva de crecimiento de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con 3-Cianopiridina como fuente principal de nitrógeno.....	29
Figura 2E. Curva de crecimiento de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con cianuro de potasio como fuente principal de nitrógeno.....	30
Figura 3. Concentración de células de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 después de 24 horas de incubación con distintas concentraciones de nitrilos y cianuro inorgánico.....	33
Figura 4A. Concentración de amonio soluble en cultivos de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 crecido con benzonitrilo como fuente principal de nitrógeno.....	35
Figura 4B. Concentración de amonio soluble en cultivos de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 crecido con fenilglicinonitrilo como fuente principal de nitrógeno.....	35
Figura 4C. Concentración de amonio soluble en cultivos de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 crecido con butironitrilo como fuente principal de nitrógeno.....	35
Figura 4D. Concentración de amonio soluble en cultivos de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 crecido con 3-Cianopiridina como fuente principal de nitrógeno.....	35
Figura 4E. Concentración de amonio soluble en cultivos de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 crecido con cianuro de potasio como fuente principal de nitrógeno.....	35
Figura 5. Análisis electroforético (SDS-PAGE, 15%) de nitrilasa recombinante.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Crecimiento de <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 con distintos nitrilos y cianuro inorgánico como fuente de nitrógeno.....	32
Tabla 2. Tabla de purificación parcial de nitrilasa recombinante.....	39
Tabla 3. Concentración de proteína obtenida en cada medio.....	40
Tabla 4.1. Actividad específica de la fracción correspondiente al extracto crudo de la nitrilasa recombinante.....	41
Tabla 4.2. Actividad específica de la fracción parcialmente purificada por <i>heatshock</i> de la nitrilasa recombinante.....	41
Tabla 4.3. Actividad específica de la fracción insoluble o cuerpos de inclusión de la nitrilasa recombinante.....	42
Tabla 5. Generación de NH_4^+ por <i>Pyrococcus</i> sp. M24D13, nitrilasa endógena y nitrilasa recombinante.....	43

RESUMEN

Dentro de las enzimas que algunas especies de *Pyrococcus* poseen se encuentran las nitrilo-aminohidrolasas (EC 3.5.5.1), también llamadas nitrilasas. Las nitrilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de una variedad de nitrilos a sus respectivos ácidos carboxílicos, liberando amonio. Por otra parte, las cianohidratasas y cianodihidratasas son enzimas pertenecientes a la familia de las nitrilasas capaces de catalizar la hidrólisis de cianuros inorgánicos, generando amonio. El cianuro es utilizado o es producto secundario en variados procesos industriales como galvanoplastia, extracción de metales preciosos, fabricación de plásticos y acero. El desarrollo de métodos para la descontaminación de estos cianuros de desecho es absolutamente necesario ya que pueden ser liberados al medioambiente, contaminando aguas y suelos, siendo altamente tóxicos y letales para la mayoría de las especies conocidas. En este trabajo de memoria se estudió el potencial de degradación de *Pyrococcus* sp. M24D13 y de su enzima nitrilasa endógena y recombinante frente a distintos nitrilos y cianuros inorgánicos. A través de curvas de crecimiento con distintos sustratos nitrilados y la medición de amonio en el medio, se pudo observar que el microorganismo fue capaz de degradar estos compuestos y utilizarlos como fuente de nitrógeno para su crecimiento. Por otro lado, se purificó parcialmente la nitrilasa endógena y recombinante. Para la versión endógena se utilizaron datos de trabajos previos. Mientras que la purificación parcial de la versión recombinante mostró un rendimiento del 63,6%, con una alta actividad específica para la mayoría de los sustratos nitrilados estudiados. Por otro lado, la producción de la nitrilasa recombinante utilizando medios autoinducidos mostró que podría ser una vía para futuros estudios de optimización y escalamiento de la nitrilasa recombinante.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que *Pyrococcus* sp. M24D13 es un microorganismo con potencial de biodegradar diversos compuestos nitrilados mientras que su enzima nitrilasa podría ser una herramienta en la biocatálisis para la síntesis distintos ácidos carboxílicos.

ABSTRACT

Pyrococcus species have nitrile aminohydrolase enzymes (EC 3.5.5.1), also called nitrilases, which can be induced in the microorganism by the presence of nitriles in the culture media. These enzymes catalyse the hydrolysis of a nitrile into its respective carboxylic acid, generating ammonia, which is measured to determine enzymatic activity. On the other hand, cyanohydratases and cyanodihydratases are enzymes that belong to the nitrilase superfamily and are able to catalyse the hydrolysis of different inorganic cyanide species. Cyanide is generated in processes such as electroplating, gold and silver mining and manufacture of steel and different kinds of plastics. The development of cyanide decontamination methods is extremely necessary, since these highly toxic inorganic cyanide species can be released into the environment, polluting soil and water.

In this work, the biodegradation of different nitriles and inorganic cyanide by *Pyrococcus* sp. M24D13 and its endogenous and recombinant nitrilases was assessed. The development of growth curves and determination of ammonia generated, utilizing different nitrile substrates, revealed that the microorganism was able to degrade these compounds and use them as nitrogen source for its growth. On the other hand, the endogenous and recombinant nitrilases were partially purified. For the endogenous nitrilase purification data previously obtained was used. The partial purification of the recombinant nitrilase reached 63.6% yield, having high specific activity with most of the nitrile compounds studied. Additionally, the employment of autoinduced media for the production of the recombinant nitrilase, showed great potential in the optimization and mass production of the recombinant enzyme.

The analysis of the obtained data revealed that *Pyrococcus* sp. M24D13 is a microorganism capable of biodegrade a wide array of nitrile compounds and its nitrilase enzyme could be a biocatalytic tool in the synthesis of different carboxylic acids.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de la historia evolutiva de nuestro planeta ha sido dominada por organismos procariontes, los cuales han sido capaces de adaptar sus metabolismos y proteínas para prosperar en cualquier tipo de ambiente, incluyendo aquellos con condiciones extremas (Merino *et al.* 2019). Estos organismos que están adaptados para crecer óptimamente en condiciones extremas son conocidos como extremófilos y son capaces de prosperar en ambientes que son hostiles e incluso letales para la mayoría de la vida planetaria. Han sido encontrados a 6,7 km dentro de la corteza terrestre, a más de 10 km de profundidad oceánica con presiones de hasta 110 MPa, en ambientes extremadamente ácidos (pH 0), extremadamente alcalinos (pH 12,8) y a temperaturas de hasta 122°C en ventos hidrotermales o temperaturas de -20°C en agua marina congelada (Rampelotto, 2013, Merino *et al.* 2019). Interesantemente estos organismos no sólo pueden sobrevivir a estas condiciones extremas si no que las necesitan para su crecimiento y desarrollo óptimo.

En las últimas décadas, los científicos han desarrollado un gran interés por estos organismos ya que su investigación puede generar conocimiento desde la adaptación evolutiva para prosperar en condiciones extremas y sus aplicaciones en la industria biotecnológica, especialmente bioprocesos en que organismos mesófilos no pueden ser utilizados debido a las condiciones extremas que se necesitan y donde los procesos químicos asociados son poco eficientes y peligrosos para el medioambiente (Rathinam y Sani, 2018).

En este trabajo de memoria se pretenden integrar estas dos visiones de la investigación, una microbiológica y otra biotecnológica, donde se analizó el metabolismo de un microorganismo extremófilo que posee una enzima capaz de metabolizar compuestos altamente contaminantes para el medioambiente y biocatalizar su conversión a productos de rutas metabólicas y de interés industrial.

1.1 Generalidades sobre *Pyrococcus* sp.

Los hipertermófilos son microorganismos que crecen óptimamente a temperaturas de 80°C o superiores (Stetter, 1996 y 2015). Estos microorganismos pueden ser anaeróbicos estrictos y poseer un metabolismo heterótrofo caracterizado por la utilización de péptidos como fuente de carbono y de azufre elemental (S⁰) como aceptor terminal de electrones, llevando a la generación de sulfuro de hidrógeno (H₂S) como producto de la reacción. Los hipertermófilos heterótrofos reductores de S⁰ más estudiados corresponden a especies del género *Pyrococcus* pertenecientes al orden Thermococcales del dominio *Archaea*.

El nombre *Pyrococcus* fue acuñado hace más de treinta años y significa “bola de fuego” (Fiala *et al.* 1986). Las células de *Pyrococcus* son cocos ligeramente irregulares de entre 0,8 a 2,5 µm de diámetro. Móviles, flagelación lofotrica y poseen un contenido de G-C en su ADN entre 38%-47%. Estos microorganismos son estrictamente anaeróbicos con un metabolismo heterótrofo. Su crecimiento es inhibido por hidrógeno (H₂), el cual es generado como producto derivado de reacciones de fermentación de azúcares como la maltosa, donde también se producen dióxido de carbono (CO₂) y acetato (Schäfer y Schönheit, 1992).

Pyrococcus se caracteriza por habitar en aguas de variadas profundidades (desde unos pocos metros hasta más de 4 kilómetros), principalmente en las cercanías de ventos hidrotermales (Stetter y Huber, 2015). Estas emanaciones hidrotermales de hasta 400°C expulsan distintas especies de azufre, carbono, nitrógeno y metales, generando gradientes de temperatura al entrar en contacto con el agua marina fría. Dicho fenómeno permite la generación de microambientes donde se albergan distintas distribuciones de compuestos químicos a distintas temperaturas (a mayor distancia de la emanación, menor temperatura), lo que hace posible encontrar una variedad enorme de poblaciones microbianas (Dick, 2019). Estas incluyen hipertermófilos del género *Pyrococcus* como *Pyrococcus furiosus* (Fiala y Stetter, 1986), *Pyrococcus woesei* (Zillig *et al.* 1987), *Pyrococcus abyssi* (Erauso *et al.* 1993), *Pyrococcus horikoshii* (González *et al.* 1998), *Pyrococcus glycovorans* (Barbier *et al.* 1999) y *Pyrococcus yayanosii* (Birrien *et al.* 2011).

A la fecha, varias enzimas de *Pyrococcus* han sido caracterizadas y aisladas, como el caso de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa de *P. furiosus* (Blamey et al. 1993), ferredoxina de *P.woesei* (Blamey et al. 2000), enolasa de *P. furiosus* (Peak et al. 1993), alfa-amilasa de *P. furiosus* (Dong et al. 1997), sulfuro dehidrogenasa (Ma et al. 1994), distintas enzimas del metabolismo del hidrógeno en *P. furiosus* (Silva et al. 2001), entre otras. Interesantemente se descubrió que la carbamoil-fosfato sintasa de *P. furiosus* utiliza amonio (NH_4^+) como fuente de nitrógeno y no glutamina, como la gran mayoría de las carbamoil-fosfato sintasas conocidas, lo que posiciona a NH_4^+ como compuesto fundamental en las vías biosintéticas de arginina y pirimidina (Legrain et al. 1995).

Sin embargo, al analizar las secuencias genómicas reportadas, una gran parte de las enzimas de *Pyrococcus* son putativas y no han sido estudiadas en profundidad. Dentro de estas enzimas destacan las nitrilo-aminohidrolasas (EC 3.5.5.1) o nitrilasas, las cuales son enzimas que generan NH_4^+ al catalizar la conversión de un nitrilo a un ácido carboxílico y podrían participar del metabolismo del nitrógeno en algunas especies de *Pyrococcus*. Hasta el 2006 no se había descrito en arqueas algún tipo de actividad nitrilasa y a partir de secuencias genómicas que codifican para una nitrilasa putativa se logró clonar, sobreexpresar y caracterizar una nitrilasa de *P. abyssi* (Mueller et al. 2006).

1.2 *Pyrococcus* sp. M24D13 y su nitrilasa.

La primera nitrilasa descrita fue parcialmente purificada a partir de hojas de *Hordeum vulgare* (Thimann et al. 1964). Desde entonces, varias de estas enzimas han sido descritas en diferentes plantas como *Brassica napus* (Bestwick et al. 1993), *Arabidopsis thaliana* (Bartel et al. 1994), *Nicotiana tabacum* (Dohmoto et al. 2000) y *Zea mays* (Park et al. 2003). Estas nitrilasas de origen vegetal participan principalmente en la biosíntesis del ácido indol-3-acético, el cual es la auxina más común y naturalmente distribuida en plantas; en el catabolismo de glucósidos y glucosinolatos cianogénicos y en la síntesis y/o detoxificación de metabolitos defensivos (Howden et al. 2009). Hasta hoy se han descrito nitrilasas en animales como *Caenorhabditis elegans* (Pekarsky et al. 1998), fungi como *Saccharomyces cerevisiae* (Shen et al.

2021), bacterias como *Rhodococcus rodochrous* (Pace *et al.* 2001) y arqueas como *P. abyssi* (Mueller *et al.* 2006). Estas enzimas se encuentran distribuidas a lo largo de todos los dominios, siendo el dominio *Archaea* el menos explorado en el estudio de nitrilasas.

Durante la Expedición Científica Antártica ECA 46, en Isla Decepción, Antártica, la Fundación Biociencia la logró aislar y caracterizar parcialmente una especie de *Pyrococcus* utilizando un enfoque de bioprospección funcional (Cáceres-Moreno *et al.* 2019), la cual se denominó *Pyrococcus* sp. M24D13. Este microorganismo fue obtenido en aguas de baja profundidad y temperatura sobre los 90°C, siendo capaz de crecer en presencia de benzonitrilo (Dennet y Blamey, 2016). Se logró aislar de este *Pyrococcus* la primera nitrilasa termoactiva y termoestable de origen antártico, con actividad óptima a una temperatura de 85°C y con un amplio rango de especificidad de sustrato (Dennett y Blamey, 2016).

1.3 Reacción catalizada por nitrilasas.

Las nitrilasas catalizan la hidrólisis de nitrilos (compuestos orgánicos donde una de sus cadenas de carbono está unida a un grupo funcional ciano: $R-C\equiv N$), para formar su respectivo ácido carboxílico en un sólo paso catalítico, generando NH_4^+ , sin la necesidad de cofactores para su actividad (Singh *et al.* 2006, Nigam *et al.* 2017). En este trabajo se estudió cinco compuestos nitrilados como sustrato de la nitrilasa, los cuales serían convertidos a sus respectivos ácidos carboxílicos (Fig. 1): Benzonitrilo (nitrilo aromático) a ácido benzoico (Fig. 1A), fenilglicinonitrilo (amino nitrilo) a fenilglicina (Fig. 1B), butironitrilo (nitrilo alifático) a ácido butírico (Fig. 1C), 3-cianopiridina (nitrilo heterocíclico) a ácido nicotínico (Fig. 1D) y KCN (cianuro inorgánico simple) a ácido fórmico (Fig. 1E). Se eligió un compuesto por cada tipo de sustrato nitrilado para así poder analizar la versatilidad de *Pyrococcus* sp. M24D13 y su enzima nitrilasa.

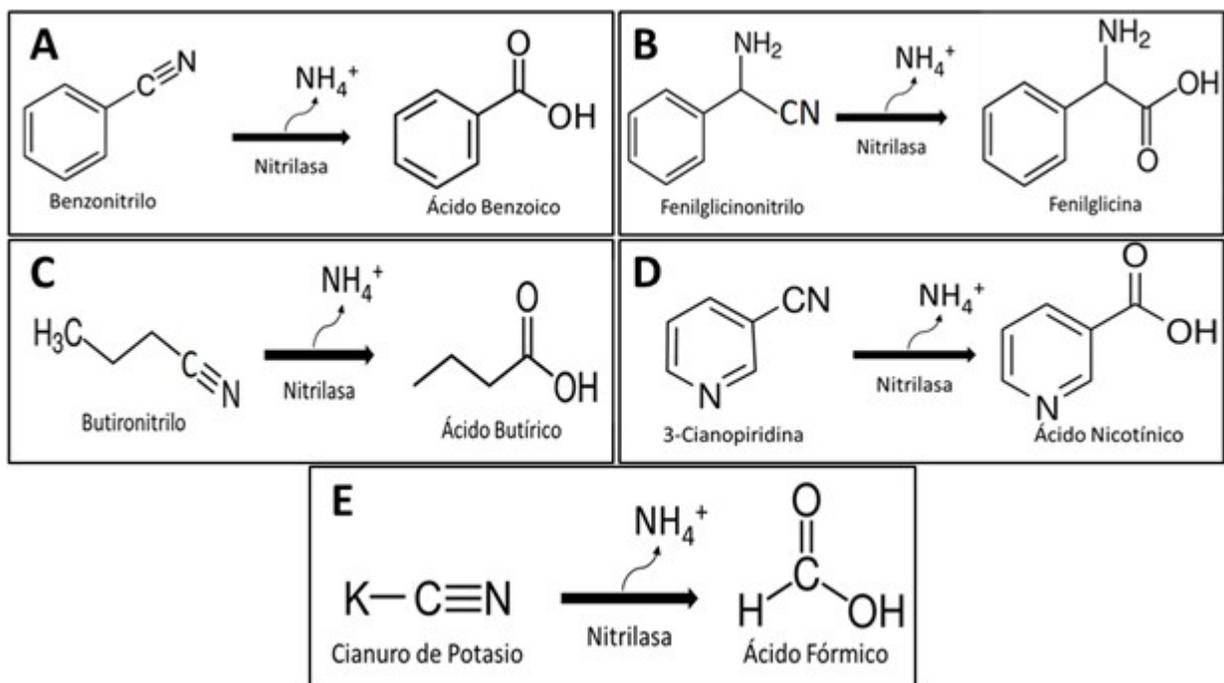


Figura 1. Reacciones catalizadas por nitrilasas. Biosíntesis de los distintos ácidos carboxílicos catalizada por una nitrilasa a partir de sus correspondientes nitrilos estudiados en este trabajo de memoria.

1.4 Clasificación de nitrilasas.

Estas enzimas se clasifican en seis sub-clases, tres que poseen una amplia gama de sustratos: nitrilasas alifáticas, nitrilasas aromáticas y arilacetónitrilasas, y además tres enzimas que son sustrato específicas y que sólo utilizan los siguientes sustratos: ricinina, cianoalanina y bromoxinil (Chhiba-Govindjee *et al.* 2019). Si bien, la gran mayoría de las nitrilasas son sustrato específicas, existen reportes de nitrilasas que pueden clasificarse en más de una sub-clase. Esto significa que pueden utilizar más de un tipo de sustrato, pero se observa una nula o muy baja actividad con el sustrato secundario (Martínková, 2019).

De acuerdo a la actividad y productos de reacción, las enzimas de esta familia que degradan cianuro inorgánico (CN^-) se clasifican en dos sub-clases, cianuro hidratatasas y cianuro dihidratatasas. Estas enzimas comparten alrededor de un 30% de identidad de su secuencia aminoacídica con las nitrilasas, pero el mecanismo por el cual hidrolizan

el sustrato es análogo al de las nitrilasas. Los productos de la reacción enzimática de las enzimas cianuro hidratatasas y cianuro dihidratatasas son la correspondiente formamida y el correspondiente ácido fórmico, respectivamente (Martínková *et al.* 2015, 2017).

Las enzimas nitrilasas, cianuro hidratatasas y cianuro dihidratatasas están relacionadas funcionalmente y pertenecen a la rama 1 de la superfamilia de las nitrilasas. Esta es la única rama en que sus miembros presentan actividad nitrilasa real, es decir, la conversión de un nitrilo a su respectivo ácido carboxílico en un paso catalítico. Las otras doce ramas exhiben principalmente actividad amidasa, N-aciltransferasa y carbamilasa (Pace *et al.* 2001). La mayoría de los miembros de la superfamilia de nitrilasas se caracterizan por existir como oligómeros con subunidades que pesan entre 30-45 kDa. A la fecha han sido descritas nitrilasas monoméricas (Bandyopadhyay *et al.* 1986) así como de hasta 22 subunidades repetidas (Woodward *et al.* 2018). Comparten un plegamiento estructural común, un sándwich tipo $\alpha\beta\beta\alpha$ y una tríada de aminoácidos catalíticos cisteína-ácido glutámico-lisina (Brenner, 2002). Esta tríada catalítica está flanqueada por secuencias distintivas que están conservadas a lo largo de una rama, pero que difieren con miembros de otras ramas, por lo que para la búsqueda de cianohidratatasas, cianodihidratatasas y nitrilasas se utilizan estos aminoácidos catalíticos y secuencias conservadas en la rama 1.

1.5 Nitrilasas y sus aplicaciones biotecnológicas.

La capacidad que poseen estas enzimas de catalizar en un paso la conversión de un nitrilo a su respectivo ácido carboxílico, sin la necesidad de sustratos suplementarios o cofactores y con generación de NH_4^+ como único producto en conjunto al correspondiente ácido carboxílico, las hace un blanco de desarrollo atractivo para distintos sectores productivos como minero, alimenticio, cosmético y farmacéutico (Gong *et al.* 2012). En este último destaca por ejemplo la nitrilasa de *Arabidopsis thaliana*, la cual es utilizada por Pfizer en el proceso de conversión de 2-isobutil-succinonitrilo a (S)-3ciano-5-ácido metilhexanoico, este ácido carboxílico se utiliza como intermediario en la síntesis de (S)-3(aminometil)-5-ácido metilhexanoico, más

conocido como pregabalina, un fármaco análogo al neurotransmisor GABA el cual es ampliamente utilizado en el tratamiento y prevención de algunos desórdenes convulsivos, dolor y desórdenes psicóticos (Burns *et al.* 2005). No sólo se han reportado usos biosintéticos de estas enzimas, también se han estudiado enfoques de biorremediación, como el caso de *Bacillus* sp. UG-5B, microorganismo que posee una nitrilasa termoestable, el cual acoplado a matrices de materiales híbridos pudo biodegradar con éxito mezclas de distintas concentraciones de tolunitrilos orto, meta y parasustituídos (Kabaivanova *et al.* 2011). Por otro lado, la bacteria *Bacillus pumilus* C1 es uno de los primeros microorganismos reportados que posee una cianodihidratasa, este microorganismo mostró actividad cianidasa con especies de cianuro inorgánicas (Meyers *et al.* 1993).

La aplicación de estas enzimas en contextos de biocatálisis y biorremediación ha sido explorada. Sin embargo, es importante continuar los estudios relacionados a biorremediación de cianuros inorgánicos y nitrilos debido al alto impacto medioambiental que tienen las contaminaciones asociadas a ellos.

1.6 Cianuro inorgánico: Toxicidad, aplicaciones y contaminación.

El cianuro inorgánico (CN^-) está ampliamente distribuido en la naturaleza. Es producido y utilizado por una gran variedad de organismos en sus metabolismos. Se ha sugerido que compuestos de CN^- pudieron haber participado de forma prominente en la evolución prebiótica en la Tierra y el origen de macromoléculas biológicas y vida primitiva (Oró y Lazcano-Araujo, 1981, Commeyras *et al.* 2004). Sin embargo, el CN^- libre es extremadamente tóxico para una gran parte de los organismos vivos. Esto debido a que inhibe la acción de la citocromo oxidasa-C en la cadena de transporte de electrones, inhibiendo la respiración celular y produciendo eventualmente muerte celular por anoxia. También inhibe a otras metaloenzimas debido a su capacidad de formar compuestos cianometálicos donde secuestra cofactores metálicos críticos para el correcto funcionamiento de estas metaloenzimas, por lo que su citotoxicidad es compartida por organismos aeróbicos y anaeróbicos (Vogel *et al.* 1981).

Existen tres grupos principales de especies de cianuro inorgánico, los que varían en su nivel de toxicidad de acuerdo a la biodisponibilidad del CN^- . Estos grupos corresponden a:

- Especies de cianuro libre (CN^-), donde puede encontrarse en forma gaseosa como HCN o disuelto en el medio en forma de sales como KCN o NaCN. Estas especies de cianuro son las más tóxicas debido a que el CN^- está completamente biodisponible.
- Especies de cianuro disociables en medios ácidos débiles, las que corresponden a complejos cianometálicos no débiles o de estabilidad moderada como de níquel, cadmio, cobre y zinc. Estas presentan una toxicidad moderada a alta, debido a que el CN^- puede disociarse de las moléculas metálicas pudiendo quedar libre.
- Especies de cianuro cianometálicas fuertes, las que corresponden a complejos cianometálicos estables de oro, plata y hierro. Estas especies presentan una toxicidad relativamente baja en comparación a los dos grupos anteriores debido a que el CN^- es altamente afín a estos metales, manteniéndose estable al estar acomplejado con o secuestrado por estos metales, por lo que su biodisponibilidad es baja. Aún así, se han reportado microorganismos capaces de metabolizar estas especies cianometálicas fuertes como el caso de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. (Park *et al.* 2017, Bouari *et al.* 2013).

En seres humanos se han registrado dosis letales de entre 0,02 a 0,06 mmol CN^- /kg de peso (Shete y Kapdnis, 2012), en ganado la dosis letal reportada es de aproximadamente 7,7 mmol CN^- /kg peso (Bapat y Abhyankar, 1984) mientras que en animales pequeños como el pato de Mallard o la paloma de la roca se han registrado dosis letales de 0,05 y 0,1 mmol CN^- /kg de peso (Donato *et al.* 2007). Se ha observado que incluso concentraciones tan bajas como 0,2 μM afectan la habilidad reproductiva y el nado de peces e invertebrados acuáticos (Logsdon *et al.* 1999, Madeira *et al.* 2020). Sin embargo, aún cuando se conocen los peligros de las especies de CN^- , actualmente las actividades antropogénicas son responsables por la mayoría del CN^- inorgánico disponible en el planeta (Baxter *et al.* 2006).

En la actualidad, el CN^- es utilizado o es producto secundario en una variedad de procesos industriales como galvanoplastia, fabricación de plásticos, producción de resinas, producción de coque a partir de carbón, gasificación de carbón, fabricación de acero, producción de fibras acrílicas y extracción de metales como plata y oro (Nsimba 2009, Martinková *et al.* 2015). Estos procesos industriales generan una alta cantidad de desechos de distintas especies de CN^- , los que se concentran principalmente en aguas de desechos, aguas subterráneas contaminadas y lodos contaminados los que pueden llegar a poseer concentraciones de CN^- del orden molar (Park *et al.* 2017, Razanamahandry *et al.* 2017). Estos efluentes contaminan ambientes debido a la negligencia antropogénica, causando graves daños ecológicos (Gupta *et al.* 2010).

El cianuro es detoxificado convencionalmente por una variedad amplia de procesos fisicoquímicos como oxidación química por cloración alcalina, procesos de aireación y aplicación de dióxido de azufre, ozonización en presencia de luz ultravioleta (UV), pulido con carbón activado, procesos de aplicación de peróxido de hidrógeno catalizados por cobre, proceso de Caro, entre otros, donde la hidrólisis de CN^- a altas temperaturas ocurre en algunos de ellos (Ackil, 2003. Gupta *et al.* 2009). Sin embargo, estos procesos tienen costos de operación elevados, requieren de infraestructura avanzada, necesitan almacenamiento a largo plazo debido a los largos tiempos de reacción e involucran la utilización de reactivos que poseen sus propios peligros medioambientales (Park *et al.* 2017). Es por esto que se hace necesario el estudio de métodos costo-efectivos y de menor impacto medioambiental, como la biorremediación de especies de CN^- utilizando microorganismos capaces de metabolizar dichos compuestos (Ackil, 2003, Jandhyala *et al.* 2005).

En la actualidad se conocen diversos microorganismos capaces de degradar especies de cianuro como las bacterias *Klebsiella oxytoca* (Kao *et al.* 2003) y *Rhodopseudomonas gelatinosa* (Materassi *et al.* 1977). Ambas reducen CN^- a metano y NH_4^+ utilizando la enzima nitrogenasa. Por otro lado, existen otros microorganismos que convierten CN^- en metabolitos por vías de oxidación, como el caso de *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. Esta bacteria posee un alto porcentaje de conversión de CN^- lo que da buenos indicios de su potencial uso en biorremediación de

CN⁻ (Park *et al.* 2017). También existen microorganismos como *Bacillus megaterium* y *Citrobacter freundii* que no degradan el CN⁻ pero son capaces de asimilarlo como metabolito primario para sus vías metabólicas donde es utilizado como fuente de nitrógeno para el crecimiento (Castric y Strobel, 1964, Porter y Knowles, 1979). Finalmente existen organismos que son capaces de hidrolizar CN⁻, gracias a la actividad de sus enzimas cianohidratasa o cianodihidratasa, como los hongos *Fusarium lateritium* y *Gloeocercospora sorghi* (Basile *et al.* 2008), que hidrolizan CN⁻ a formamida vía cianohidratasa y las bacterias *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus pumilus* (Jandhyala *et al.* 2005), que hidrolizan CN⁻ a ácido fórmico y NH₄⁺, reacción catalizada por cianodihidratasa.

1.7 Nitrilos o cianuro orgánico: Toxicidad, aplicaciones y contaminación.

Los nitrilos son compuestos orgánicos de cianuro (ver sección 1.3) y tal como las especies inorgánicas de CN⁻ también se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Bhalla *et al.* 2011). Principalmente se encuentran como fenilacetoneitrilos, cianoglicósidos o cianolípidos, compuestos que son generados principalmente por plantas e invertebrados (Bestwick *et al.* 1993, Conn, 1981, Piotrowski, 2008). Sin embargo existen estudios toxicológicos de estos compuestos que han demostrado su alta toxicidad. Por ejemplo, Tanii y Hashimoto (1984), estudiaron 21 nitrilos distintos y sus efectos en ratas, reportando que varios de estos compuestos poseen dosis letales similares a las de CN⁻, lo que ocurriría debido a la liberación del grupo ciano con excepción del cianuro orgánico benzonitrilo, el cual no liberaría su grupo CN⁻ en ratas.

De manera similar al caso de las especies de cianuro inorgánicas, los nitrilos también poseen una amplia gama de aplicaciones industriales. Se utilizan como bloques de construcción y/o reactivos en la producción de poliésteres, poliamidas, drogas farmacéuticas, pigmentos, colorantes, agroquímicos y productos químicos finos (Bhalla *et al.* 2018). Pero su uso principal y más estudiado es en la síntesis de diversos ácidos carboxílicos como ácido glicólico, ácido mandélico y ácido nicotínico (Dennet y Blamey, 2016, Bhalla *et al.* 2018). En esta síntesis de ácidos carboxílicos se utilizan tradicionalmente catalizadores químicos para aumentar la velocidad de reacción y

eficiencia de la síntesis. Estas reacciones usualmente involucran la utilización de compuestos tóxicos, requieren de condiciones extremas de temperatura o pH, son de elevado costo, son poco eficientes y producen una alta cantidad de productos secundarios indeseados pudiendo contaminar el medioambiente (Dash *et al.* 2009). Estos desechos incluyen típicamente acetonitrilo, acrilonitrilo, succinonitrilo, benzonitrilo, diclobenil, bromoxinil y/o ioxinil, todos ellos cianuros orgánicos que son altamente tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos (Gong *et al.* 2012). Actualmente los métodos de descontaminación de nitrilos que han sido aplicados son de un elevado costo comercial y requieren la utilización de otros reactivos tóxicos (Ingvorsen *et al.* 1988).

Por estas razones se ha ido desarrollando un gran interés en la industria por la búsqueda de nitrilasas que puedan ser utilizadas como biocatalizadores amigables con el medio ambiente, reemplazando o utilizándose en conjunto a la síntesis química de ácidos carboxílicos (Nishise *et al.* 1987, Wyatt y Knowles 1995, Dash *et al.* 2009). Actualmente se emplean nitrilasas en distintos procesos de producción, donde se utilizan enfoques híbridos químicos y enzimáticos (Almatawah y Cowan, 1999). Es el caso de la manufacturación de ácido glicólico, donde tras un tratamiento con calor sobre formaldehído y HCN se genera glicolonitrilo, el cual es sometido a biocatálisis con una nitrilasa de *Acidovorax facilis* 72W, produciéndose el ácido glicólico. Dicho proceso está patentado actualmente por la compañía Du Pont (Dicosimo *et al.* 2006).

Las nitrilasas son de gran interés para llevar a cabo la biocatálisis de dichas reacciones y biorremediación de los nitrilos de desecho, produciendo sólo NH_4^+ y el ácido carboxílico asociado, permitiendo así, disminuir los costos y la polución ambiental asociada a estos procesos industriales (Gong *et al.* 2015). Por lo que una nitrilasa termoactiva y termoestable, que soporte las condiciones de temperatura elevadas a las que se realizan estas síntesis y degradaciones químicas es especialmente atractiva para la industria.

Debido al potencial de biorremediación y biocatalítico de las nitrilasas, cianohidratasas y cianodihidratasas, enzimas que posean estas actividades son cada vez más relevantes, lo que ha llevado a un aumento de más de un 2000 % en las

investigaciones dedicadas a esta área en los últimos 30 años (Gong *et al.* 2012). En particular enzimas que sean capaces de ejercer más de una de estas actividades son altamente buscadas. Existen reportes de cianohidratasa que también poseen actividad nitrilasa, como la cianohidratasa del hongo filamentoso *Fusarium lateritium*. Esta cianohidratasa puede utilizar benzonitrilo como sustrato pero con una muy baja eficiencia, registrando una actividad relativa de 0,033% en relación a su actividad cianohidratasa (Nolan *et al.* 2003). Además existen estudios de nitrilasas con actividad cianodihidratasa y cianodihidratasa con actividad nitrilasa, como en los hongos *Nectria haematococca* y *Arthroderma benhamiae*, respectivamente (Veselá *et al.* 2013, Kaplan *et al.* 2013).

Interesantemente, la caracterización de la nitrilasa de *Pyrococcus* sp. M24D13 reveló la enzima posee actividad cianodihidratasa al ser capaz de utilizar cianuro de potasio (KCN) como sustrato y producir NH_4^+ como parte del producto de la reacción, observándose una actividad relativa de 526,7% en relación al sustrato benzonitrilo (Dennett y Blamey, 2016). Que esta enzima fuera termoactiva y termoestable además de poseer versatilidad única de sustratos y una actividad elevada para ellos, llevó al desarrollo de la versión recombinante de esta enzima. La secuencia del gen que codifica para esta nitrilasa (nitmc-fb) fue sometida a optimización de codones mediante el programa DNA 2.0. Posteriormente el gen optimizado fue ligado al plasmidio pD441, donde el gen estaba bajo el control del promotor T5 en el vector pD441-Nit. Este vector con el gen insertado fue utilizado para transformar células de *E. coli* BL-21 para sobreexpresar la nitrilasa (Cabrera y Blamey, 2017). Esta versión recombinante mantuvo las propiedades de termoestabilidad y termoactividad, aunque disminuyó su actividad para todos los sustratos con respecto a la versión endógena de la enzima, incluyendo la pérdida total de actividad enzimática con KCN como sustrato. Esta nitrilasa recombinante es la que se utilizó en este trabajo de memoria.

Por las razones enunciadas anteriormente es que existe la posibilidad de que el microorganismo *Pyrococcus* sp. M24D13 no sólo crezca en presencia de ciertos cianuros orgánicos e inorgánicos para la inducción de su enzima nitrilasa, sino que también los degrade y utilice como fuente de nitrógeno durante su crecimiento. Por otro

lado, las características de la enzima nitrilasa de *Pyrococcus* sp. M24D13, lo harían el primer microorganismo hipertermófilo con una enzima con actividad dual de tipo nitrilasa/cianodihidratasa, lo que posicionaría a este microorganismo y/o su enzima como una herramienta de biorremediación y biocatálisis altamente versátil.

Es por esto que en este trabajo de memoria de título se propone estudiar la capacidad de *Pyrococcus* sp. M24D13 de degradar nitrilos y cianuros inorgánicos gracias a la acción de su enzima nitrilasa y analizar su potencial de biorremediación y biocatálisis. A partir de esto se propone la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La arquea hipertermófila *Pyrococcus* sp. M24D13 es capaz de degradar y utilizar nitrilos y compuestos inorgánicos de cianuro como fuente de nitrógeno para su crecimiento debido a la actividad de su enzima nitrilasa.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de degradación de compuestos nitrilados por la arquea hipertermófila *Pyrococcus* sp. M24D13 y su enzima nitrilasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 y generación de NH_4^+ en presencia de distintos sustratos nitrilados, orgánicos e inorgánicos.
2. Comparar la capacidad de *Pyrococcus* sp. M24D13 y su nitrilasa endógena para degradar distintos sustratos nitrilados, orgánicos e inorgánicos.
3. Evaluar la capacidad de la nitrilasa recombinante para degradar distintos sustratos nitrilados, orgánicos e inorgánicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13

La cepa microbiana con la que se trabajó corresponde a *Pyrococcus* sp. M24D13, la cual fue aislada originalmente a partir de muestras ambientales de Isla Decepción, Antártica, en el marco de la expedición ECA 46 (Dennet y Blamey, 2016). Se diseñó un medio de cultivo a pH 7,0 a partir del utilizado por Dennet y Blamey (2016), que contiene: 1 g/L extracto de levadura, 4 g/L peptona, 23,4 g/L NaCl, 10,8 g/L $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 4 g/L Na_2SO_4 , 0,7 g/L KCl, 0,2 g/L NaHCO_3 , 0,2 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,09 g/L KBr, 0,025 g/L $\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025 g/L H_3BO_3 , 0,03 g/L KI, 0,003 g/L NaF, 0,35 g/L KH_2PO_4 , 0,7 g/L NH_4Cl y 5 g/L S° . Inmediatamente después de autoclavar y cuando el medio se encuentra caliente, se agregó el S° (esterilizado a 100°C por 24 horas e irradiación con luz UV por 1 hora) y 15 mL/L de solución trazas (esterilizadas por filtración). La solución trazas contiene: 1,1 g/L FeCl_3 , 0,5 g/L MnSO_4 , 0,3 g/L Na_2WO_4 , 0,2 g/L NiCl_2 , 0,1 g/L CoSO_4 , 0,1 g/L ZnSO_4 , 0,01 g/L CuSO_4 y 0,01 g/L Na_2MoO_4 .

Para estimular el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 y eliminar cualquier concentración remanente de benzonitrilo o NH_4^+ que pudiera ser arrastrada desde el cultivo original, se realizó una serie de trasposos (notar que cada trasposo corresponde a una inoculación al 2%). A partir del cultivo original de *Pyrococcus* sp. M24D13 (Dennet y Blamey, 2016), se realizó un trasposo en triplicado en botellas de cultivo de 120 mL utilizando 80 mL de medio, a partir de estos tres cultivos se eligió el que presentó mejor crecimiento (análisis por recuento microscópico) y se volvió a trasposar en triplicado. Nuevamente se volvió a elegir el cultivo que presentó mejor crecimiento del triplicado de este segundo trasposo y se realizó un tercer trasposo en triplicado, esto para generar cultivos stock de trabajo. Se analizó el crecimiento de estos últimos cultivos trasposados y se seleccionó nuevamente el que presentó mejor crecimiento, esto para realizar otro trasposo en triplicado a botellas de menor volumen (54 mL). Se utilizaron 36 mL de medio, manteniendo la relación en razón a volumen de medio versus volumen de botella. Se volvió a seleccionar el cultivo que mostró mejor crecimiento y se volvió a realizar un trasposo en triplicado. De estos tres nuevos cultivos, se repitió el paso anterior, generando tres cultivos finales los cuales fueron

utilizados para obtener los inóculos. Notar que esta serie de traspasos es necesaria para la reactivación de los cultivos, los cuales disminuyen su crecimiento significativamente al estar en reposo por tiempos superiores a tres semanas.

Para los cultivos donde se analizó el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 en presencia de distintos nitrilos (ver sección 2.3) se utilizó el mismo medio pero removiendo la peptona y el NH_4Cl , esto para minimizar lo más posible la cantidad de NH_4^+ disponible en el medio. Se agregó maltosa 2 g/L para suplementar el carbono perdido al remover peptona. Todos los cultivos y reactivos fueron trabajados y preparados en condiciones anóxicas. Para lograr esta condición se utilizó un sistema *manifold*, el cual es un complejo de cañerías de cobre delgadas conectadas entre sí y unidas de manera que sólo una queda conectada a un cilindro de nitrógeno gaseoso comprimido y a partir de esta se ramifican varias salidas, cada una con su válvula de apertura individual. A cada una de estas salidas se le adaptó un tubo flexible con una válvula en su extremo capaz de aceptar una aguja de jeringa. De esta forma se puede inyectar nitrógeno gaseoso (N_2) a las botellas de cultivo y remover el oxígeno (O_2) del medio. La purga con N_2 se realiza inmediatamente después de autoclavar las botellas con medio. Se agrega el S° y se sellan las botellas, las cuales se mantuvieron a 90°C utilizando un calefactor de bloque. Se inyectó N_2 a 15 psi a través de un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$ de diámetro, procurando de tener una aguja de escape para permitir la salida del nitrógeno inyectado y el consiguiente arrastre del O_2 . Finalmente se quita la aguja de salida y se mantiene el flujo de N_2 por unos segundos para dejar presión positiva dentro de las botellas de cultivo.

Para asegurar que los medios de cultivo poseen el potencial de reducción necesario para el crecimiento de los microorganismos anaeróbicos, se agregó como agente reductor una solución de L-ascorbato de sodio a una concentración final $100\ \mu\text{M}$. Como indicador redox se utilizó resazurina $0,5\ \text{mg/L}$ de medio.

El medio en condiciones anaeróbicas y a una temperatura aproximada de 90°C se inoculó al 2% a partir de uno de los cultivos stock de *Pyrococcus* sp. M24D13. La incubación de los cultivos de *Pyrococcus* sp. M24D13 se realiza a 90°C durante 20 horas, para lo que se utilizó un baño termoregulado de 10 litros Fisher Scientific.

2.2 Preparación de reactivos

No sólo los cultivos de *Pyrococcus* sp. M24D13 deben estar en condiciones anaeróbicas si no que los reactivos que se inyectan también. Esto para evitar la entrada de O₂ al medio. Para lograr esta condición de anaerobiosis se pesaron los reactivos sólidos y fueron transferidos a botellas estériles. Posteriormente estos sólidos en botellas estériles selladas se desgasificaron utilizando el sistema *manifold*, inyectando N₂ y permitiendo la salida del O₂ por arrastre. En paralelo se procedió a generar stocks anaeróbicos de etanol 98% de pureza y agua destilada estéril, siguiendo los mismos pasos anteriores para purgar O₂ por flujo de N₂. Se dejó desgasificar los reactivos y solventes por 30 minutos. Posteriormente se inyecta desde las botellas con solvente anaeróbico las botellas con los reactivos sólidos para posteriormente solubilizarlos. Finalmente, cada solución anaeróbica es filtrada hacia otra botella anaeróbica y estéril por medio de un filtro de 0,2 µm de diámetro para su esterilización. Con esto se logra la condición de anaerobiosis y esterilización de todos los reactivos. Todos los reactivos stock fueron preparados a 100mM para así utilizar una cantidad uniforme de volumen cada vez que se utilicen.

Se utilizaron los siguientes reactivos como sustratos nitrilados: benzonitrilo Sigma Aldrich, n-butironitrilo (butironitrilo) Sigma Aldrich, 3-piridinacarbonitrilo (3-cianopiridina) Sigma Aldrich, 2-fenilglicinonitrilo (fenilglicinonitrilo) Sigma Aldrich y cianuro de potasio (KCN) Winkler.

Se utilizaron los siguientes reactivos para el ensayo enzimático: fenolato de sodio trihidratado (fenóxido de sodio) Merck, nitroprusiato de sodio dihidratado (nitroprusiato de sodio) Merck, solución de hipoclorito de sodio (hipoclorito de sodio) Sigma Aldrich.

2.3 Curvas de crecimiento

Para la realización de las curvas de crecimiento se utilizaron distintos nitrilos como fuente principal de nitrógeno a una concentración final de 1 mM. Benzonitrilo, cianuro

orgánico aromático; butironitrilo, cianuro orgánico alifático; 3-cianopiridina, cianuro orgánico heterocíclico; fenilglicinonitrilo, cianuro orgánico amino aromático y cianuro de potasio, sal de cianuro inorgánica. Las curvas de crecimiento se realizaron a 90°C en triplicado, tomando alicuotas cada tres horas durante 24 horas para realizar las mediciones correspondientes. Además de las condiciones con distintos nitrilos, se realizó un cultivo en triplicado de *Pyrococcus* sp. M24D13 crecido con NH₄Cl como fuente principal de nitrógeno y sin nitrilos como control positivo y otra condición como control negativo correspondiente al medio con el nitrilo en análisis pero sin inocular, para descartar producción abiótica de NH₄⁺.

2.3.1 Evaluación de crecimiento celular

Cada tres horas, el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 fue analizado por conteo celular directo mediante microscopía óptica utilizando un microscopio Nikon Eclipse E100 y una cámara de Neubauer con una profundidad de 0,02 mm, por lo que se utilizaron 2 µL de muestra, los cuales fueron inyectados en la cámara con una micropipeta y distribuidos al interior por capilaridad. Se realizaron diluciones al 10% en las muestras extraídas desde las 9 horas en adelante debido a la alta cantidad de células presentes por campo de visión, manteniendo así la precisión del conteo celular.

Para el conteo celular, se siguió la regla de incluir en el recuento a las células que toquen los bordes izquierdos y/o superiores, ignorando las células en contacto con los bordes derechos y/o inferiores. Se realizó el conteo tomando en cuenta los dieciséis cuadrados de cada esquina: suma de células contadas en los 16 cuadrados superior izquierda (SI), suma de células contadas en los 16 cuadrados superior derecha (SD), suma de células contadas en los 16 cuadrados inferior izquierda (II) y suma de células contadas en los 16 cuadrados inferior derecha (ID). El conteo se llevó a cabo utilizando un contador de células mecánico.

Para la determinación del número de células se utilizó la siguiente ecuación de acuerdo al protocolo de la cámara de Neubauer:

$$\text{Células/mL} = 1000 \times (\text{SI}/0,02 + \text{SD}/0,02 + \text{II}/0,02 + \text{ID}/0,02) / 4$$

2.4 Medición de amonio en el medio

Cada tres horas, 500 μL de cada cultivo se distribuyeron en tubos de ensayo, a los que se agregó 500 μL de tampón $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 100 mM, pH 7,0 para completar un volumen final de 1 mL. Se adicionó 1 mL de fenóxido de sodio 330 mM, 1 mL de nitroprusiato de sodio 0,01% p/v y 1 mL de hipoclorito de sodio (NaClO) 200 mM. Se incubó la reacción por diez minutos a 90°C y se procedió con la medición espectrofotométrica a una longitud de onda de 640 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 PharmaSpec UV-Vis. Debido a que la biomasa interfiere en la medición espectrofotométrica, se realizó una centrifugación o *spin* por 20 segundos a cada tubo, lo que permitió medir sin interferencias el NH_4^+ en el medio.

El NH_4^+ generado a partir de la degradación de los nitrilos (Fig. 1) puede ser cuantificado colorimétricamente realizando el ensayo de Berthelot (Searle, 1984) donde el fenóxido o fenolato de sodio reacciona con una molécula de NH_4^+ en presencia de un catalizador, en este caso nitroprusiato de sodio, formando un *p*-aminofenol, el cual reacciona con el hipoclorito de sodio formando un intermediario correspondiente a una quinona-imina halogenada, la cual vuelve a reaccionar con otra molécula de fenolato, completando la síntesis de un compuesto llamado indofenol. Dicho compuesto es de un característico color azul, el cual puede cuantificarse espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm.

Para determinar la concentración de NH_4^+ correspondiente a la absorbancia medida, se realizó una curva de calibración en triplicado donde se utilizó NH_4Cl a distintas concentraciones como fuente de NH_4^+ para la reacción.

2.5 Cultivo de *E. coli* y obtención de nitrilasa recombinante.

Para la sobreexpresión de la nitrilasa recombinante se utilizaron bacterias *E. coli* BL-21. Los cultivos bacterianos fueron realizados a 37°C y seleccionados con kanamicina en cinco medios distintos con el objetivo de estudiar el efecto sobre la actividad específica que tiene la forma en que se inducen las células.

Los medios utilizados fueron LBA – Luria-Bertani Autoinducido (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L), 2YTA – 2 x Extracto de Levadura-Triptona Autoinducido (triptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L), TBA – *Terrific Broth* Autoinducido (triptona 12 g/L, extracto de levadura 24 g/L), SBA – *Super Broth* Autoinducido (triptona 35 g/L, extracto de levadura 20 g/L), a los cuales se les adicionó a cada uno: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,3 g/L, KH_2HPO_4 6,8 g/L, Na_2HPO_4 7,1 g/L, glucosa 0,5 g/L, α -lactosa 2,0 g/L y MgSO_4 0,15 g/L. Estos medios son llamados autoinducidos o de autoinducción, los que buscan conseguir un crecimiento celular de alta densidad seguido de la inducción de la expresión de proteínas en la bacteria, sin la necesidad de la adición de un inductor como el IPTG. También se utilizó medio Luria-Bertani (LB, 10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, and 5 g/L extracto de levadura) para la inducción con IPTG.

Los cultivos fueron realizados a partir de un preinóculo de *E. coli* recombinante consistente en 300 μL de bacteria de un tubo criogénico, 30 mL de medio LB y 30 μL de kanamicina 30 mg/mL. El preinóculo se incubó a 37°C en un tubo falcon de 50 mL recostado en un *shaker* con agitación a 200 rpm hasta un $\text{OD}_{600} = 1,208$. La inoculación fue realizada en 100 mL de medio en matraces de 500 mL.

Para llevar inicialmente el cultivo a una $\text{OD}_{600} = 0,05$ en 100 mL se dividió el producto entre la OD_{600} inicial deseada y los 100 mL por la OD_{600} del preinóculo ($0,05 \times 100 / 1,208$) lo que indica que hay que utilizar 4,14 mL del preinóculo en los 100 mL de cada medio. Las células recombinantes se seleccionaron con 100 μL de kanamicina 30 mg/mL por matraz y se inocularon los 4,14 mL por medio. Los cultivos en medios autoinducidos se dejaron incubando por 20 horas a 37°C y agitación a 200 rpm, mientras que el cultivo en medio LB fue incubado a 37°C y agitación a 200 rpm hasta llegar a un $\text{OD}_{600} = 0,789$ (deseado: 0,6-0,8) lo que demoró aproximadamente 1,5-1,7 horas. Luego se procedió con la iducción de la enzima por IPTG (0,5 mM en matraz). Posterior a la inducción con IPTG se dejó incubar por 3 horas a 37°C y agitación a 200 rpm.

Los cultivos se traspasaron a tubos falcon de 50 mL y se centrifugaron a 10860 g en centrífuga Universal 320R, Hettich, por 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet de bacterias se resuspendió en 10 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

Para la lisis celular primero se observaron los cultivos por microscopía óptica para tener noción del estado y cantidad de los microorganismos, posteriormente se agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se incubó cada pellet resuspendido en tampón durante a 37°C por una hora para asegurar la hidrólisis del peptidoglicano de las paredes celulares. Se volvió a visualizar al microscopio y se procedió a sonicar utilizando un sonicador de vástago Branson 450 en dos ciclos de 2 minutos cada uno, con un *duty cycle* de 40 y *output* de 2. Se volvió a mirar al microscopio cada cultivo para verificar que aproximadamente un 90% de las bacterias estuvieran lisadas. Si el proceso no hubiese sido exitoso, se repiten ciclos de sonicación hasta lograr lisar las bacterias. Una vez lisadas las bacterias, se vuelve a centrifugar a 10860 g por 30 minutos pero esta vez se recupera el sobrenadante. El pellet corresponde a la fracción insoluble y se resuspende en 5 mL de úrea 8M para tratar de solubilizar los cuerpos de inclusión (CI). El sobrenadante por otro lado corresponde al extracto crudo (EC), el cual se alicuotó en varios tubos de 1,5 mL con el fin de evitar contaminaciones. Finalmente de los ~10 mL de extracto cudo se tomó 5 mL para realizar un *heat shock* a 90°C por 40 minutos para denaturar las proteínas que no sean termoestables como la nitrilasa recombinante, se volvió a centrifugar a 10860 g por 30 minutos, se recuperó el sobrenadante, fracción que corresponderá a la enzima purificada por *heatshock* (HS) y se descartó el pellet.

2.6 Purificación de nitrilasa endógena.

Se utilizaron 500 mL cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13 en condiciones anaeróbicas y crecido con benzonitrilo como sustrato, se repartieron en tubos falcon de 50 mL. Posteriormente se centrifugaron a 3420 g durante 40 minutos utilizando una centrífuga Hettich, Universal 320 R. Los precipitados se resuspendieron en un solo tubo falcon en 10 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Para el rompimiento celular se aplicó una técnica de frío-calor consistente en reposar las células en hielo durante 1 minuto y después reposarlas en agua hirviendo durante 1 minuto, repitiendo el procedimiento cinco veces. Posteriormente las células fueron incubadas con lisozima a una

concentración final de 1 mg/mL a 37°C por 1 hora con agitación a 120 rpm para asegurar que la distribución de la lisozima fuera homogénea.

Se analizó la cantidad y forma de las células para iniciar la lisis de ellas, utilizando un sonicador de vástago Branson 450 por 10 minutos, con ciclos de 2 minutos cada uno, un *duty cycle* de 40 y *output* de 2. Se volvió a mirar al microscopio para corroborar que aproximadamente un 90% de las células estuvieran lisadas y se centrifugó a 14000 g por 30 minutos en ultracentrífuga Hitachi CP80WX. Se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) junto a una alícuota de 1 mL de éste para posteriores análisis. El sobrenadante fue trasladado a una probeta para medir su volumen y después a un vaso precipitado donde se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta saturar la solución a un 55% (326 g/1000mL), se dejó en agitación hasta disolver a temperatura ambiente y después en agitación a 4°C en la cámara de frío durante 40 minutos para precipitar las proteínas.

La suspensión de proteínas se ultracentrifugó a 14000 g por 45 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 5 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + EDTA 1,0 mM + 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se guardó una alícuota de 1 mL para posteriores análisis.

Se determinó utilizar una columna de octil-sefarosa de flujo rápido de 1 mL GE Healthcare Life Sciences™ HiTrap™ de intercambio hidrofóbico, debido a la afinidad hidrofóbica de la nitrilasa (Dennet y Blamey, 2016). Se cargó la columna y se recolectó el flujo eluído (*pass through*) al cargar el extracto para asegurar la recuperación de la enzima en caso de que la nitrilasa no se hubiera mantenido unida a la columna. Una vez cargadas las proteínas del extracto unidas a la columna, se procedió a realizar la purificación mediante una gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se utilizó tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + EDTA 1.0 mM para la elución de proteínas con distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,5 M, 1,0 M, 0,8 M, 0,6 M, 0,4 M, 0,2 M, 0 M). Finalmente las fracciones se dializaron en bolsas de diálisis SnakeSkin™ sumergidas en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + EDTA 1,0 mM por 24 horas a 4°C, con un recambio de tampón a las 12 horas.

2.6.1 Determinación de concentración de proteínas

A todas las fracciones de proteína (recombinante y endógena) se les realizaron ensayos de Bradford para cuantificar la concentración de proteína (Bradford, 1976), pudiendo así calcular la actividad específica posteriormente y normalizar la carga de proteínas en el gel. El ensayo de Bradford se realizó en tubos de 1,5 mL separadamente para cada muestra, donde la mezcla de reacción fue 798,5 μL de H_2O , 200 μL de reactivo de Bradford y 1,5 μL de proteína, para el caso de la enzima recombinante. Para el caso de la enzima endógena se utilizaron 700 μL H_2O , 200 μL reactivo de Bradford y 100 μL de proteína. Se utilizó un mayor volumen para el caso de las fracciones proteicas correspondientes a la enzima endógena para mejorar la resolución del ensayo, la cual disminuye debido a la baja cantidad de proteína presente en las fracciones de la enzima endógena. Se dejó reaccionar por cinco minutos y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para realizar la curva de calibración se utilizaron estándares de diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino. Todas las mediciones fueron realizadas en triplicado.

2.6.2 SDS PAGE

Para el análisis de proteínas se utilizaron geles de poliacrilamida donde el gel separador fue preparado al 15%: 3,4 mL de H_2O , 7,5 mL de acrilamida al 30%, 3,8 mL Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,15 mL de SDS al 10%, 0,15 mL de persulfato de amonio al 10% y 0,006 mL de TEMED. Gel concentrador al 5%: 2,7 mL de H_2O , 0,67 mL acrilamida al 30%, 0,50 mL 1,0 M Tris-HCl pH 6,8, 0,04 mL de SDS al 10%, 0,04 mL persulfato de amonio al 10% y 0,004 mL de TEMED. Se utilizó un tampón de Tris-Glicina al 1X. Las muestras de proteínas a analizar se normalizaron a 10 μg de proteína por bolsillo y se mezclaron con tampón de carga de proteínas Pilot® Loading Dye de QIAGEN al 1X, posteriormente se procedió a desnaturar durante 5 minutos a 95°C. Para realizar la electroforesis se utilizó una cámara BioRad™ con tampón Tris-Glicina con SDS, al 1X. Finalmente la tinción de proteínas fue realizada con una solución de tinción 2,5 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 de Sigma-Aldrich, 450 mL de metanol,

100 mL de ácido acético glacial y 450 mL de H₂O. Se utilizó un marcador estándar de proteínas pre-teñido ColorBurst™ de Sigma-Aldrich.

2.7 Determinación de actividad enzimática

Para medir actividad nitrilasa se utilizó el ensayo de Berthelot, el cual mide colorimétricamente NH₄⁺ en el medio (ver punto 2.4). La mezcla de reacción consiste en nitrilo o cianuro inorgánico 15 mM final como sustrato, una cantidad de proteína en un rango de 10 a 25 µg y se lleva a 1 mL final con buffer *stock* K₂HPO₄/KH₂PO₄ 100 mM pH 7,0, EDTA 1 mM. Se incubó por 5 min a 90 °C. En este tiempo la enzima degrada el nitrilo y produce NH₄⁺ el cual se mide de la misma manera que en los cultivos de *Pyrococcus* sp. M24D13 (ver punto 2.4). La unidad de actividad enzimática se definió como micromoles de NH₄⁺ producidos por mililitro de solución por unidad de tiempo, U = µmol/mL x min. Mientras que la actividad específica se definió como unidades de actividad enzimática por miligramos de proteína o U/mg. Los controles utilizados en el ensayo enzimático corresponden a la mezcla de reacción con enzima pero sin sustrato y otra mezcla de reacción sin enzima pero con sustrato. El blanco utilizado fue la mezcla de reacción sin sustrato ni enzima.

Para comparar la degradación de los sustratos nitrilados orgánicos e inorgánicos se analizaron las concentraciones de NH₄⁺ generadas. La reacción que cataliza la nitrilasa se caracteriza por estar en razón estequiométrica 1:1, es decir por cada 1 mol de sustrato que reacciona se genera 1 mol de NH₄⁺. Por lo que los cálculos de actividad específica para las enzimas se realizaron de la siguiente forma: Primero para conocer la cantidad de NH₄⁺ libre en el medio se utilizó la ecuación de la curva de calibración: Concentración de NH₄⁺ = 679,65xAbs_{640nm} + 28,08. Donde Abs_{640nm} corresponde a la absorbancia medida a una longitud de onda de 640nm. Luego, la concentración de NH₄⁺ se dividió por la cantidad de minutos de incubación, la cual es 5. Por lo que se pudo conocer la actividad total U = Concentración de NH₄⁺/min. Para analizar la actividad específica se necesita conocer la cantidad de nitrilasa obtenida en las fracciones a analizar. Esto se logra interpretando los datos del ensayo de Bradford, en el cual se desarrolló la siguiente curva de calibración: mg proteína/mL =(Abs_{595nm}-

$0,0594) \times 666,7 / (0,044 \times 1000)$, donde Abs_{595nm} corresponde a la absorbancia medida a una longitud de onda de 595 nm. Los mg proteína/mL simplemente se multiplicaron por el volumen de fracción utilizado en el ensayo para conocer los miligramos totales de proteína.

La actividad específica es calculada dividiendo U por los mg de proteína. Mientras mayor actividad específica, mayor es la degradación de nitrilo por cada milígramo de proteína. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía utilizando el software Stata 16.

3. RESULTADOS

3.1 Crecimiento de cultivos de *Pyrococcus* sp. M24D13 con distintos nitrilos y cianuro inorgánico, como fuentes principales de nitrógeno.

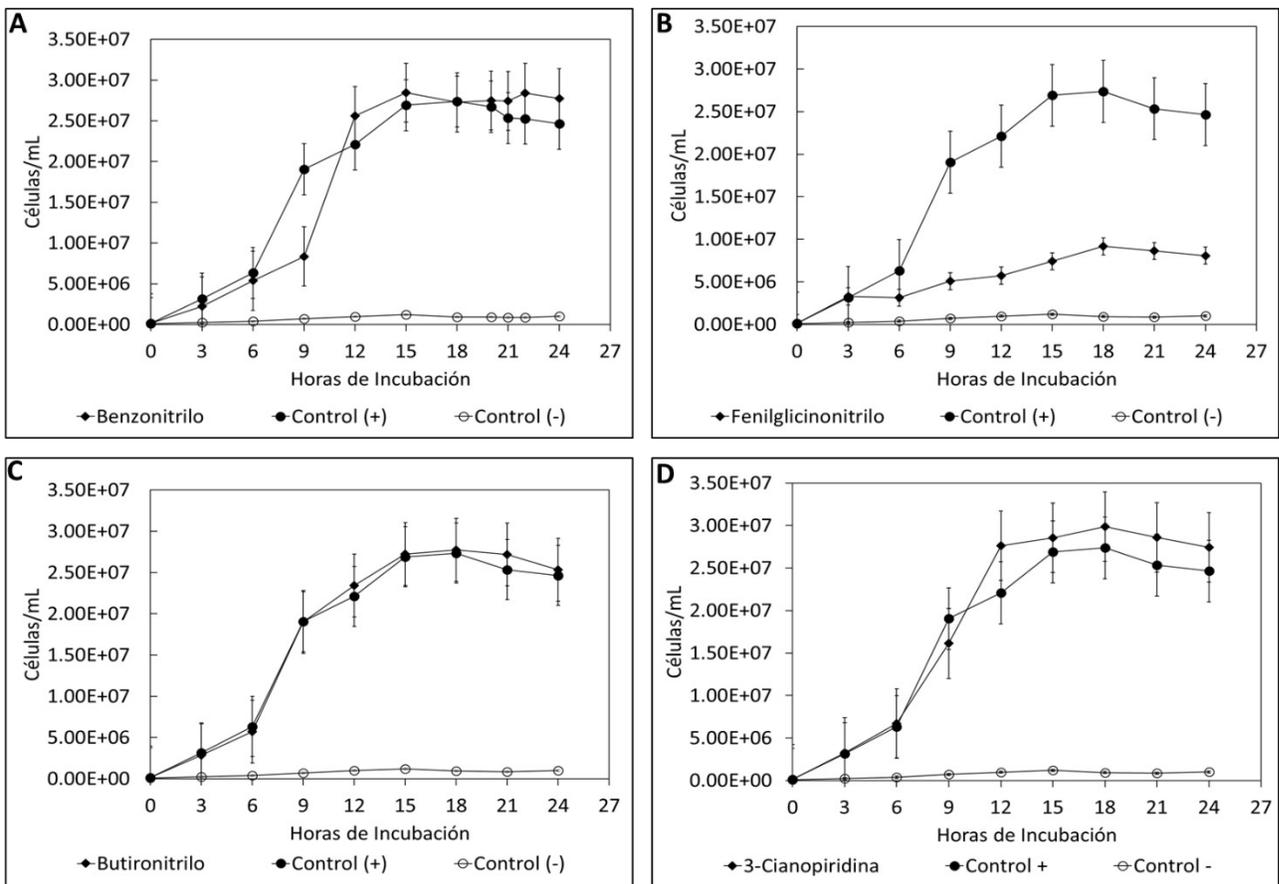
Previamente se reportó que la enzima nitrilasa de *Pyrococcus* sp. M24D13 posee actividad múltiple con respecto a distintos sustratos nitrilados (Dennet y Blamey, 2016). Sin embargo, no se investigó si este microorganismo puede crecer en presencia de estos cianuros orgánicos e inorgánicos y utilizarlos como fuente de nitrógeno.

Para estudiar esto se incubó *Pyrococcus* sp. M24D13 a 90°C durante 24 horas en presencia de distintos tipos de nitrilos: aromáticos (benzonitrilo), amino nitrilos (fenilglicinonitrilo), alifáticos (butironitrilo), heterocíclicos (3-cianopiridina) e inorgánicos (cianuro de potasio), todos a una concentración final de 1 mM. Como control positivo (C+) se utilizó un cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13 el cual se creció sin nitrilos y con NH₄Cl como principal fuente de nitrógeno mientras que como control negativo (C-) se utilizó un medio con sustrato nitrilado pero sin inocular. Cada tres horas se tomó alícuotas de cada cultivo para realizar conteos celulares directos utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico.

Pyrococcus sp. M24D13 mostró crecimiento con nitrilos aromáticos como principal fuente de nitrógeno, con una fase de menor crecimiento presente en las primeras 9 horas de incubación para el caso del cultivo con benzonitrilo (BzoCN) como fuente principal de nitrógeno (Fig. 2A). Para el cultivo con fenilglicinonitrilo como fuente principal de nitrógeno (FGCN) no se observó una fase de bajo crecimiento como en el caso de BzoCN. Para FGCN se observó una fase de mayor crecimiento lineal entre las 6 y 12 horas de incubación (Fig. 2B), mientras que para BzoCN se observó a partir de las 9 horas de incubación. Ambas condiciones presentaron finalmente una fase estacionaria después de las 15 horas. Esta fase estacionaria se extendió hasta al menos las 24 horas en BzoCN y FGCN. La curva de crecimiento de BzoCN presentó su fase de mayor crecimiento retrasada 3 horas con respecto a C+ pero se contó un máximo de células por mililitro de cultivo de $2,85 \times 10^7 \pm 1,51 \times 10^6$ a las 15 horas (Fig. 2A), mientras que para C+ se contó un máximo de $2,74 \times 10^7 \pm 1,12 \times 10^6$ células por

mililitro de cultivo a las 18 horas. Los máximos de células alcanzados por las dos condiciones fueron estadísticamente similares.

En el caso de FGCN su fase de mayor crecimiento se observó entre las 6 y 12 horas de igual manera que C+. El conteo máximo de células por mililitro de cultivo fue $9,17 \times 10^6 \pm 1,74 \times 10^6$, alcanzado a las 18 horas de incubación (Fig. 2B). Con fenilglicinonitrilo como fuente principal de nitrógeno, *Pyrococcus* sp. M24D13 creció aproximadamente un tercio del crecimiento máximo registrado para C+ y BzoCN, siendo el menor registrado entre todos los compuestos estudiados ($p < 0,05$).



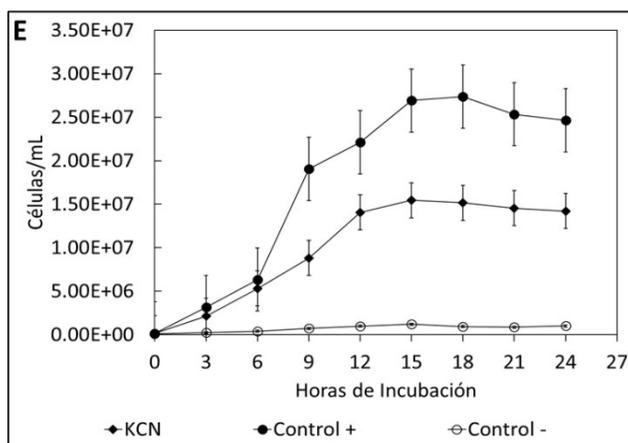


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 con distintos compuestos nitrilados como fuente principal de nitrógeno. (A) Concentración de células durante el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 con benzonitrilo como fuente principal de nitrógeno. (B) Fenilglicinonitrilo como fuente principal de nitrógeno. (C) Butironitrilo como fuente principal de nitrógeno. (D) 3-Cianopiridina como fuente principal de nitrógeno. (E) KCN como fuente principal de nitrógeno. El control positivo consiste en el cultivo suplementado con NH_4Cl sin compuestos nitrilados en el medio. El control negativo consiste en el medio sin inocular con el compuesto nitrilado en estudio.

El cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13 al ser incubado con butironitrilo como fuente principal de nitrógeno (ButCN) mostró un crecimiento casi idéntico al de C+. Con una misma fase mayor crecimiento entre las 6 y 12 horas de incubación y una posterior fase estacionaria (Fig. 2C). El máximo de células por mililitro de cultivo obtenido fue $2,77 \times 10^7 \pm 1,84 \times 10^6$, contado a las 18 horas de incubación (Fig. 2C).

La curva de crecimiento del cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13 con 3-Cianopiridina (3-Cp) como fuente principal de nitrógeno mantuvo la tendencia de las curvas citadas anteriormente. Con una fase de latencia o crecimiento lento hasta las 6 horas y una fase de crecimiento lineal entre las 6 y 12 horas de incubación. También se alcanzó el máximo de células contadas a las 18 horas de incubación, correspondiendo a $2,99 \times 10^7 \pm 2,15 \times 10^6$ células por mililitro de cultivo (Fig. 2D).

Para analizar el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 con cianuro inorgánico como fuente principal de nitrógeno se utilizó KCN. El comportamiento de la curva de crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 fue similar al observado en las curvas

confeccionadas con cianuros orgánicos como fuente principal de nitrógeno, con un crecimiento sostenido hasta las 12 horas de incubación y una posterior fase estacionaria. La fase de mayor crecimiento lineal que se observó entre las horas 6 y 12 de incubación en las curvas anteriormente presentadas fue menos prominente (Fig. 2E). Sin embargo, mantuvo la tendencia de que la mayor proliferación celular ocurriría en ese intervalo de tiempo. El máximo de células por mililitro contadas fue de $1,54 \times 10^7 \pm 1,84 \times 10^6$ a las 15 horas de incubación (Fig. 2E), el cual fue aproximadamente la mitad de los registrados para C+, Bzo, But y 3-Cp.

Como control adicional, se realizó cultivos con extracto de levadura como única fuente de nitrógeno disponible en el medio. Luego de 24 horas de incubación se contaron $1,57 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^5$ células por mililitro de cultivo. No se detectó NH_4^+ en estos cultivos.

Se observó un crecimiento marginal de *Pyrococcus* sp. M24D13 con extracto de levadura como única fuente de nitrógeno, indicando que el extracto de levadura por sí solo no es suficiente para proporcionar la fuente de nitrógeno necesaria para el crecimiento.

Pyrococcus sp. M24D13 fue capaz de crecer en presencia de todos los cianuros probados, orgánicos e inorgánicos. Se observó una concentración de células máxima de *Pyrococcus* sp. M24D13 igual o mayor con los cianuros orgánicos BzoCN, ButCN y 3-Cp que la registrada para el control positivo mientras que los crecimientos de estas tres condiciones son similares a los analizados para C+. En los cultivos FGCN y KCN, el crecimiento fue significativamente menor ($p < 0,05$), observándose en FGCN y KCN las menores concentraciones celulares máximas alcanzadas (Tabla 1). Cabe señalar que el comportamiento de sus curvas de crecimiento se mantuvo similar a el mostrado por C+.

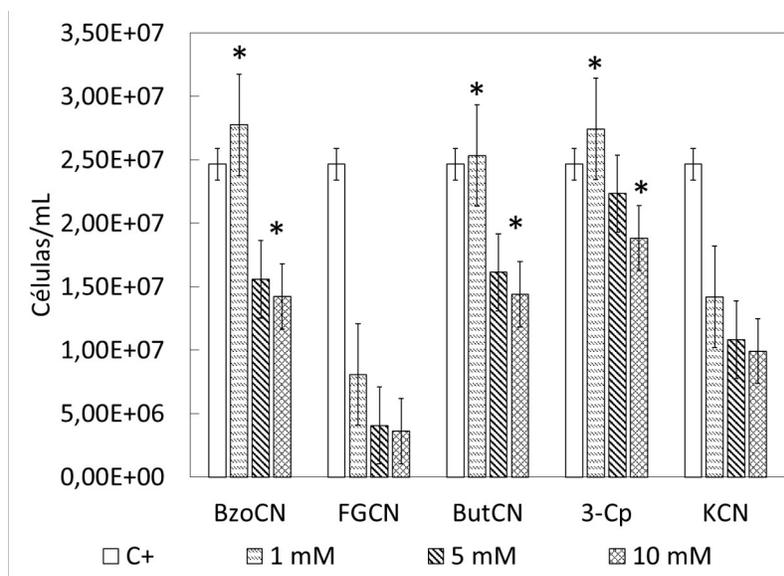
Tabla 1. Crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 con distintos nitrilos y cianuro inorgánico como fuente de nitrógeno. Análisis de curvas de crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 con distintos cianuros orgánicos e inorgánicos como fuente de nitrógeno.

Condición de Cultivo	Máxima Concentración de Células (Células/mL)
C+	$2,74 \times 10^7 \pm 1,12 \times 10^6$
BzoCN	$2,85 \times 10^7 \pm 1,51 \times 10^6$
FGCN	$9,17 \times 10^6 \pm 1,74 \times 10^6$
ButCN	$2,77 \times 10^7 \pm 1,84 \times 10^6$
3-Cp	$2,99 \times 10^7 \pm 2,15 \times 10^6$
KCN	$1,54 \times 10^7 \pm 1,84 \times 10^6$

C+: Control Positivo. BzoCN: Benzonitrilo. FGCN: Fenilglicinonitrilo. ButCN: Butironitrilo. 3-Cp: 3-Cianopiridina. KCN: Cianuro de Potasio.

Para estudiar las concentraciones de sustrato a las que existe una inhibición del crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13, se realizó cultivos con 5 mM y 10 mM finales de nitrilos y KCN, donde se midió la concentración de células después de 24 horas de incubación (Fig. 3).

Pyrococcus sp. M24D13 disminuyó su crecimiento con algunos incrementos de concentración con respecto a las condiciones con 1 mM de sustrato, como en el caso de BzoCN y ButCN, donde al incrementar la concentración del nitrilo a 5 mM, la concentración de células después de 24 horas de incubación disminuyó 1,8 veces y 1,5 veces, con respecto a la condición con 1 mM de nitrilo, respectivamente (Fig. 3).



C+: Control Positivo. BzoCN: Benzonitrilo. FGcN: Fenilglicinonitrilo. ButCN: Butironitrilo. 3-Cp: 3-Cianopiridina. KCN: Cianuro de Potasio.

Figura 3. Concentración de células de *Pyrococcus* sp. M24D13 después de 24 horas de incubación con distintas concentraciones de nitrilos y cianuro inorgánico. Análisis de inhibición de crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 aumentando la concentración final de los nitrilos y cianuro inorgánico. C+ corresponde a la concentración de células del control positivo después de 24 horas de incubación. (*) Indica donde existen diferencias significativas en cada sustrato analizado.

No se observó diferencias significativas entre las condiciones de 5 mM y 10 mM. Mientras que las diferencias de crecimiento después de 24 horas de incubación para los cultivos suplementados con concentraciones finales de 5 mM y 10 mM de FGcN, 3-Cp y KCN, no mostraron diferencias significativas, a excepción de la condición de 3-Cp 1 mM y 3-Cp 10 mM, donde en la condición con 3-Cp 10 mM la concentración de células disminuyó 1,46 veces con respecto a la condición con 3-Cp 1 mM (Fig. 3).

Ninguna de las concentraciones analizadas anuló el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13, aunque si se vió inhibido significativamente en algunas condiciones como con BzoCN 5 mM y 10 mM, con ButCN 5 mM y 10 mM y con 3-Cp 10 mM, con respecto a las condiciones con 1 mM de sustrato (Fig. 3).

3.2 Generación de NH_4^+ por *Pyrococcus* sp. M24D13 con distintos nitrilos y cianuro inorgánico, como fuentes principales de nitrógeno.

Como fue descrito previamente, *Pyrococcus* sp. M24D13 posee una nitrilasa con características únicas (Dennet y Blamey, 2016). Reportes previos indican que esta enzima posee una buena actividad con respecto a distintos nitrilos y KCN como sustrato (Dennet y Blamey, 2016). Sin embargo, hasta la fecha no se sabe si *Pyrococcus* sp. M24D13 puede degradar estos compuestos nitrilados o si el NH_4^+ generado a partir de la degradación de estos compuestos puede ser utilizado por el microorganismo como fuente principal de nitrógeno.

A las alícuotas extraídas cada tres horas durante el crecimiento con distintos nitrilos y cianuro inorgánico se les midió la concentración de NH_4^+ soluble en el medio mediante un ensayo de Berthelot modificado, inmediatamente posterior a su obtención.

El cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13 suplementado con NH_4Cl como fuente de nitrógeno (C+) inició a una concentración de NH_4^+ de $2,31 \pm 0,03$ mM. A partir de las tres horas de incubación, la concentración de NH_4^+ disminuyó sostenidamente hasta la última medición (Fig 4). En el caso de BzoCN, la concentración de NH_4^+ generada comenzó desde un nivel basal cercano a 0 mM y aumentó sostenidamente llegando hasta 1 mM a las 15 horas de incubación (Fig. 4A). Por otro lado, después de las 18 horas de incubación, se observó un aumento en la concentración de NH_4^+ a un máximo de $1,47 \pm 0,18$ mM con una posterior disminución a $0,78 \pm 0,01$ mM a las 24 horas de incubación (Fig. 4A). El control negativo comprobó que no hubo generación abiótica de NH_4^+ .

El comportamiento de la curva de concentración de NH_4^+ en los cultivos con FGCN fue similar al anteriormente presentado. Con la excepción de que la generación de NH_4^+ ocurrió significativamente después de las tres horas de incubación, llegando a una concentración de alrededor de $1,12 \pm 0,09$ mM a las seis horas de incubación, la cual se mantuvo alrededor de 1,2 mM durante las 24 horas de incubación con un máximo de $1,23 \pm 0,1$ mM a las 21 horas de incubación (Fig. 4B).

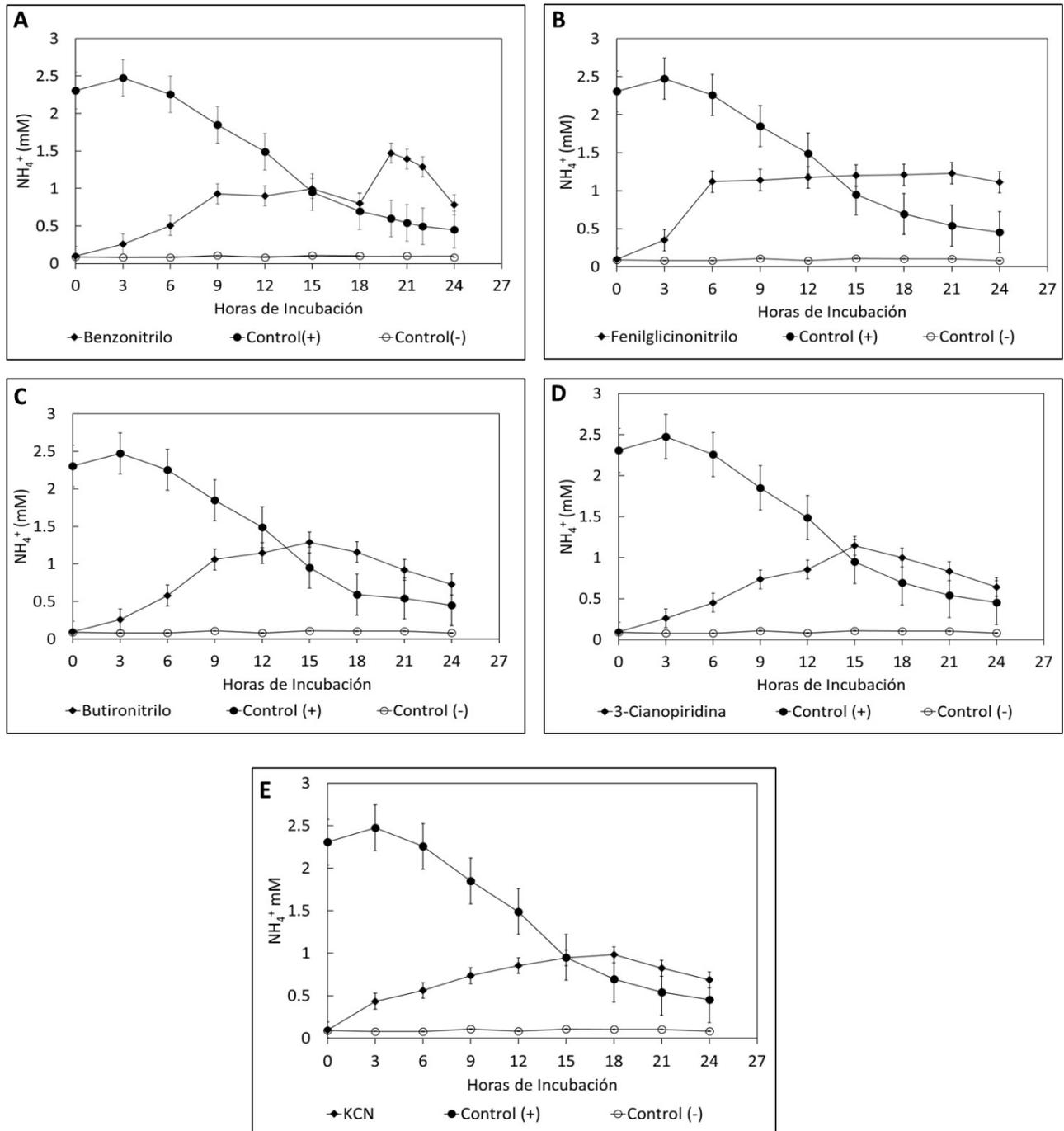


Figura 4. Concentración de amonio soluble en cultivos de *Pyrococcus* sp. M24D13 crecidos con distintos compuestos nitrilados como fuente principal de nitrógeno. (A) Concentración de amonio en el tiempo en cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13 suplementado con benzonitrilo como fuente principal de nitrógeno. (B) Fenilglicinonitrilo como fuente principal de nitrógeno. (C) Butironitrilo como fuente principal de nitrógeno. (D) 3-Cianopiridina como fuente principal de nitrógeno. (E) KCN como fuente principal de nitrógeno. El control positivo corresponde al medio inoculado en ausencia de compuestos nitrilados, suplementado con NH_4Cl como fuente principal

de nitrógeno. El control negativo corresponde al medio sin inocular en presencia del compuesto nitrilado en estudio.

En los cultivos ButCN se observó que la concentración de NH_4^+ presentó una tendencia similar a la observada en BzoCN durante las primeras 15 horas de incubación, con un aumento sostenido durante las primeras nueve horas. En este experimento, la concentración de NH_4^+ libre en el medio siguió aumentando hasta un máximo de $1,29 \pm 0,58$ mM, registrado a las 15 horas de incubación. Posteriormente y a diferencia de los resultados presentados con anterioridad, se observó una disminución de concentración de NH_4^+ hasta llegar a una concentración de NH_4^+ final de $0,73 \pm 0,2$ mM (Fig. 4C).

El perfil de generación de NH_4^+ en los cultivos 3-Cp (Fig. 4D) fue casi idéntico al registrado para los cultivos ButCN, con una concentración de NH_4^+ máxima registrada también a las 15 horas de incubación, en este caso de $1,14 \pm 0,25$ mM. Se observó el mismo tipo de disminución de concentración de NH_4^+ soluble en el medio después de las 15 horas de incubación.

Finalmente, para los cultivos con KCN se observó un comportamiento similar en la curva de concentración de NH_4^+ a los registrados en ButCN y 3-Cp, con la diferencia de que el aumento de NH_4^+ libre en el medio es menos pronunciado y continuó hasta las 18 horas de incubación, donde el máximo de concentración de NH_4^+ registrado fue $0,98 \pm 0,05$ mM (Fig. 4E). También se observó una posterior disminución de concentración de NH_4^+ inmediatamente después de alcanzar su máximo valor.

Pyrococcus sp. M24D13 generó NH_4^+ a partir de todos los sustratos nitrilados probados, mientras que la concentración de NH_4^+ en C+ disminuyó sostenidamente. Con excepción de BzoCN y FGCN, se observó una disminución de concentración de NH_4^+ después de alcanzado un máximo de NH_4^+ soluble en el medio.

A pesar de que el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13 en FGCN fue bajo en relación a los demás cultivos estudiados, alcanzó en menos tiempo concentraciones máximas de NH_4^+ con respecto a los demás sustratos nitrilados.

Pyrococcus sp. M24D13 no sólo fue capaz de crecer en presencia de estos nitrilos y cianuro inorgánico si no que además generó NH_4^+ durante su crecimiento.

3.3 Purificación de nitrilasa endógena.

La purificación de la nitrilasa endógena se realizó por gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizando una columna de intercambio hidrofóbico y posterior diálisis en frío. Se realizaron tres purificaciones. La cantidad de proteína obtenida nunca alcanzó un nivel suficiente para poder realizar los ensayos enzimáticos. En los análisis por SDS-PAGE no se observó bandas.

Debido al tiempo limitado y las restricciones propias de la situación sanitaria del país durante la cual se realizó este trabajo de investigación, se decidió utilizar los datos obtenidos por Dennet y Blamey (2016) en los análisis posteriores para la nitrilasa endógena.

3.4 Obtención de nitrilasa recombinante.

La purificación parcial de la nitrilasa recombinante se realizó mediante un tratamiento de calor (*heatshock*) a 90°C durante 40 minutos. Se alicuotó las fracciones de extracto crudo (Ec), la fracción insoluble o cuerpos de inclusión (CI) y la fracción purificada parcialmente por *heatshock* a 90°C (HS). El análisis por SDS-PAGE de estas fracciones reveló que se logró obtener la nitrilasa recombinante y que el proceso de purificación parcial por *heatshock* logró una notoria disminución de las bandas que no corresponden a la nitrilasa. Esta enzima apareció como una prominente banda en la zona de los 30 kDa (Fig. 5), lo que se corresponde con el peso estimado para su subunidad de $\sim 29,5$ kDa (Cabrera y Blamey, 2017).

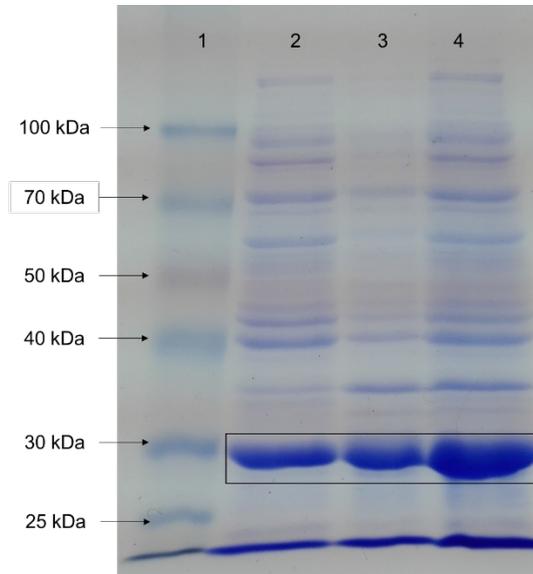


Figura 5. Análisis electroforético (SDS-PAGE, 15%) de nitrilasa recombinante. Carril 1: Estándar de peso molecular pre teñido ColorBurst™. Carril 2: Fracción de extracto crudo. Carril 3: Fracción purificada parcialmente por *heatshock*. Carril 4: Cuerpos de inclusión. El recuadro negro indica la banda correspondiente a la nitrilasa.

Por otro lado, el análisis de la purificación se realizó a partir de las fracciones Ec y HS analizadas electroforéticamente (Tabla 3). Se observó que a pesar de la disminución del rendimiento a un 63,6%, la nitrilasa recombinante se pudo purificar 2,52 veces sólo con el tratamiento de calor, aumentando la actividad específica detectada en la fracción Ec de 574 U/mg a 1444 U/mg en la fracción parcialmente purificada. Lo que indicó que el golpe de calor es una herramienta eficaz para realizar purificaciones parciales de enzimas termoestables para obtener material de trabajo de forma simplificada.

Tabla 2. Tabla de purificación parcial de nitrilasa recombinante. Datos obtenidos a partir del extracto crudo del cultivo de *E. coli* BL-21 con nitrilasa sobreexpresada. Unidad de actividad: U = $\mu\text{mol}/\text{mL} \times \text{min}$.

Fracción	Actividad Total (U)	Proteínas totales (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento (%)	N° de veces Purificación
Extracto Crudo (Ec)	14,18	0,025	574	100	1
Fracción purificada por <i>heatshock</i> (HS)	9,02	0,006	1444	63,6	2,52

3.5 Inducción de nitrilasa recombinante de *Pyrococcus* sp. M24D13 para biocatálisis de nitrilos y cianuro inorgánico.

Previamente se han descrito propiedades biocatalíticas de esta nitrilasa al ser inducida por IPTG (Cabrera y Blamey, 2017). Sin embargo, no se sabe si la expresión de esta nitrilasa puede ser inducida por medios de autoinducción. Debido a esto, se indujo la nitrilasa recombinante con distintos medios de autoinducción y se probó su potencial biocatalítico con distintos sustratos nitrilados, orgánicos e inorgánicos.

Los medios autoinducidos lograron producir un cantidad mucho mayor de proteína total que el medio inducido por IPTG, hasta diez veces más (Tabla 4). También se observó una alta cantidad de proteínas en la fracción insoluble mientras que en la fracción purificada parcialmente por *heatshock* se observó una menor cantidad, lo cual era esperable debido a la denaturación y precipitación de las proteínas no termoestables.

Tabla 3. Concentración de proteína obtenida en cada medio. Ec, extracto crudo. CI, cuerpos de inclusión. HS, purificación parcial vía heatshock.

Medio	Concentración de Proteína Ec (mg/mL)	Concentración de Proteína HS (mg/mL)	Concentración de Proteína CI (mg/mL)
LB+IPTG	1,24	0,31	4,76
LBA	7,0	2,2	6,64
TBA	11,84	4,74	10,13
2YTA	12,35	3,94	9,63
SBA	12,54	5,37	10,32

LB-IPTG: Luria-Bertani inducido por IPTG. LBA: Luria-Bertani Autoinducido. 2YTA: 2 x Extracto de Levadura – Triptona Autoinducido. TBA: *Terrific Broth* Autoinducido. SBA: *Super Broth* Autoinducido.

Debido a la alta cantidad de proteína obtenida en los medios autoinducidos con respecto a LB+IPTG, se decidió realizar ensayos enzimáticos para las fracciones obtenidas a partir de cada medio.

Si bien los medios autoinducidos mostraron que podrían ser una posibilidad para escalar una producción de nitrilasa recombinante en términos de miligramos de proteína que generaron, la actividad específica observada en todas las fracciones obtenidas a partir de ellos fue mucho menor en comparación a la actividad específica que presentaron las fracciones obtenidas a partir del medio LB+IPTG, en relación a todos los sustratos probados, con excepción de KCN (Tablas 5.1, 5.2, 5.3). En la fracción parcialmente purificada, el cianuro orgánico amino aromático fenilglicinonitrilo presentó la mayor actividad específica, casi 30 veces mayor que la actividad específica registrada para el resto de los compuestos, tendencia que se mantuvo en todas las fracciones, donde FGCN fue el sustrato preferido en todos los casos. Por otro lado, se observó que la nitrilasa recombinante no presentó actividad para KCN en ninguna de las fracciones, lo que había sido previamente reportado por Cabrera y Blamey (2017).

Tabla 4.1. Actividad específica de la fracción correspondiente al extracto crudo de la nitrilasa recombinante. Se presentan todos los nitrilos probados para cada medio. Unidad de actividad: U = $\mu\text{mol/mL} \times \text{min. mg}$ = miligramos de proteína.

Medio	Actividad Específica Ec - BzoCN (U/mg)	Actividad Específica Ec - FGcN (U/mg)	Actividad Específica Ec - ButCN (U/mg)	Actividad Específica Ec - 3-Cp (U/mg)	Actividad Específica Ec - KCN (U/mg)
LB+IPT G	574	9148	409	343	0
LBA	161	1596	187	131	0
2YTA	119	1030	132	86	0
TBA	133	1114	144	105	0
SBA	164	1061	181	132	0

Tabla 4.2. Actividad específica de la fracción parcialmente purificada por *heatshock* de la nitrilasa recombinante. Se presentan todos los nitrilos probados para cada medio. Unidad de actividad: U = $\mu\text{mol/mL} \times \text{min. mg}$ = miligramos de proteína.

Medio	Actividad Específica HS - BzoCN (U/mg)	Actividad Específica HS - FGcN (U/mg)	Actividad Específica HS - ButCN (U/mg)	Actividad Específica HS - 3-Cp (U/mg)	Actividad Específica HS - KCN (U/mg)
LB+IPT G	1444	33779	1205	1880	0
LBA	353	4015	409	581	0
2YTA	249	2329	250	388	0
TBA	242	1942	230	341	0
SBA	250	1674	255	457	0

Tabla 4.3. Actividad específica de la fracción insoluble o cuerpos de inclusión de la nitrilasa recombinante. Se presentan todos los nitrilos probados para cada medio. Unidad de actividad: U = $\mu\text{mol/mL} \times \text{min.}$ mg = miligramos de proteína.

Medio	Actividad Específica CI - BzoCN (U/mg)	Actividad Específica CI - FGcN (U/mg)	Actividad Específica CI - ButCN (U/mg)	Actividad Específica CI – 3-Cp (U/mg)	Actividad Específica CI - KCN (U/mg)
LB+IPTG	139	1372	98	106	0
LBA	166	956	108	94	0
2YTA	93	899	82	71	0
TBA	142	1013	95	97	0
SBA	181	981	104	102	0

LB-IPTG: Luria-Bertani inducido por IPTG. LBA: Luria-Bertani Autoinducido. 2YTA: 2 x Extracto de Levadura – Triptona Autoinducido. TBA: *Terrific Broth* Autoinducido. SBA: *Super Broth* Autoinducido.

3.6 Evaluación de la generación de NH_4^+ por *Pyrococcus* sp. M24D13 y su nitrilasa endógena y recombinante.

Como ha sido mencionado en secciones anteriores, el NH_4^+ es el único producto generado junto al ácido carboxílico correspondiente en la reacción catalizada por la nitrilasa (Fig. 1). La generación de 1 mol de NH_4^+ se encuentra en una razón estequiométrica 1:1 con respecto a la degradación de 1 mol de cianuro, orgánico o inorgánico. Para estudiar el potencial de biorremediación de *Pyrococcus* sp. M24D13 con respecto a nitrilos y cianuros inorgánicos, se decidió comparar la concentración de NH_4^+ máxima generada por el microorganismo con la concentración de NH_4^+ máxima generada por la nitrilasa endógena y recombinante. Los datos correspondientes a la nitrilasa endógena fueron recopilados de Dennet y Blamey (2016).

Se observó que la concentración de NH_4^+ máxima generada por *Pyrococcus* sp. M24D13 para todos los compuestos nitrilados estudiados fue mayor que la generada por ambas nitrilasas (Tabla 5). Para la nitrilasa recombinante, FGCN fue el sustrato que generó mayor concentración de NH_4^+ máxima y por minuto, mientras que para la nitrilasa endógena KCN junto a FGCN fueron los sustratos que generaron una mayor concentración de NH_4^+ máxima y por minuto. Sin embargo, se observó una dicotomía con respecto al cianuro inorgánico KCN entre la versión recombinante y endógena de la nitrilasa. La mayor generación de NH_4^+ en la nitrilasa endógena se observó con KCN, mientras que la enzima recombinante no tuvo actividad alguna con respecto a este sustrato. La versión recombinante de la nitrilasa estudiada corresponde a la obtenida a partir de LB+IPTG, que es la nitrilasa recombinante parcialmente purificada que presentó mejor actividad específica para todos los sustratos.

Tabla 5. Generación de NH_4^+ por *Pyrococcus* sp. M24D13, nitrilasa endógena y nitrilasa recombinante. Se presenta concentración de NH_4^+ máxima y la generación de NH_4^+ por minuto para cada nitrilo y cianuro inorgánico estudiado. La nitrilasa recombinante estudiada corresponde a la fracción parcialmente purificada a partir de cultivos inducidos por IPTG.

Nitrilo o Cianuro Inorgánico	<i>Pyrococcus</i> sp. M24D13 [NH_4^+] _{máx} μM	Enzima Recombinante [NH_4^+] _{máx} μM	Enzima Endógena* [NH_4^+] _{máx} μM	Enzima Recombinante [NH_4^+] $\mu\text{M}/\text{min}$	Enzima Endógena* [NH_4^+] $\mu\text{M}/\text{min}$
Benzonitrilo	1473	45,1	330,2	9,0	66
Butironitrilo	1179	43,7	399,8	8,7	80
3-Cianopiridina	1146	44,4	220,1	8,8	44
Fenilglicinonitrilo	1229	1054	860	210	172
KCN	983	0	895,5	0	179

(*): Los datos de correspondientes a la nitrilasa endógena fueron obtenidos

de Dennet y Blamey (2016).

Se pudo observar que la nitrilasa endógena presenta una mayor generación de NH_4^+ por minuto que la versión recombinante y se esperaba que este valor también fuera mayor que la concentración de NH_4^+ por minuto generada por *Pyrococcus* sp. M24D13. Sin embargo, el microorganismo alcanzó mayores concentraciones máximas de NH_4^+ para todos los sustratos en comparación a ambas versiones de la nitrilasa. Debido a esto, este microorganismo podría ser un candidato para futuras aplicaciones orientadas a la biorremediación de nitrilos y cianuros inorgánicos.

4. DISCUSIÓN

Como ha sido indicado con anterioridad, el hipertermófilo *Pyrococcus* sp. M24D13 fue aislado a partir de muestras submarinas de baja profundidad provenientes de Isla Decepción, Antártica (Dennet y Blamey, 2016). De acuerdo a lo que se ha investigado, hasta la fecha sólo un hipertermófilo ha sido aislado a partir de muestras hidrotermales Antárticas previo a *Pyrococcus* sp. M24D13. Este microorganismo también corresponde a una arquea, perteneciente al género *Thermococcus* y fue capaz de crecer a temperaturas de hasta 90°C (Amenábar *et al.* 2013). Estos estudios indican que podría existir una diversidad microbiana de microorganismos hipertermófilos en la Antártica. Estos microorganismos necesitarían de condiciones de cultivo específicas que se adapten a sus ambientes naturales extremos para ser aislados y cultivados.

El estudio de los metabolismos de estos microorganismos hipertermófilos puede desarrollar nuevos enfoques hacia horizontes científicos que han generado gran interés en la última década. Específicamente el desarrollo de alternativas verdes para la catálisis y síntesis de distintos productos de interés para la industria, donde se buscan enzimas termoactivas y termoestables capaces de biocatalizar distintas etapas de estos procesos (Gong *et al.* 2012); la descontaminación de distintas especies tóxicas utilizadas en o derivadas de procesos industriales que contaminan distintos ecosistemas, donde microorganismos termófilos e hipertermófilos son deseados en estrategias de biorremediación debido a su capacidad de crecer a altas temperaturas (Castro *et al.* 2019).

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Pyrococcus* sp. M24D13 y su nitrilasa, podrían ser herramientas de biocatálisis y biorremediación. Estos tópicos se discuten a continuación.

4.1 Condiciones de cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13

Cultivar microorganismos hipertermófilos no es tarea simple. El hecho de que su temperatura óptima de crecimiento se encuentre por sobre los 80°C significa manipular material y cultivos a altas temperaturas y es precisamente por esto que, debido a estas altas temperaturas, la gran mayoría de los microorganismos hipertermófilos son anaeróbicos estrictos o facultativos. La solubilidad del O₂ en agua disminuye con el aumento de la temperatura (Tromans, 1998), lo que permite el desarrollo de ambientes de temperaturas elevadas y anóxicos en la naturaleza. El O₂ es eliminado del medio en caliente utilizando un flujo de gas inerte como el N₂ y un agente reductor como el L-ascorbato de sodio. Para verificar la condición de anoxia se utiliza resazurina, el cual es un indicador que torna el medio de color rosado si hay presente condiciones oxidativas que permitan la existencia de O₂ en el medio (Twigg, 1945) .

Lograda la anaerobiosis, otra condición importante es la eliminación de fuentes de nitrógeno para forzar al microorganismo a utilizar los compuestos nitrilados como principal fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno que no se pudo remover del medio de cultivo fue el extracto de levadura ya que *Pyrococcus* sp. M24D13 no pudo crecer en ausencia de este componente. Sin embargo se pudo comprobar que el microorganismo mostró un crecimiento marginal sólo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno. A modo de referencia, la concentración de células al final de 24 horas de incubación fue de $1,57 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^5$ células por mililitro de cultivo en la condición con extracto de levadura como única fuente de nitrógeno, mientras que para el cultivo C+ se obtuvo una concentración celular de $3,16 \times 10^6 \pm 2,57 \times 10^5$ células por mililitro de cultivo en tan sólo las primeras 3 horas de incubación. Esto permite concluir que *Pyrococcus* sp. M24D13 necesita una fuente de nitrógeno adicional al extracto de levadura para crecer, sea proporcionada directamente como NH₄Cl o como nitrilos o cianuro inorgánico que necesitan ser metabolizados.

4.2 Nitrilos como fuente principal de nitrógeno.

La nitrilasa de *Pyrococcus* sp. M24D13 posee la particularidad de ser activa con una amplia gama de sustratos nitrilados *in vitro*, lo que no significa que el microorganismo pueda metabolizar dichos compuestos. Esto es relevante ya que en en biorremediación se utilizan principalmente microorganismos (sean exógenos – bioaumentación-, endógenos – bioestimulación - o una combinación de ambas estrategias). Esto debido a que las capacidades catalíticas de la enzima están limitadas por las concentraciones de saturación de ella. También, por ejemplo, se necesita diseñar matrices para inmovilizar la enzima, lo que exigiría una constante renovación de esta y haría este proceso inviable económicamente (Peixoto *et al.* 2011). Por otro lado, los microorganismos son deseados ya que pueden proliferar y mantener una población activa siempre y cuando las condiciones para su crecimiento se cumplan. Por lo que podrían utilizar el o los compuestos objetivos a descontaminar como sustrato para su crecimiento y mantenimiento, siendo una opción costo efectiva (Goswami *et al.* 2018). Debido a esto, es necesario saber cómo se comporta el microorganismo al enfrentarse a estos compuestos nitrilados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Pyrococcus* sp. M24D13 no sólo puede crecer en presencia de una amplia gama de cianuros orgánicos y KCN, sino que puede utilizarlos como fuente principal de nitrógeno para su crecimiento. El análisis de las curvas de crecimiento indica que *Pyrococcus* sp. M24D13 puede utilizar como fuente de nitrógeno principal aminonitrilos, nitrilos alifáticos, aromáticos, heterocíclicos y cianuros inorgánicos simples. Siendo el único microorganismo estudiado hasta ahora capaz de metabolizar una gama tan amplia de cianuros orgánicos y cianuro inorgánico simple con una alta actividad de la enzima nitrilasa. Cabe mencionar que si bien el crecimiento de los cultivos FGCN y KCN fue menor con respecto a los demás compuestos estudiados, la generación de NH_4^+ máxima indica que en ambos casos el nitrilo en cuestión podría estar siendo convertido a su respectivo ácido carboxílico. Esta disminución en el crecimiento del microorganismo para el caso de FGCN, puede deberse a que FGCN es una molécula tan compleja que podría tener problemas para ser asimilada por el microorganismo o que el ácido carboxílico derivado de este nitrilo

(el aminoácido no proteogénico fenilglicina) sea inhibitorio para el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13, lo que sería interesante debido a que la mayor actividad específica registrada para la nitrilasa endógena y recombinante de este microorganismo fue con FGCN como sustrato (junto a KCN en el caso de la nitrilasa endógena). Por otro lado, la inhibición del crecimiento en los cultivos con KCN probablemente no se debe a la dificultad en asimilación de la molécula y tampoco a una toxicidad asociada al ácido fórmico formado debido a que en *Pyrococcus*, el formato es parte del metabolismo del microorganismo. Por ejemplo, el formato es oxidado a CO₂ por una formato deshidrogenasa durante el proceso de fermentación (Michoud y Jebbar, 2016). Por lo que esta disminución en el crecimiento podría estar asociada a que CN⁻ puede reaccionar con el sulfuro o polisulfuros producidos por la aceptación de electrones de S⁰ durante el proceso de respiración anaeróbica de *Pyrococcus* sp. M24D13. Esto generaría el anión tiocianato SCN⁻ (Luthy y Bruce, 1979), por lo que el CN⁻ libre podría verse disminuído debido a la formación de este anión. Esto podría explicar también que la concentración de NH₄⁺ generada en el caso de los cultivos KCN fue menor que en todos los demás cultivos analizados (p<0,05), donde una parte del CN⁻ no sería degradado por la nitrilasa a ácido fórmico debido a que estaría en el medio en forma de SCN⁻. En condiciones experimentales se podría implementar la eliminación del sulfuro mediante difusión o una trampa de zinc, otra opción podría ser suplementar el medio con alguna sal de tiocianato como KSCN ya que la reacción donde se genera SCN⁻ es reversible, lo que debería inclinar el equilibrio de las especies hacia CN⁻ y así mantenerlo biodisponible en el medio para *Pyrococcus* sp. M24D13. Es importante notar que cálculos de tiempo generacional no fueron posibles debido a la ausencia de una fase exponencial en el crecimiento del microorganismo. Se generaron gráficos semilogarítmicos para localizar el crecimiento exponencial en la curva de crecimiento pero no se obtuvieron rectas donde se pudiera concluir la existencia de una fase exponencial. Esto puede haberse debido a que el crecimiento estuviera limitado por la concentración de alguno de los sustratos en el medio o a las dificultades asociadas al cultivo del microorganismo como las condiciones anóxicas o ausencia de agitación.

Por otro lado, la generación de NH_4^+ se observó en todos los cultivos. El control negativo indica que no existe una síntesis abiótica de NH_4^+ lo que confirma que el NH_4^+ que se midió en el medio sería debido a la actividad metabólica del microorganismo. El control positivo indicaría que el microorganismo asimila el NH_4^+ disponible en el medio a lo largo de su crecimiento. En los cultivos estudiados se observa una producción de NH_4^+ hasta alrededor de las 15 horas de incubación desde donde comienza a observarse una disminución en la concentración de NH_4^+ . Esto ocurriría debido a que *Pyrococcus* sp. M24D13 estaría asimilando el NH_4^+ que genera debido a la degradación de los nitrilos y cianuro inorgánico y utilizándolo como fuente de nitrógeno para su crecimiento. Y precisamente porque existe esta producción y consumo de NH_4^+ en simultáneo, es que el cálculo de tasas fijas de degradación de los compuestos asociada a la generación de NH_4^+ no es viable.

Para el caso de cianuros inorgánicos complejos se realizaron cultivos con el compuesto hexacianoferrato de potasio II trihidratado ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). No se realizaron curvas de crecimiento para los cultivos con este compuesto como fuente principal de nitrógeno puesto que *Pyrococcus* sp. M24D13 no mostró crecimiento significativo en 24 horas con este cianuro inorgánico y tampoco generó NH_4^+ durante este lapso de tiempo. Los grupos CN^- al estar acomplejados con un átomo de hierro adquieren una estabilidad estructural que les impediría estar biodisponible como nutriente para este microorganismo. Por esta razón este tipo de compuestos recalcitrantes son de toxicidad baja en comparación a cianuros simples o a compuestos cianometálicos disociables en ácidos débiles. Sin embargo, existe la posibilidad de que la exposición a radiación ultravioleta (Larsen y Trapp, 2006) o acidificación de los efluentes contaminados pudieran liberar los grupos CN^- acomplejados, causando la formación de HCN, compuesto altamente tóxico y volátil (Luque-Almagro *et al.* 2005). Se ha observado que bacterias del género *Pseudomonas* pueden utilizar algunos compuestos cianometálicos disociables en ácidos débiles como fuentes de nitrógeno (Rollinson *et al.* 1987). Por lo que sería interesante estudiar si *Pyrococcus* sp. M24D13 puede utilizar compuestos cianometálicos disociables en medios ácidos débiles como fuentes de nitrógeno, por ejemplo complejos cianometálicos de níquel, zinc, cobre o cadmio. Lo que ampliaría su espectro de posibles aplicaciones de biorremediación.

Por otro lado, estudios preliminares (resultados no disponibles) dan indicios de que *Pyrococcus* sp. M24D13 no sólo podría utilizar algunos de estos compuestos nitrilados como fuente de nitrógeno si no que también podría integrar a su metabolismo el correspondiente ácido carboxílico formado a partir de la degradación de ellos como fuente de carbono. En estos estudios preliminares se limitó la disponibilidad de carbono y nitrógeno en el medio, eliminando azúcares, extracto de levadura y NH_4Cl . Los cultivos fueron crecidos sólo con nitrilos como fuente principal de nitrógeno y carbono. *Pyrococcus* sp. M24D13 efectivamente fue capaz de crecer pero se observaron concentraciones de células aproximadamente 10 veces menor a las concentraciones de células obtenidas en los cultivos analizados en este trabajo de memoria, lo que podría deberse a que el carbono y/o nitrógeno obtenido a partir de los compuestos nitrilados fue menor al necesario por el microorganismo para crecer óptimamente, por lo que habría que elevar las concentraciones de nitrilos para así suplementar el carbono y nitrógeno removidos del medio inicialmente. Esto sería de gran importancia para la aplicación en biorremediación de *Pyrococcus* sp. M24D13 ya que desaparecería la necesidad de introducir fuentes de carbono externas para suplementar su crecimiento en aguas contaminadas con cianuros orgánicos o inorgánicos que se quisieran tratar.

4.3 Purificación de nitrilasa de *Pyrococcus* sp. M24D13

La capacidad de *Pyrococcus* sp. M24D13 de poder metabolizar compuestos nitrilados es debido a su enzima nitrilasa. Interesantemente, las nitrilasas descritas en arqueas hasta ahora – confinadas estrictamente al género *Pyrococcus* – son todas homodiméricas, con su monómero pesando alrededor de 30 kDa (Mueller *et al.* 2006, Fu *et al.* 2012, Dennet y Blamey, 2016). El análisis del gel obtenido muestra una banda prominente en la zona de 30 kDa la cual indica que la nitrilasa recombinante expresada en *E. coli* posee una subunidad de alrededor de 30 kDa. De acuerdo a la caracterización realizada por Cabrera y Blamey (2017), esta enzima sería un homodímero de alrededor de 60 kDa lo que se corrobora con la información del análisis electroforético SDS-PAGE. Esto indicaría que la purificación parcial de la nitrilasa

recombinante funciona para este tipo de estudios funcionales donde no se requiere caracterizar la enzima.

Purificar enzimas endógenas es siempre un desafío, más aún cuando estas pertenecen a extremófilos puesto que la razón miligramos enzima purificada/litros de cultivo es mucho más baja que la obtenida en la purificación de enzimas recombinantes. Esto se debe a que el crecimiento de los microorganismos extremófilos es en general mucho menor y más lento que el de *E. coli*, bacteria en la cual se expresa la mayoría de las extremozimas recombinantes. Para este trabajo se realizaron tres purificaciones de la nitrilasa endógena, de las cuales en ninguna se logró una cantidad de proteína suficiente para realizar los ensayos enzimáticos. Esto puede haberse debido a que el volumen inicial de cultivo de *Pyrococcus* sp. M24D13 (500 mL de cultivo) fue muy bajo en comparación a estudios previos donde se pudo purificar la enzima endógena (40 litros de cultivo, Dennet y Blamey (2016)), traducándose en una baja cantidad de enzima purificada.

Por otro lado, la membrana citoplasmática de las arqueas posee una cadena principal de 2,3-sn-glicerol-1-fosfato, enlaces etéricos y cadenas de hidrocarburos isoprenoides que la estabilizan y específicamente las arqueas hipertermófilas presentan cadenas aún más largas de hidrocarburos isoprenoides y modificaciones en sus cadenas laterales, lo que le provee termoestabilidad a la membrana (Imanaka, 2011). Estas características hacen que la lisis celular durante el proceso de purificación sea especialmente compleja, lo que pudo incidir en la deficiencia de las purificaciones realizadas. Se podría analizar la utilización de algún agente detergente no iónico para auxiliar en el proceso mecánico de lisis celular por ciclos de sonicación.

4.4 Posible rol de *Pyrococcus* sp. M24D13 y su nitrilasa en la biorremediación y biocatálisis de nitrilos y cianuros inorgánicos.

Para la utilización de microorganismos en biorremediación así como utilización de enzimas para biocatálisis, es necesario escalar su producción. Debido a esto, se debe sustituir la inducción por IPTG de la nitrilasa recombinante por otro método de

inducción ya que a la inducción por IPTG a gran escala es inviable debido a su elevado costo y citotoxicidad (Li, 2018). Para esto se estudiaron varios medios de autoinducción, los cuales han sido formulados para crecer cepas de expresión inducibles por IPTG. Estos poseen una cantidad limitada de glucosa, la cual es metabolizada preferentemente durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria y una vez agotada se comenzaría a metabolizar la lactosa del medio lo cual induciría la expresión de proteínas asociada al gen controlado por los promotores lac de la cepa inducible por IPTG. Esta diferencia metabólica de las fuentes de carbono del medio permitiría un crecimiento celular de alta densidad seguido de una inducción sin necesidad de utilizar inductores externos (Studier, 2005). El análisis de los resultados indica que si bien se obtiene una mayor concentración de proteínas totales en los medios de autoinducción – lo que era esperado - gran parte de esta masa proteica no correspondería a nitrilasa en fracción soluble. Todas las actividades específicas registradas para las nitrilasas autoinducidas son alrededor de cuatro veces menores que sus contrapartes inducidas por IPTG, a excepción de la fracción insoluble o CI, la cual posee similares actividades específicas independiente del medio utilizado para su obtención. Interesantemente, una alta cantidad de proteína obtenida corresponde a esta fracción, la cual con un tratamiento de calor a 90°C durante una hora aumentó la concentración de NH_4^+ generada en el ensayo enzimático alrededor de 7 a 8 veces (resultados preliminares, datos no disponibles). Esto abre las puertas para un estudio de optimización orientado a rescatar la nitrilasa de la fracción insoluble manteniendo la utilización de medios de autoinducción y así pudiendo escalar la producción de la enzima sin utilizar IPTG. Por otro lado, se podría explorar una alternativa genómica para mejorar la producción de la nitrilasa recombinante, como clonar el gen con su propio promotor.

La nitrilasa endógena de *Pyrococcus* sp. M24D13 posee la característica única de presentar actividad con KCN además de cianuros orgánicos. Lo que resalta aún más es la mayor actividad específica para KCN con respecto a otros sustratos nitrilados (Denet y Blamey, 2016), lo que significa que esta enzima podría no ser una nitrilasa con actividad cianidasa si no que una cianidasa o cianodihidratasa con actividad nitrilasa. Esta sería la única enzima con este tipo de actividad dual real elevada con

respecto a otras nitrilasas caracterizadas. Por otro lado, la enzima endógena podría no ser una enzima con actividad dual si no que dos enzimas –una nitrilasa y una cianodihidratasa- que podrían haber sido copurificadas.

Por otro lado, al comparar catalíticamente las versiones endógena y recombinante de la nitrilasa de *Pyrococcus* sp. M24D13, se observa que la nitrilasa recombinante si bien disminuye su actividad específica con respecto a la versión endógena, mantiene su versatilidad multisustrato mostrando una clara preferencia por FGCN para ambas nitrilasas. Sin embargo la versión recombinante de la enzima pierde completamente la capacidad de utilizar KCN como sustrato, lo que podría deberse a que la enzima podría no conservar los rasgos estructurales y ambiente de plegamiento que le permiten interactuar con KCN. También podría deberse, como se mencionó con anterioridad, a que la enzima recombinante podría corresponder a una de dos enzimas que fueron copurificadas, la cual sólo presenta actividad nitrilasa.

Es importante notar que en este trabajo no se midieron parámetros cinéticos por lo que las determinaciones de actividad enzimática no corresponden a estudios de eficiencia enzimática si no que se presentan como las etapas iniciales para un estudio de cinética enzimática futuro con los distintos sustratos nitrilados. En este contexto, sólo se pueden comparar las concentraciones de NH_4^+ máximas entre el microorganismo y las enzimas ya que los ensayos enzimáticos se realizaron a concentraciones de sustrato saturantes. Aún así, al comparar la actividad específica de la nitrilasa endógena – 3286.7 U/mg – y la actividad específica de la nitrilasa recombinante – 1444.3 U/mg - con la actividad específica de una contraparte comercial como es la nitrilasa producida por Sigma – 20.6 U/mg – con benzonitrilo como sustrato (Dennet, 2015), se observa un aumento de más de 100 veces en el caso de la nitrilasa endógena y alrededor de 70 veces en el caso de la nitrilasa recombinante lo que es promisorio para un futuro escalamiento de la nitrilasa de *Pyrococcus* sp. M24D13.

El análisis de los resultados revela que *Pyrococcus* sp M24D13 presenta el peor crecimiento con FGCN como sustrato pero es capaz de degradarlo, llegando a su pico de NH_4^+ más temprano que en los otros sustratos. Esto es consecuente con los resultados catalíticos obtenidos para las versiones endógena y recombinante de la

nitrilasa, siendo fenilglicinonitrilo el mejor sustrato para la enzima pero el peor para *Pyrococcus* sp. M24D13 desde un punto de vista metabólico.

Los ambientes anaeróbicos son prevalentes en la mayoría de aguas de desecho, aguas subterráneas contaminadas y lodos contaminados (Luque-Almagro *et al.* 2017), sin embargo, para una futura aplicación en biorremediación del microorganismo también es necesario tomar en cuenta la temperatura óptima de crecimiento de este *Pyrococcus*. Este parámetro podría ser cubierto si se utilizaran biorreactores que propicien las condiciones óptimas de temperatura de crecimiento para el microorganismo y dentro de estos biorreactores realizar el proceso de biorremediación de nitrilos y cianuro inorgánico.

Para obtener una mejor perspectiva del potencial real de biorremediación de este microorganismo sería necesario realizar estudios de cinética enzimática con respecto a los distintos compuestos nitrilados para conocer las tasas de degradación de estos compuestos y realizar estudios de crecimiento con concentraciones de sustrato que permitan graficar crecimientos exponenciales y no limitados por sustrato para así poder obtener datos de tiempos generacionales. En este trabajo no se pudieron realizar estos análisis debido al crecimiento limitado por sustrato observado y a la naturaleza dinámica del proceso de generación de NH_4^+ donde se observan dos componentes, uno de producción de NH_4^+ y otro de consumo de NH_4^+ , por lo que los gráficos están determinados por este balance y no se puede obtener una tasa de degradación de sustrato a partir del NH_4^+ generado. Se propone analizar la degradación de estos compuestos midiéndolos directamente utilizando un equipo de HPLC, estudiar parámetros cinéticos para cada sustrato y realizar un análisis más exhaustivo de la máxima concentración de sustrato nitrilado a la que se inhibe el crecimiento de *Pyrococcus* sp. M24D13. Esto debido a que de acuerdo a los resultados obtenidos, el microorganismo puede crecer con concentraciones finales de cada compuesto nitrilado hasta por lo menos 10 mM (Fig. 3). Es importante notar que no se realizaron curvas de crecimiento para estas concentraciones de cianuros orgánicos e inorgánicos, por lo que sería interesante desarrollarlas a concentraciones mayores para así tener una idea de que porcentaje del sustrato nitrilado total que es capaz de degradar *Pyrococcus* sp.

M24D13 y conocer las concentraciones de nitrilos y cianuro inorgánico a las que se inhibe el crecimiento completamente. Sumado a esto, se debería analizar la masa celular seca obtenida a partir de cada cultivo para saber exactamente cuantos gramos de células se necesitaría para biorremediar una determinada concentración de nitrilo o cianuro inorgánico y estudiar futuras aplicaciones en biorremediación con ensayos piloto sobre muestras reales, lo que esclarecería un potencial rol de *Pyrococcus* sp. M24D13 en la biorremediación de estos compuestos nitrilados.

5. CONCLUSIONES

- La arquea hipertermófila *Pyrococcus* sp. M24D13 es capaz utilizar el NH_4^+ generado a partir de la hidrólisis del grupo CN^- como fuente de nitrógeno para su crecimiento debido a la acción de su enzima nitrilasa.
- *Pyrococcus* sp. M24D13 y su enzima son altamente versátiles, siendo capaz de metabolizar diversos compuestos orgánicos e inorgánicos de cianuro.
- La actividad de la enzima no es siempre proporcional al crecimiento del microorganismo, lo que podría deberse a que los compuestos nitrilados degradados o los ácidos carboxílicos generados por la nitrilasa no necesariamente serían asimilados o metabolizados por *Pyrococcus* sp. M24D13.
- La versatilidad de este microorganismo lo sitúa como el único hipertermófilo capaz de degradar cianuros orgánicos e inorgánicos, por lo que *Pyrococcus* sp. M24D13 podría ser explorado como una futura herramienta biotecnológica para la biorremediación de nitrilos y especies simples de cianuro inorgánico.

REFERENCIAS

- Akcil A. (2003). Destruction of Cyanide in Gold Mill Effluents: Biological Versus Chemical Treatments. *Biotechnology Advances*. (6):501-11.
- Almatawah, Q. A. & Cowan, D. (1999). Thermostable Nitrilase Catalysed Production of Nicotinic Acid from 3-Cyanopyridine. *Enzyme and Microbial Technology*. 25, 718-724.
- Amenábar, M., Flores, P., Pugin, B., Boehmwald, F. & Blamey, J. (2013). Archaeal Diversity from Hydrothermal Systems of Deception Island, Antarctica. *Polar Biology*. 36, 3.
- Bandyopadhyay, A. K., Nagasawa, T., Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y. & Yamada, H. (1986). Purification and Characterization of Benzonitrilases from *Arthrobacter* sp. strain J-1. *Applied Environmental Microbiology*. 51, 302–306.
- Bapat, J. & Abhyankar, Y. (1984). Cyanide Poisoning Cattle due to Feeding of Sorghum. *Indian Journal of Animal Sciences*. 54(6), 577-578.
- Barbier, G., Godfroy, A., Meunier, J., Querellou, J., Cambon, M., Lesongeur, F., Grimont, P. & Raguénès, G. (1999). *Pyrococcus glycovorans* sp. nov., A Hyperthermophilic Archaeon Isolated from the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49(4), 1829-1837 .
- Bartel, B. & Fink, G. R. (1994). Differential Regulation of an Auxin-producing Nitrilase Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(14), 6649–6653.
- Basile, L. J., Willson, R. C., Sewell, B. T. & Benedik, M. J. (2008). Genome Mining of Cyanide-degrading Nitrilases from Filamentous Fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80, 427.
- Baxter, J. & Cummings S. P. (2006). The Current and Future Applications of Microorganism in the Bioremediation of Cyanide Contamination. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 90(1), 1-17.

- Bestwick, L. A., Gronning, L. M., James, D. C., Bones, A. & Rossiter, J. T. (1993). Purification and Characterization of a Nitrilase from *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*. 89(4), 811–816.
- Bhalla, T. C., Sharma, N. & Bhatia R. K. (2011). Microbial Degradation of Cyanides and Nitriles. In: *Microorganisms in Environmental Management*. 569-587.
- Bhalla, T. C., Kumar, V., Kumar, V., Thakur, N. & Savitri. (2018). Nitrile Metabolizing Enzymes in Biocatalysis and Biotransformation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 185(4), 925–946.
- Birrien, J., Zeng, X., Jebbar, M., Cambon-Bonavita, M., Querellou, J., Oger, P., Biennu, N., Xiao, X. & Prieur, D. (2011). *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., An Obligatory Piezophilic Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Deep-sea Hydrothermal Vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61(12), 2827-2831.
- Blamey, J. M. & Adams, M. W. W. (1993). Purification and Characterization of Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1161(1), 19–27.
- Blamey, J. M., Chiong, M., López, C. & Smith, E. T. (2000). Purification and Characterization of Ferredoxin from the Hyperthermophilic *Pyrococcus woesei*. *Anaerobe*. 6(5), 285–290.
- Bouari, A., Begum, S. & Egiebor, N. (2013). Bioremediation of Complex Cyanide Contaminated Wastewater Using *Pseudomonas Fluorescens* Pf-5. *International Journal of Engineering Research and Technology*. 2, 9
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brenner, C. (2002). Catalysis in the Nitrilase Superfamily. *Current Opinion in Structural Biology*. 12(6), 775–782.

Cabrera, M. & Blamey, J. (2017). Cloning, Overexpression, and Characterization of a Thermostable Nitrilase from an Antarctic *Pyrococcus* sp. *Extremophiles*. 21, 861–869.

Cáceres-Moreno, P., Muñoz-Ibacache, S., Monsalves, M., Amenabar, M. & Blamey, J. (2019). Functional Approach for the Development and Production of Novel Extreme Biocatalysts. In: *Next Generation Biomanufacturing Technologies*. 1-22. American Chemical Society.

Castric, P. A. & Strobel, G. A. (1969). Cyanide Metabolism by *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*. 244(15), 4089-4094.

Castro, C., Urbieto, M. S., Plaza J. & Donati E. R. (2019). Metal Biorecovery and Bioremediation: Whether or not Thermophilic are Better than Mesophilic Microorganisms. *Bioresource Technology*. 279, 317-326.

Chhiba-Govindjee, V. P., van der Westhuyzen, C. W., Bode, M. L. & Brady, D. (2019). Bacterial Nitrilases and Their Regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(12), 4679–4692.

Dash, R. R., Gaur, A. & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in Industrial Wastewaters and Its Removal: A Review on Biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*. 163(1), 1–11.

Dennet, G. (2015). Purificación y Caracterización de una Nitrilasa Termoestable de un Microorganismo Hipertermófilo Antártico. *Tesis para Optar al Grado de Doctor en Biotecnología*. Universidad de Santiago de Chile.

Dennet, G. & Blamey, J. (2016). A New Thermophilic Nitrilase from an Antarctic Hyperthermophilic Microorganism. *Frontiers in Bioengineering & Biotechnology*. 4, 5.

Dick, G. (2019). The Microbiomes of Deep-sea Hydrothermal Bents: Distributed Globally, Shaped Locally. *Nature Reviews Microbiology*. 17, 271-283.

Dicosimo, R., Foo, T., Payne M. S., Panova, A., O'Keefe D. P., Thompson, J., Gallagher, F. G. & Li, X. (2006). Process for Producing Glycolic Acid from Formaldehyde and Hydrogen Cyanide. *European Patent EP1828393B1*. European Patent Office.

Dohmoto, M., Tsunoda, H., Isaji, G., Chiba, R. & Yamaguchi, K. (2000). Genes Encoding Nitrilase-like Proteins from Tobacco. *DNA Research*. 7(5), 283–289.

Donato, D., Nichols, O., Possingham, H., Moore, M., Ricci, P. & Nollera, B. (2007). A Critical Review of the Effects of Gold Cyanide-bearing Tailings Solutions on Wildlife. *Environment International*. 33(7), 974-984.

Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A. & Zeikus, J. G. (1997). Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding Extracellular Alpha-Amylase from *Pyrococcus furiosus* and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9), 3569–3576.

Erauso, G., Reysenbach, A., Godfroy, A., Meunier, J., Crump, B., Partensky, F., Baross, J., Marteinsson, V., Barbier, G., Pace, N. & Prieur, D. (2004). *Pyrococcus abyssi* sp. nov., A New Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Deep-sea Hydrothermal Vent. *Archives of Microbiology*. 160, 338-349.

Fiala, G. & Stetter, K. O. (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. Represents a Novel Genus of Marine Heterotrophic Archaeobacteria Growing Optimally at 100°C. *Archives of Microbiology*. 145(1), 56–61.

Flores, P.A., Amenábar, M.J. & Blamey, J. (2013). Hot Environments from Antarctica: Source of Thermophiles and Hyperthermophiles, with Potential Biotechnological Applications. In: *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. 99-118.

Fu, L., Li, X., Xiao, X. & Xu, J. (2014). Purification and Characterization of a Thermostable Aliphatic Amidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus yayanosii* CH1. *Extremophiles*. 18, 429-440.

Gong, J. S., Shi, J. S., Lu, Z. M., Li, H., Zhou, Z. M. & Xu, Z. H. (2015). Nitrile-Converting Enzymes as a Tool to Improve Biocatalysis in Organic Synthesis: Recent Insights and Promises. *Critical Reviews in Biotechnology*. 37(1), 69–81.

- Gong, J. S., Lu, Z. M., Li, H., Shi, J. S., Zhou, Z. M. & Xu, Z. H. (2012). Nitrilases in Nitrile Biocatalysis: Recent Progress and Forthcoming Research. *Microbial Cell Factories*. 11(1), 142.
- Gonzalez, J., Masuchi, Y., Robb, F., Ammerman, J., Maeder, D., Yanagibayashi, M., Tamaoka, J. & Kato, C. (1998). *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., A Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Hydrothermal Vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles*. 2, 123-130.
- Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S. & Tribedi, P. (2018). Bioaugmentation and Biostimulation: A Potential Strategy for Environmental Remediation. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 6(5), 223-231.
- Gupta, N., Balomajumder, C. & Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic Mechanism and Biochemistry for Cyanide Degradation: A Review. *Journal of Hazardous Materials*. 176(1–3), 1–13.
- Howden, A. J. M. & Preston, G. M. (2009). Nitrilase Enzymes and Their Role in Plant-Microbe Interactions. *Microbial Biotechnology*. 2(4), 441–451.
- Ingvorsen, K., Yde, B., Godtfredsen, S. E. & Tsuchiya, R. T. (1988). Microbial Hydrolysis of Organic Nitriles and Amides. *Ciba Foundation Symposium*. 140, 16-31.
- Jandhyala, D. M., Willson, R. C., Sewell, B. T. & Benedik, M. J. (2005). Comparison of Cyanide-Degrading Nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68(3), 327–335.
- Kao, C. M., Liu, J. K., Lou, H. R., Lin C. S. & Chen S. C. (2003). Biotransformation of Cyanide to Methane and Ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*. 50(8), 1055-1061.
- Kaplan, O., Veselá, A. B., Petříčková, A., Pasquarelli, F., Pičmanová, M., Rinágelová, A., Bhalla, T. C., Pátek, M. & Martínková, L. (2013). A Comparative Study of Nitrilases Identified by Genome Mining. *Molecular Biotechnology*. 54(3), 996–1003.
- Larsen, M. & Trapp, S. (2006). Uptake of Iron Cyanide Complexes into Willow Trees. *Environmental Science & Technology*. 40(6), 1956-1961 .

Layh, N., Parratt, J. & Willets, A. (1998). Characterization and Partial Purification of an Enantioselective Arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 5(5–6), 467-474.

Legrain, C., Demarez, M., Glansdorff, N. & Piérard, A. (1995). Ammonia-dependent synthesis and metabolic channeling of carbamoyl phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Microbiology*. 141(5), 1093-1099.

Li, X. (2018). Bioengineering of FGFs and New Drug Developments. *Fibroblast Growth Factors*, 531.

Logsdon, M., Hagelstein, K. & Mudder, T. (1999). The management of cyanide in the gold extraction. *International Council On Metals And The Environment* (April 1999).

Luque-Almagro, V. M., Huertas, M., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M., Garcia-Gil, L. J., Castillo, F. & Blasco, R. (2005). Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 940 - 947.

Luque-Almagro, V. M., Cabello, P., Sáez, L. P., Olaya-Abril, A., Moreno-Vivián, C. & Roldán, M. (2017). Exploring Anaerobic Environments for Cyanide and Cyano-derivatives Microbial Degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102, 1067 - 1074.

Luthy, R. & Bruce, S.G. (1979). Kinetics of Reaction of Cyanide and Reduced Sulfur Species in Aqueous Solution. *Environmental Science & Technology*. 13, 1481-1487.

Ma, K. & Adams, M. W. (1994). Sulfide Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: A New Multifunctional Enzyme Involved in the Reduction of Elemental Sulfur. *Journal of Bacteriology*. 176(21), 6509–6517.

Martínková, L. (2019). Nitrile Metabolism in Fungi: A Review of Its Key Enzymes Nitrilases with Focus on Their Biotechnological Impact. *Fungal Biology Reviews*. 33(2), 149–157.

Martínková, L. & Křen, V. (2010). Biotransformations with Nitrilases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 14(2), 130–137.

- Martínková, L., Rucká, L., Nešvera, J. & Pátek, M. (2017). Recent Advances and Challenges in the Heterologous Production of Microbial Nitrilases for Biocatalytic Applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 33, 8.
- Martínková, L., Veselá, A. B., Rinágelová, A. & Chmátal, M. (2015). Cyanide Hydratases and Cyanide Dihydratases: Emerging Tools in the Biodegradation and Biodetection of Cyanide. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(21), 8875–8882.
- Materassi, R., Balloni, W. & Florenzano, G. (1977). Cyanide Reduction by Nitrogenase in Intact Cells of *Rhodopseudomonas gelatinosa* Molisch. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 132(5-6), 413-417.
- Merino, N., Aronson, H., Bojanova, D., Feyhl-Buska, J., Wong, M., Zhang, S. & Giovanelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology*. 10, 780.
- Meyers, P. R., Rawlings, D. E., Woods D. R. & Lindsey. G. G. (1993). Isolation and Characterization of a Cyanide Dihydratase for *Bacillus pumilus* C1. *Journal of Bacteriology* 175, 6105–6112.
- Michoud, G. & Jebbar, M. (2016). High Hydrostatic Pressure Adaptive Strategies in an Obligate Piezophile *Pyrococcus yayanosii*. *Scientific Reports*. 6.
- Mueller, P., Egorova, K., Vorgias, C. E., Boutou, E., Trauthwein, H., Verseck, S. & Antranikian, G. (2006). Cloning, Overexpression, and Characterization of a Thermoactive Nitrilase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Protein Expression and Purification*. 47(2), 672–681.
- Nagashima, S. (1984). Simultaneous Reaction Rate Spectrophotometric Determination of Cyanide and Thiocyanate by Use of the Pyridine-barbituric Acid Method. *Analytical Chemistry*. 56, 1944-1947.
- Nigam, V., Arfi, T., Kumar, V. & Shukla P. (2017). Bioengineering of Nitrilases Towards Its Use as Green Catalyst: Applications and Perspectives. *Indian Journal of Microbiology*. 57(2), 131-138.

- Nishise, H., Kurihara, M. & Tani, Y. (1987). Microbial Synthesis of a Tranexamic Acid Intermediate from Dinitrile. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51, 2613-2616.
- Nolan, L. M., Harnedy, P. A., Turner, P., Hearne, A. B. & O'Reilly, C. (2003). The Cyanide Hydratase Enzyme of *Fusarium lateritium* also has Nitrilase Activity. *FEMS Microbiology Letters*. 221(2), 161–165.
- Oró, J., Araujo, L. & Eusebio, A. (1981). The Role of HCN and its Derivatives in Prebiotic Evolution. *Cyanide in Biology*. Academic Press London.
- Pace, H. C. & Brenner, C. (2001). The Nitrilase Superfamily: Classification, Structure and Function. *Genome Biology*. 2(1), reviews0001.1.
- Park, W. J., Kriechbaumer, V., Müller, A., Piotrowski, M., Meeley, R. B., Gierl, A. & Glawischnig, E. (2003). The Nitrilase ZmNIT2 Converts Indole-3-Acetonitrile to Indole-3-Acetic Acid. *Plant Physiology*. 133(2), 794–802.
- Peak, M. J., Peak, J. G., Stevens, F. J., Blamey, J., Mai, X., Zhou, Z. H. & Adams, M. W. W. (1993). Characterization of the Glycolytic Enzyme Enolase Which Is Abundant in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*. United States.
- Peixoto, R., Vermelho, A.B. & Rosado, A. (2011). Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. *Enzyme Research*.
- Pekarsky, Y., Campiglio, M., Siprashvili, Z., Druck, T., Sedkov, Y., Tillib, S., Draganescu, A., Wermuth, P., Rothman, J., Huebner, K., Buchberg, A., Mazo, A., Brenner, C. & Croce, C. (1998). Nitrilase and Fhit Homologs are Encoded as Fusion Proteins in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(15), 8744-8749.
- Piotrowski, M. (2008). Primary or Secondary? Versatile Nitrilases in Plant Metabolism. *Phytochemistry*. 69(15), 2655-2667.
- Porter, N. & Knowles, C. J. (1979). Cyanide-resistant Growth in *Citrobacter Freundii* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Letters*. 5(5) 323–326.

Rampelotto, P. (2013). Extremophiles and Extreme Environments. *Life (Basel)*. 3(3), 482-485.

Rathinam N. & Sani R. (2018). Bioprospecting of Extremophiles for Biotechnology Applications. *Extremophilic Microbial Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Biofuels, Value-Added Products, and Usable Power*. Springer, Cham 1-23.

Razanamahandry, L., Karoui, H., Andrianisa, H. & Yacouba, H. (2017). Bioremediation of Soil and Water Polluted by Cyanide: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 11(6), 272-291.

Rollinson, G., Jones, R., Meadows M. P., Harris, R. E. & Knowles, C. J. (1987). The Growth of a Cyanide-utilising Strain of *Pseudomonas fluorescens* in Liquid Culture on Nickel Cyanide as a Source of Nitrogen. *FEMS Microbiology Letters*. 40, 199–205.

Rushdi, A. & Simoneit, B. (2004). Condensation Reactions and Formation of Amides, Esters, and Nitriles Under Hydrothermal Conditions. *Astrobiology*. 4(2), 211-224 .

Schäfer, T. & Schönheit, P. (1992). Maltose Fermentation to Acetate, CO₂ and H₂ in the Anaerobic Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: Evidence for the Operation of a Novel Sugar Fermentation Pathway. *Archives of Microbiology*. 158, 188–202.

Searle P. (1984). The Berthelot or Indophenol Reaction and Its Use in the Analytical Chemistry of Nitrogen. *Analyst*. 109

Shen, T., Wu, Q. & Yan Xu (2021). Biodegradation of Cyanide with *Saccharomyces cerevisiae* in Baijiu Fermentation. *Food Control*. 127.

Shete, H. G. & Kapdnis, B. P. (2012). Production and Characterization of Cyanide Hydratase from *Micromonospora braunna*. *Universal Journal of Environmental Research & Technology* . 2(6), 609-615.

Singh, R., Sharma R., Tewari, N., Geetanjali D. & Rawat, S. (2006). Nitrilase and Its Application as a 'Green' Catalyst. *Chemistry and Biodiversity*. 3, 1279-1287.

- Silva, P. J., van den Ban, E. C. D., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F. T. & Hagen, W. R. (2000). Enzymes of Hydrogen Metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry*. 267(22), 6541–6551.
- Stetter, K. O. & Huber, H. (2015). *Pyrococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–5.
- Stetter, K.O. (1996). Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 18, 149-158.
- Stetter, K. O. & Huber, H. (2015). *Pyrococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–5.
- Straka, R. P. & Stokes, J. L. Psychrophilic Bacteria from Antarctica. *Journal of Bacteriology*. 80(5), 622-625.
- Studier, F. W. (2005). Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234.
- Tanii, H. & Hashimoto, K. (1984). Studies on the Mechanism of Acute Toxicity of Nitriles in Mice. *Archives of Toxicology*. 55(1), 47-54.
- Thimann, K. V. & Mahadevan, S. (1964). Nitrilase: I. Occurrence, Preparation, and General Properties of the Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 105(1), 133–141.
- Tromans, D. (1998). Temperature and Pressure Dependent Solubility of Oxygen in Water: A Thermodynamic Analysis. *Hydrometallurgy*. 48, 327-342.
- Twigg, R. S. (1945). Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. *Nature*. 155, 401-402.
- Veselá, A. B., Petříčková, A., Weyrauch, P. & Martínková, L. (2013). Heterologous Expression, Purification and Characterization of Arylacetonitrilases from *Nectria haematococca* and *Arthroderma benhamiae*. *Biocatalysis and Biotransformation*. 31(1), 49–5
- Vogel, S., Sultan, T. & Ten Eyck, R. (1981). Cyanide Poisoning. *Clinical Toxicology*. 18(3), 367-383.

Woodward, J.D., Trompetter, I., Sewell, B.T. & Piotrowski, M. (2018). Substrate Specificity of Plant Nitrilase Complexes is Affected by their Helical Twist. *Communications Biology*. 1, 186.

Wyatt, J. M. & Knowles, C. (1995). Microbial Degradation of Acrylonitrile Waste Effluents: The Degradation of Effluents and Condensates from the Manufacture of Acrylonitrile. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 35, 227-248.

Zillig, W., Holz, I., Klenk, H., Trent, J., Wunderl, S., Janekovic, D., Imse, E. & Haas, B. (1987). *Pyrococcus woesei*, sp. nov., An Ultra-thermophilic Marine Archaeobacterium, Representing a Novel Order, Thermococcales. *Systematic and Applied Microbiology*. 9, 62-70.