



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la biodegradación de poliuretano por hongos filamentosos e identificación de la enzima extracelular responsable

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Joyce Álvarez Barragán

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Herminia Loza Tavera

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Alejandro Sosa Peinado

Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos técnicos

Este trabajo fue financiado por los proyectos UNAM-DGAPA-PAPIIT IN222811 e IN217114

A CONACYT proyecto 252001, por el apoyo a Equipamiento Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.

A la Facultad de Química-PAIP 5000-9117 otorgado a la Dra. Herminia Loza Tavera.

A CONACYT por la beca que me otorgó para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas durante el periodo comprendido entre enero 2014 y enero 2016.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por ser mi tutora y permitirme desarrollar mi maestría en su laboratorio.

Al Dr. Martín Vargas Suárez por su ayuda, consejos, sugerencias, disponibilidad y apoyo durante la realización del trabajo y escritura de la tesis.

Al Dr. Renato León Rodríguez por facilitarnos los primers ITS1 e ITS2 y su ayuda con el protocolo de extracción de DNA.

A la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón por su colaboración en la identificación de las cepas y sus sugerencias en este trabajo.

A la Q. Georgina Duarte Lisci por su colaboración y apoyo en la cromatografía de gases.

Al Dr. Jorge Herrera Díaz por su colaboración en la realización e interpretación del gel SDS-PAGE 2D.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Marcela Ayala Aceves y Dr. Alejandro Sosa Peinado por sus sugerencias y aportaciones durante la realización de este trabajo

A los miembros de mi jurado de exámen de grado por las sugerencias para la mejora de ésta tesis.



Agradecimientos personales

A mi mamá Virginia, que es mi ejemplo de mujer inteligente y exitosa, por su paciencia, apoyo, consejos, cariño e interés en todos mis proyectos tanto académicos como personales, sin ella no estaría donde estoy ahora. Te quiero.

A mi papá José Luis por sus consejos, charlas, apoyo y estar ahí para mí siempre que lo he necesitado.

A mis hermanos Jocelyne y Allen por su interés, sugerencias y apoyo constante en mis proyectos y mi carrera.

A Tequila, por ser.

A Alberto Sosa por toda su ayuda, paciencia y cariño; gracias por hacer de mi maestría una de las mejores etapas de mi vida, por apoyarme y acompañarme en los momentos más difíciles y por ser el hombre inteligente, divertido y “emprendedor” al cual amo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 105 por todos los buenos momentos compartidos, por su paciencia y alegría en los momentos de desesperación y por ser tan finos y elegantes.

A Norma y Selene por su compañía y amistad durante todo este tiempo, por seguir siendo buenas amigas a pesar de la distancia y la colonia.

A mis amigos Jordan y Mariana por ser esas personas que siempre me impulsan a crecer o reír sin control.

A mis amigos de la universidad por ser siendo tan simpáticos como lo han sido desde que los conozco.

A mis amigas de la preparatoria (goro) por ser una fuente de apoyo, diversión y conocimiento constante, por ser mujeres exitosas y por siempre tener una respuesta inteligente para cualquier problema. ¡Son las mejores!



*“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds
the most discoveries, is not ‘Eureka!’ but ‘That’s funny...’ ”*

Isaac Asimov



Abreviaturas

BSA	albúmina de suero bobino
CG-EM	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Da	dalton
DO	Densidad óptica
DTT	ditiotreitól
FTIR	espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
<i>g</i>	gravedades
h	horas
IPG	gradiente de pH inmovilizado
kDa	kilodalton
λ	longitud de onda
LC/MS/MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem
M	molar
μL	microlitros
mL	mililitro
min	minuto
mM	milimolar
MM	medio mínimo
m/z	relación masa/carga
NBT	nitroazul de tetrazolio
PDA	papa dextrosa agar
PDB	papa dextrosa broth
PE-PU	poliéster poliuretano
PET	tereftalato de polietileno
PMSF	fluoruro de metil fenil sulfonil
<i>p</i>-NPA	<i>p</i> -nitrofenil acetato



PS-PU	poliéter poliuretano
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PU	poliuretano
p/v	relación peso-volúmen
SDS	dodecil sulfato de sodio
s	segundo
TBP	tributil fosfina
TOF-MS	espectrometría de masas por tiempo de vuelo
U	unidades
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen-volumen



Índice

Abreviaturas	v
Índice	vii
Índice de tablas y figuras	x
1. Resumen	13
1. Abstract	14
2. Introducción	15
2.1. Poliuretano (PU).	15
2.2. Aumento en la producción y contaminación por PU.	16
2.3. Tratamiento de residuos de PU.	17
2.4. Dificultades en el tratamiento de residuos de PU.	17
2.5. Biodegradación de PU.	18
2.6. Biodegradación de PU por hongos.	18
2.7. Actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de PU.	20
3. Antecedentes	22
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	27
5.1 Objetivo general.	27
5.2 Objetivos particulares.	27
6. Estrategia experimental	28
7. Materiales y Métodos	29
7.1. Medio de cultivo.	29
7.2. Identificación de productos de biodegradación de PU.	30
7.3. Concentración de proteínas extracelulares a partir de cultivos en MM-Impranil.	31
7.4. Resolución de proteínas extracelulares por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).	31
7.5. Escrutinio de actividades enzimáticas por ensayos de difusión radial en medios diferenciales.	32
7.6. Zimografías de las actividades enzimáticas encontradas.	33
7.6.1. Actividad ureasa.	33
7.6.2. Actividad proteasa.	34
7.6.3. Actividad esterasa.	35
7.7. Determinación de la actividad “impranilasa”.	35
7.7.1. Ensayo de difusión radial.	36
7.7.2. Zimografía de actividad “Impranilasa”.	36



7.7.3. SDS-PAGE de doble dimensión acoplado a zimografía para actividad esterasa.	37
7.8. Cuantificación de la degradación de Impranil por los concentrados proteicos y cálculo de la actividad específica.	38
7.8.1. Cálculo de la actividad específica.	38
7.9. Purificación e identificación de la enzima con actividad “impranilasa”.	39
7.9.1. Cromatografía de exclusión molecular.	39
7.9.2. Cromatografía de intercambio iónico.	40
7.9.3. Identificación de la enzima con actividad “impranilasa” por LC/MS/MS.	41
7.10. Caracterización cinética de Impranil como sustrato.	42
7.10.1. Determinación de la linealidad de la reacción con respecto a la concentración de enzima.	42
7.10.2. Determinación de la temperatura óptima.	43
7.10.3. Determinación del pH óptimo.	43
7.10.4. Determinación de los parámetros cinéticos.	43
7.11. Caracterización cinética de <i>p</i> -nitrofenil acetato como sustrato.	44
7.11.1. Curva patrón para cálculo <i>p</i> -NPA hidrolizado.	45
7.11.2. Determinación de la linealidad de la reacción con respecto a la concentración de enzima.	46
7.11.3. Determinación de los parámetros cinéticos.	46
8. Resultados y discusión	48
8.1. Análisis de productos de degradación de Impranil presentes en el medio de cultivo de hongos degradadores de PU.	48
8.2. Obtención y cuantificación de proteínas extracelulares de los hongos cultivados en MM-Impranil.	53
8.3. Escrutinio de actividades enzimáticas por ensayos de difusión radial.	54
8.3.1. Actividad ureasa.	54
8.3.2. Actividad proteasa.	55
8.3.3. Actividad esterasa.	55
8.4. Zimografía de las actividades enzimáticas encontradas.	56
8.4.1. Actividad ureasa.	56
8.4.2. Actividad proteasa.	57
8.4.3. Actividad esterasa.	58
8.5. Determinación de la actividad “impranilasa”.	59
8.5.1. Ensayo de difusión radial en MM-Impranil.	59
8.5.2. Zimografía de actividad “impranilasa”.	60
8.5.3. SDS-PAGE 2D acoplado a zimografía para actividad esterasa.	61



8.6. Cuantificación de la degradación y cálculo de la actividad específica de los concentrados proteicos.	62
8.6.1. Cuantificación de la degradación de Impranil en MM-Impranil líquido.	62
8.6.2. Cálculo de la actividad específica de los concentrados proteicos.	64
8.7. Purificación e identificación de la enzima con actividad “impranilasa”.	67
8.7.1. Cromatografía de exclusión molecular con el concentrado proteico de A3.I.1.	68
8.7.1.1. Curva de calibración con marcadores de masa molecular definidos.	71
8.7.2. Cromatografía de intercambio iónico con el concentrado proteico de A3.I.1.	72
8.7.3. Identificación de la proteína con actividad “impranilasa”.	77
8.8. Caracterización cinética de la “impranilasa”.	82
8.8.1 Cálculo de la actividad específica de la cutinasa utilizando Impranil como sustrato.	83
8.8.2. Determinación de la temperatura óptima.	85
8.8.3. Determinación del pH óptimo.	87
8.9. Caracterización cinética de la “impranilasa” con <i>p</i> -NPA como sustrato.	88
8.9.1. Curva patrón que relaciona la DO _{405 nm} con la hidrólisis del <i>p</i> -NPA.	88
8.9.2. Cálculo de la actividad específica con <i>p</i> -NPA como sustrato.	89
8.9.3. Cálculo de los parámetros cinéticos utilizando <i>p</i> -NPA como sustrato.	91
9. Conclusiones	96
10. Perspectivas	97
Referencias	98
Anexo 1. Preparación de soluciones	103
Anexo 2. Espectros de masas para la identificación de compuestos por CG-MS	114
Anexo 3. Péptidos identificados por LC/MS/MS	116
Anexo 4. Artículo aceptado	117



Índice de tablas y figuras

- Figura 1.** Reacción de formación del PU y tipos de PU.
- Figura 2.** Crecimiento de hongos filamentosos seleccionados en el medio con PU como fuente de carbono.
- Figura 3.** Cuantificación de la degradación de Impranil por aclaramiento del medio de cultivo de los quince hongos con mayor porcentaje de degradación.
- Figura 4.** Reacción de reducción del nitroazul de tetrazolio para generar formazán.
- Figura 5.** Reacción de hidrólisis del 4-metilumbeliferil butirato y sus productos.
- Figura 6.** Reacción de hidrólisis del *p*-NPA para determinar actividad esterasa espectrofotométricamente.
- Figura 7.** Cromatogramas de los compuestos identificados por CG-EM.
- Figura 8.** Estructuras de los compuestos identificados por CG-EM.
- Figura 9.** Patrón de proteínas de los concentrados extracelulares de los ocho hongos que mejor degradan Impranil e identificación de las cepas.
- Figura 10.** Ensayo de difusión radial en medio urea de Christensen para detectar actividad ureasa.
- Figura 11.** Ensayo de difusión radial en medio con leche descremada al 1% para detectar actividad proteasa.
- Figura 12.** Ensayo de difusión radial en medio con Tween20® con CaCl₂ para detectar actividad esterasa.
- Figura 13.** Zimograma de actividad ureasa.
- Figura 14.** Zimograma de actividad proteasa.
- Figura 15.** Zimograma de actividad esterasa.
- Figura 16.** Ensayo de difusión radial en medio con Impranil para detectar actividad “impranilasa”.
- Figura 17.** Zimograma de actividad “impranilasa”.
- Figura 18.** SDS-PAGE 2D al 15% y zimograma de actividad esterasa.
- Figura 19.** Curva patrón que relaciona concentraciones conocidas de Impranil con su DO_{600 nm}.
- Figura 20.** Porcentaje de degradación de Impranil de los concentrados proteicos de sobrenadantes de cultivos de hongos en MM-Impranil.
- Figura 21.** Análisis curso-temporal de hidrólisis de Impranil utilizando el concentrado proteico de *C. tenuissimum* A2.PP.5.
- Figura 22.** Cálculo de la actividad específica para el concentrado proteico extracelular de *C. tenuissimum* A2.PP.5.
- Figura 23.** Determinación de la concentración de proteínas y actividad “impranilasa” en las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión molecular.



- Figura 24.** Análisis de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular por SDS-PAGE.
- Figura 25.** Zimogramas de actividades “impranilasa” y esterasa de las fracciones de la columna de exclusión molecular que presentaron la proteína de interés.
- Figura 26.** Curva de calibración de la columna de exclusión molecular con marcadores de masa molecular definidos.
- Figura 27.** Determinación de la concentración de proteína y actividad “impranilasa” en las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión molecular y cálculo de la masa molecular (MM) de la proteína de interés.
- Figura 28.** Espectro de elución de las proteínas de *C. tenuissimum* A3.I.1 de la cromatografía de intercambio aniónico.
- Figura 29.** Cuantificación de la degradación de Impranil de las fracciones con mayor concentración de proteína ($DO_{214\text{ nm}}$) en la cromatografía de intercambio aniónico.
- Figura 30.** Zimogramas de actividades “impranilasa” y esterasa de las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico que presentaron la proteína de interés.
- Figura 31.** Análisis de las fracciones mas degradadoras de Impranil de la cromatografía de intercambio aniónico por SDS-PAGE.
- Figura 32.** Reacción de hidrólisis de la cutina.
- Figura 33.** Estructura tridimensional representativa de la cutinasa perteneciente al hongo *Fusarium solani*.
- Figura 34.** Reacciones de hidrólisis que puede catalizar la cutinasa sobre diferentes polímeros.
- Figura 35.** Análisis de las fracciones de la columna de exclusión molecular por SDS-PAGE mostrando la cutinasa pura.
- Figura 36.** Análisis curso-temporal de la degradación de Impranil por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1.
- Figura 37.** Cálculo de la actividad específica de la cutinasa pura sobre Impranil.
- Figura 38.** Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad degradativa de la cutinasa.
- Figura 39.** Efecto del pH sobre la actividad degradativa de la cutinasa en Impranil.
- Figura 40.** Curva patrón que relaciona la hidrólisis de *p*-NPA con la $DO_{405\text{ nm}}$.
- Figura 41.** Análisis curso-temporal de la hidrólisis de *p*-NPA por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 utilizando diferentes concentraciones de proteína y cálculo de su actividad específica.
- Figura 42.** Análisis curso-temporal de la hidrólisis de *p*-NPA por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 utilizando diferentes concentraciones de sustrato.



Figura 43. Promedio de las velocidades iniciales (v_0) relacionadas a la concentración de *p*-NPA que fue hidrolizado por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 y ajuste a un modelo de regresión no lineal.

Tabla 1. Hongos con capacidad de degradar PU, el tipo de PU en el que se estudió la degradación y las posibles actividades enzimáticas involucradas.

Tabla 2. Identificación de las cepas de los hongos más degradadores.

Tabla 3. Composición del medio mineral utilizado para el crecimiento de los hongos con Impranil al 0.5%.

Tabla 4. Preparación de muestras para las reacciones de degradación de Impranil a diferentes concentraciones de PU.

Tabla 5. Preparación de las muestras para realizar la curva patrón.

Tabla 6. Preparación de muestras para las reacciones de hidrólisis de *p*-NPA a diferentes concentraciones de sustrato.

Tabla 7. Identificación por CG-EM de algunos compuestos presentes en el MM-Impranil tratado con hongos y en el control sin inocular, a diferentes tiempos.

Tabla 8. Valores de actividad específica de los concentrados proteicos de los hongos.

Tabla 9. Valores de masa molecular, probabilidad de identificación y % del espectro asociados a las proteínas identificadas en la muestra por espectrometría de masas.

Tabla 10. Características de la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 comparadas contra las reportadas en BRENDA analizadas en condiciones similares.



1. Resumen

El aumento en el uso de poliuretano (PU) en los últimos años ha generado un problema de contaminación debido a que este polímero se acumula y es difícil de reciclar. Es por esto que la biodegradación se considera una alternativa ecológica para el tratamiento de estos residuos. En nuestro grupo de trabajo se aislaron 31 cepas de hongos filamentosos capaces de degradar y utilizar el barniz de PU Impranil como única fuente de carbono. Las ocho cepas más degradadoras se identificaron como *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1, *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5 y A3.I.1, *Cladosporium asperulatum* BP8.I.3 y BP3.I.2, *Cladosporium montecillanum* A2.H.4, *Penicillium chrysogenum* BP3.I.7 y *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1. En este trabajo se analizaron los compuestos generados a partir de la degradación de Impranil al ser inoculado con tres cepas: T1.PL.1, A3.I.1 y A2.PL.1. Se observó disminución de compuestos con enlaces éster y aumento de diisocianato y polioles (precursores del PU), lo que implica degradación del polímero. Se establecieron cultivos de los ocho hongos en medio con Impranil y se concentraron las enzimas extracelulares. Mediante ensayos de difusión radial y zimografías se analizaron las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de PU: ureasa, proteasa y esterasa. Los zimogramas revelaron que: solo la cepa BP3.I.2 mostró actividad ureasa; todas las cepas del género *Cladosporium* mostraron una proteína de 15 kDa con actividad proteasa; todas las cepas presentaron una actividad esterasa de 20 kDa. Para relacionar estas actividades con la degradación de PU, se realizó un ensayo de difusión radial y una zimografía con Impranil como sustrato. Todas las cepas presentaron actividad en el ensayo de difusión radial, pero solo las cepas A3.I.1, A2.PP.5 y A2.H.4 mostraron una proteína de 20 kDa con actividad sobre el Impranil en la zimografía, coincidente con la actividad esterasa. El concentrado proteico que mostró mayor capacidad para degradar Impranil fue el de A3.I.1 por lo que se seleccionó su proteína de 20 kDa para ser purificada e identificada. La purificación se llevó a cabo por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico y se identificó como una cutinasa de 23.53 kDa. Con la proteína pura se determinaron los parámetros cinéticos (usando Impranil y *p*-NPA como sustratos) y se compararon con los reportados en la base de datos BRENDA.



1. Abstract

The increasing use of polyurethane (PU) in recent years has generated a pollution problem because it accumulates and is difficult to recycle. Therefore, biodegradation has been considered as an environmental friendly alternative for the treatment of PU waste. Thirty one strains of filamentous fungi capable of using the PU varnish Impranil as sole carbon source were isolated. The eight most degrading strains were identified as *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1, *Cladoporium tenuissimum* A2.PP.5 and A3.I.1, *Cladosporium asperulatum* BP8.I.3 and BP3.I.2, *Cladosporium montecillanum* A2.H.4, *Penicillium chrysogenum* BP3.I.7, and *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1. In this work, the compounds generated by the degradation of Impranil inoculated with three fungal strains (T1.PL.1, A3.I.1 y A2.PL.1) were analyzed. A decrease of compounds with ester bonds and an increase of diisocyanate and polyols (PU precursors) were observed, implying fungal biodegradative activity. Impranil cultures with the eight fungi were established and the extracellular enzymes were concentrated. Urease, protease, and esterase enzymatic activities associated with PU biodegradation, were analyzed by zymography and radial diffusion assays. Only BP3.I.2 had urease activity, all *Cladosporium* strains had a 15 kDa protein with protease activity, and all the strains showed a 20 kDa protein with esterase activity. To relate these activities with PU degradation, radial diffusion assays and zymographies with Impranil as substrate were performed. Radial diffusion assays showed Impranil degradation activity in all strains, but only A3.I.1, A2.PP.5 and A2.H.4 strains showed a 20 kDa band with activity over Impranil, matching esterase activity. The protein concentrate with the highest capacity to degrade Impranil was A3.I.1, therefore it was selected to purify and identify the 20 kDa protein. Protein purification was carried out by molecular exclusion and ionic exchange chromatography. The protein was identified as a 23.53 kDa cutinase. The kinetic parameters, using Impranil and *p*-NPA as substrates, were determined with the purified protein, and were compared with the information in BRENDA database.



2. Introducción

2.1. Poliuretano (PU).

El PU es un polímero sintético que fue desarrollado en 1937 por Otto Bayer. El polímero es generado por la condensación de un diisocianato y un poliol; en esta condensación, ocurren varias reacciones químicas que dan lugar a la formación del enlace uretano (carbamato) (Figura 1A).

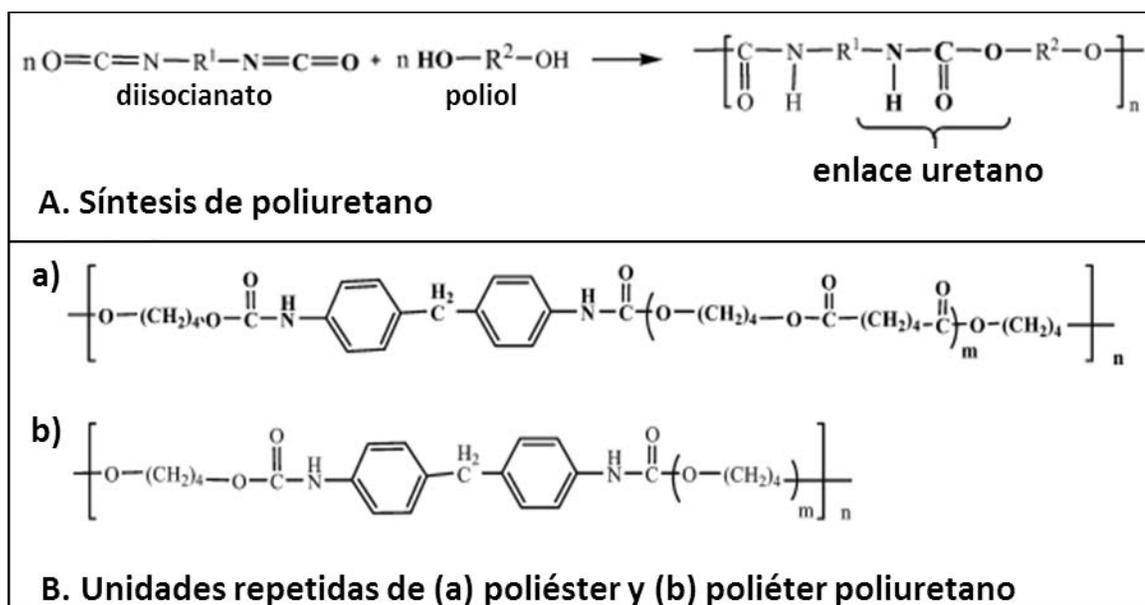


Figura 1. A) Reacción de formación del PU. **B)** Tipos de PU (Modificado de Mahajan y Gupta, 2015).

Debido a la amplia variedad de diisocianatos y polioles, es posible realizar diversas combinaciones de los mismos, lo que da como resultado diferentes tipos de PU (Rahman y Brazel, 2004). Dependiendo de su naturaleza, estos polioles pueden ser de tipo poliéter o de tipo poliéster. De acuerdo al poliol utilizado para su formación, los PUs se pueden dividir en dos grupos: poliéster poliuretano (PS-PU) y poliéter poliuretano (PE-PU) (Urbanski *et al.*, 1977) (Figura 1B).

Los PUs son compuestos con estructuras heterogéneas y su uso varía de acuerdo a su composición estructural. En la industria, aquellos que tienen grupos poliéter son los más empleados para aislamiento térmico (Akutsu-Shigeno *et al.*, 2006). En



cambio, los PU a base de poliéster son utilizados principalmente para partes de automóviles (Howard, 2012). Las variaciones en el número de carbonos entre los enlaces uretano, así como la naturaleza de los sustituyentes, brindan características propias a cada polímero: desde lineal y rígido hasta ramificado y flexible. Los flexibles son ampliamente usados en espumas, elastómeros durables, adhesivos, selladores de alto rendimiento, pinturas, fibras, sellos, empaques, juntas, condones, alfombras, partes automotrices, entre otros. Por su parte, los rígidos, cuya densidad es más elevada, son utilizados principalmente para el aislamiento térmico (TecnaPol, 2008). Por su gran versatilidad, el PU se utiliza para la fabricación de muchos productos por su durabilidad y resistencia. Debido a esto, su producción ha aumentado, lo que ha llevado a generar un grave problema de contaminación.

2.2. Aumento en la producción y contaminación por PU.

El consumo mundial de plásticos ha aumentado de 1.5 millones de toneladas por año en 1950 a 265 millones de toneladas por año en 2011 (Cregut *et al.*, 2011). Entre los plásticos sintéticos, el PU ocupa el sexto lugar entre los más utilizados en el mundo y su producción abarca entre 6 y 7% de los plásticos totales (Cangemi *et al.*, 2008). Este aumento en la producción de PU también ha generado un aumento en la contaminación por residuos. Solamente en Estados Unidos de Norteamérica, se generan alrededor de 1.3 millones de toneladas de residuos de PU cada año (Alavi-Nikje *et al.*, 2011). En México, en el 2011, se produjeron 5.3 millones de toneladas de plástico y otros 2.9 millones de toneladas fueron importadas, sólo el 19% fue reciclado mientras que el resto terminó en vertederos (Conde-Ortiz, 2012).

Como consecuencia de lo anterior, los costos en los procesos para tratar residuos plásticos han aumentado rápidamente y la legislación que los regula cada vez hace más difícil su tratamiento y eliminación (Zevenhoven, 2004). Es por eso que el manejo de los residuos de PU, al final de su vida útil, provenientes de diversas fuentes está recibiendo mayor atención en todo el mundo.



2.3. Tratamiento de residuos de PU.

Las técnicas más utilizadas para tratar residuos sólidos poliméricos son el reciclaje, el compostaje, la incineración y el relleno sanitario (Gregorí *et al.*, 2007). En el caso del PU, las técnicas existentes de reciclaje y destrucción son: 1) reciclaje mecánico, que involucra un tratamiento físico y consiste esencialmente en los procesos de pulverización, prensado, moldeo por inyección y moldeo por compresión; 2) procesamiento químico, que es la recuperación de monómeros como principal producto de la ruptura de enlaces de uretano; en éste se encuentra la hidrólisis, aminólisis y la glicólisis; y 3) procesamiento térmico, que consiste en utilizar el flujo de residuos como fuente de energía combustible o para obtener monómeros utilizables en la industria; incluye a la pirólisis, hidrogenación y gasificación (Alavi-Nikje *et al.*, 2011).

2.4. Dificultades en el tratamiento de residuos de PU.

Existen varios factores a considerar para elegir un método adecuado para el tratamiento de residuos de PU, el cual dependerá de las características propias del polímero. Las espumas de PU contienen CFC (clorofluorocarbono), que puede ser emitido como gas tóxico, haciendo más difícil su tratamiento. La glicólisis se utiliza para la recuperación de precursores y moléculas para su posterior reciclado pero requiere un alto uso de energía pues se debe llevar el PU a más de 200 °C (Rossi *et al.*, 2003). En el procesamiento térmico, incluyendo la combustión de PU, se corre el riesgo de que se generen óxidos de nitrógeno, amoníaco, piridinas y otros residuos tóxicos derivados de compuestos nitrogenados, debido a los altos contenidos de nitrógeno en el material.

Hay muy poca información sobre el comportamiento del PU en los vertederos por lo que se debe identificar y desarrollar un mercado potencial para recuperar y reciclar PU. También es necesario tomar en cuenta la legislación de cada país, si es que existe una, para el tratamiento de residuos (Zevenhoven, 2004). Por lo anterior, se ha empezado a considerar a la biodegradación como una alternativa para el procesamiento de residuos de PU, que facilite su tratamiento y tenga menos repercusiones para el ambiente.



2.5. Biodegradación de PU.

La biodegradación se refiere a cualquier proceso que permita destruir o transformar contaminantes a compuestos menos peligrosos usando bacterias, hongos, plantas o enzimas derivadas de ellos (Ren, 2003). Su objetivo principal es transformar contaminantes en metabolitos que puedan ser consumidos e incorporados a sus vías metabólicas para ser mineralizados, generando productos como H_2O , CH_4 y CO_2 (Seo *et al.*, 2009).

Los plásticos son compuestos relativamente nuevos en la naturaleza, por lo que algunos de ellos todavía son resistentes al ataque de mo, ya que éstos no han evolucionado lo suficiente para generar nuevas actividades enzimáticas o adaptar las existentes, para poder degradarlos (Shah *et al.*, 2008). Sin embargo, la degradación de PU por mo como bacterias y hongos ha sido demostrada (Crabbe, 1994). Algunos de estos mo han sido aislados de desechos de PU colectados en basureros, de tierra o de otros ambientes en donde los mo han estado expuestos al PU.

2.6 Biodegradación de PU por hongos.

Existen varios reportes en la literatura que indican que el PU es susceptible a la degradación por hongos (Darby y Kaplan, 1968). La diversidad de micromicetos y la cantidad de metabolitos que secretan los hongos les permiten sobrevivir en medios limitados (Loredo-Treviño *et al.*, 2011), haciéndolos buenos candidatos para la biodegradación de PU. En la Tabla 1 se muestran varias especies de hongos que tienen la capacidad de utilizar PU como fuente de carbono, así como el tipo del PU en el que se probó esta capacidad y las posibles actividades enzimáticas involucradas en su degradación.



Tabla 1. Hongos con capacidad de degradar PU, el tipo de PU en el que se estudió la degradación y las posibles actividades enzimáticas involucradas.

Hongo	Tipo de PU	Actividades enzimáticas	Referencia
<i>Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Trichoderma sp.</i>	PS-PU y PE-PU	No reportadas	Darby y Kaplan, 1968
<i>Aspergillus niger, Cladosporium herbarum</i>	PE-PU	Esterasa	Filip, 1979
<i>Aspergillus fumigatus, Gliocladium roseum, Penicillium citrium</i>	No reportado	Esterasa, proteasa y ureasa	Pathirana y Seal, 1983
<i>Chaetomium globosum, Aspergillus terreus</i>	PS-PU	Esterasa y proteasa	Boubendir, 1993
<i>Curvularia senegalensis, Fusarium solani, Aureobasidium pullulans, Cladosporium sp.</i>	PS-PU	Esterasa	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Exophialajeau selmei</i>	PE-PU	No reportadas	Owen <i>et al.</i> , 1996
<i>Nectriaglio cladioides, Penicillium ochrochloron, Geomyces pannorum</i>	PS-PU	No reportado	Barratt <i>et al.</i> , 2003
<i>Geomyces pannorum, Penicillium inflatum, Alternaria sp., Neonectriara mulariae, Penicillium viridicatum</i>	PS-PU	No reportadas	Cosgrove <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus niger</i>	PE-PU	No reportadas	Hincapié-Llanos <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida antarctica</i>	PS-PU	Lipasa	Shibasaki <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria sp.</i>	PE-PU	Ureasa	Matsumiya <i>et al.</i> , 2010
<i>Nectria haematococca, Penicillium viridicatum, Penicillium ochrochloron, Mucormycotina sp.</i>	PS-PU	No reportadas	Cosgrove <i>et al.</i> , 2010
<i>Alternaria solani</i>	No reportado	Proteasa	Ibrahim <i>et al.</i> , 2011
<i>Pestalotiopsis microspora, Alternaria sp., Plectosphaerella sp., Bionectria sp., Nectria sp., Phaeosphaeria sp.</i>	PS-PU	Proteasa	Russel <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus sp., Trichoderma sp., Paecilomyces sp., Penicillium sp., Alternaria sp., Fusarium sp.</i>	No reportado	Proteasa, ureasa, esterasa y lacasa	Loredo-Treviño <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus flavus</i>	PS-PU	Esterasa	Mathur y Prasad, 2012
<i>Volutella ciliata, Fusarium solani, Aspergillus fumigatus, Fusarium oxysporum, Trichosporon moniliforme, Penicillium mandriti, Bionectria ochroleuca, Penicillium roseopurpureum, Alternaria sp., Geomyces pannorum, Thermomyces lanuginosus</i>	PS-PU	No reportadas	Zafar, Houlden y Robson, 2013
<i>Candida rugosa, Arthrographis kalrae, Aspergillus fumigatus, Malbranchea cinnamomea, Emericella nidulans, Thermomyces lanuginosus</i>	PS-PU	No reportadas	Zafar <i>et al.</i> , 2014



Como puede observarse en la Tabla 1, la mayoría de los estudios sobre degradación de PU han sido realizados utilizando como sustrato el PS-PU. Esto se puede deber a sus características químicas ya que el PS-PU contiene enlaces éster en su estructura, los cuales son más susceptibles al ataque de los hongos, a diferencia de los enlaces éter presentes en el PE-PU (Darby y Kaplan, 1968).

2.7. Actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de PU.

El principal mecanismo de degradación de polímeros ocurre por oxidación o hidrólisis producida por enzimas, resultando en la ruptura de enlaces para generar productos de menor masa molecular más fácilmente asimilados por los mo (Barrat *et al.*, 2003).

Con base en la estructura del PU, se ha postulado que es probable que en el ataque a este polímero estén involucradas las siguientes actividades enzimáticas: actividad proteasa, que ataca los enlaces amida y uretano; actividad esterasa o lipasa, que ataca los enlaces éster y actividad ureasa (Ruiz *et al.*, 1999; Matsumiya *et al.*, 2010). De acuerdo a la Tabla 1, las actividades enzimáticas reportadas con mayor incidencia son la esterasa o lipasa, proteasa y en algunos casos ureasa.

La capacidad para romper los enlaces presentes en el PU ha sido reportada para una cepa de *Aspergillus niger* en fermentación sólida. La cepa fue cultivada en medio con PU al cual se le adicionó glucosa y peptona a diferentes concentraciones decrecientes, para adaptar al mo al PU. La degradación se demostró haciendo uso de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), con la cual se analizó un control y una muestra de PU tratada con el hongo. Cambios en las bandas de 1530 cm^{-1} y 1227 cm^{-1} , que corresponden a los enlaces C-N y N-H, sugieren rompimiento de enlaces amida presentes en el polímero por acción de las enzimas fúngicas (Hincapié-Llanos *et al.* 2009).

Crabbe *et al.*, reportó en 1994 un hongo con la capacidad de degradar PE-PU aislado del suelo e identificado como *Curvularia senegalensis*. Este hongo secretó una enzima extracelular con propiedades de esterasa cuya actividad fue determinada mediante la hidrólisis de diacetato de fluoreceína. La enzima fue parcialmente purificada mediante fraccionamiento con sulfato de amonio y se determinó su tamaño en 28 kDa.



Ibrahim *et al.* (2011) reportó una proteasa de *Alternaria solani* con la capacidad para degradar PS-PU. Cuando esta cepa fue probada en medios diferenciales, mostró actividad proteasa, esterasa y ureasa; mientras que en un medio en presencia de PU, sólo fue posible detectar actividad proteasa. Este resultado indica que las actividades esterasa y ureasa de este hongo no fueron inducidas en medio con PU a diferencia de las proteasas, que se expresaron constitutivamente.

Russell y colaboradores aislaron en el 2011 un hongo endofítico identificado como *Pestalotiopsis microspora* con la capacidad de degradar PS-PU. El hongo se cultivó en medio con PU y en medio rico como control, a los 10 días se filtraron y los sobrenadantes libres de células, de ambos medios, se probaron sobre PU. A diferencia del sobrenadante del medio rico, el sobrenadante del medio con PU tuvo la capacidad de degradar el PU lo que sugiere que las enzimas involucradas en la degradación son excretadas, difusibles e inducidas cuando se expone al hongo a un substrato con el polímero. Para identificar la actividad poliuretanolítica se realizó una prueba con inhibidores de distintas actividades enzimáticas. Se observó que la capacidad para degradar el PU se inhibía en presencia de fluoruro de metilfenilsulfonil (PMSF), el cual es un inhibidor para serina-hidrolasas (como las serín-proteasas y esterasas cuyo mecanismo es muy parecido).



3. Antecedentes

En nuestro laboratorio se aislaron e identificaron cepas de hongos capaces de utilizar poliuretano (PU) como única fuente de carbono, a partir de diferentes muestras medioambientales (tierra, aire, basurero “Bordo Poniente”) y se seleccionaron de acuerdo a su capacidad de crecer en medio mineral (MM) con sulfato de amonio como fuente de N (Russell *et al.*, 2011) y adicionado con PU como única fuente de carbono (Álvarez-Barragán, 2013). Para esto, se realizó un escrutinio utilizando como fuente de carbono un poliéster poliuretano (PS-PU) denominado Impranil® DLN. Se empleó como criterio selectivo, en las cepas con crecimiento en Impranil, la capacidad para formar un halo de degradación, debido a que el Impranil se clarifica al ser degradado (Howard, 2002) (Figura 2A). A partir de este escrutinio se seleccionaron 31 cepas que crecieron en MM-Impranil (0.5%) y formaron halo de degradación (Álvarez-Barragán, 2013).

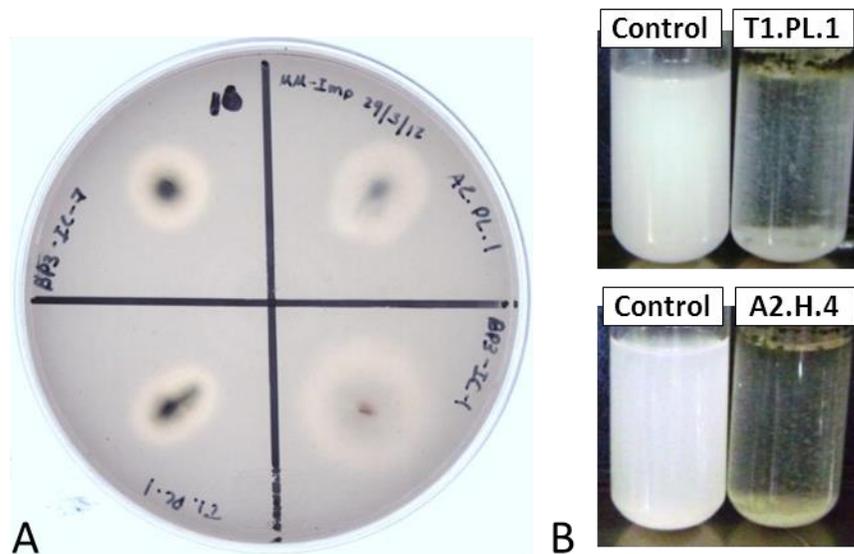


Figura 2. Crecimiento de hongos filamentosos seleccionados en el medio con Impranil como fuente de carbono. A) Crecimiento en MM-Impranil sólido donde se observan halos de degradación. **B)** Crecimiento de dos hongos en MM-Impranil líquido comparando con un control sin inocular, el medio se clarifica debido a la acción del hongo (Álvarez-Barragán, 2013).



Se realizaron pruebas para cuantificar la degradación de Impranil por turbidimetría en MM-Impranil líquido (Figura 2B) de las 31 cepas que tenían la capacidad de formar halo de degradación en medio sólido. Para esto se realizó una curva estándar con diluciones de MM-Impranil líquido en agua destilada que permitió relacionar la $DO_{600\text{ nm}}$ con la concentración de PU en el medio. Se seleccionaron las 15 mejores cepas con las que se repitió la cuantificación. En la Figura 3 se observa que ocho de los hongos aislados produjeron degradación mayor al 70%.

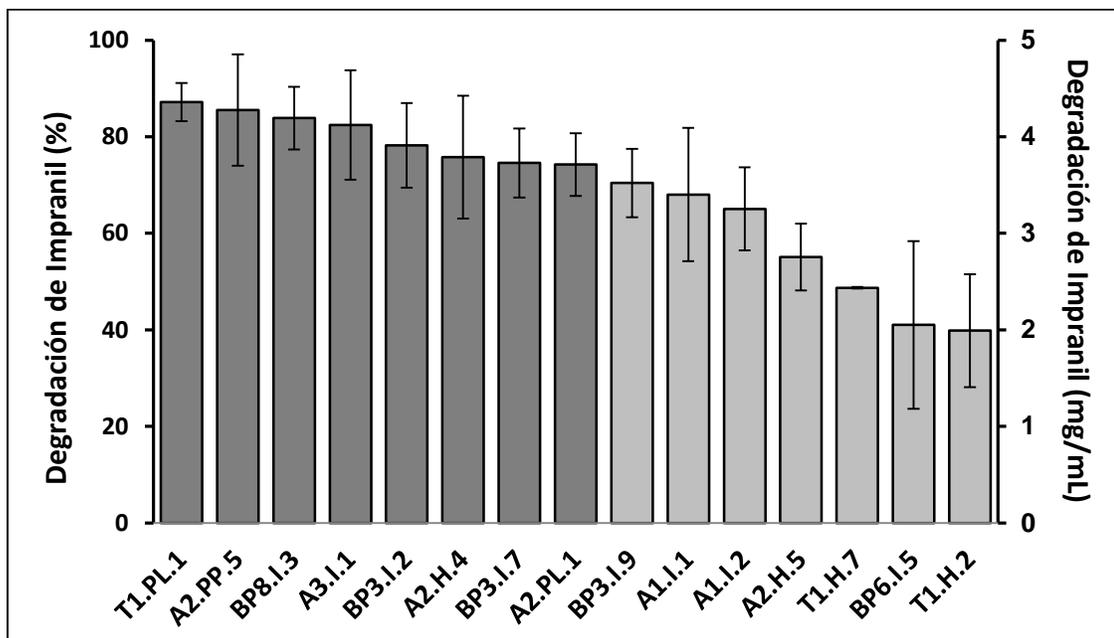


Figura 3. Cuantificación de la degradación de Impranil por aclaramiento del medio de cultivo de los quince hongos con mayor porcentaje de degradación (Álvarez-Barragán, 2016). (n=3).

Con el propósito de identificar los cambios estructurales en el Impranil llevados a cabo por la actividad de los ocho hongos con la mayor capacidad de degradarlo, se realizaron análisis de espectroscopía FTIR del MM-Impranil inoculado con los hongos, comparándolo con un control sin inocular. El análisis mostró una disminución de la banda de 1730 cm^{-1} correspondiente al enlace C=O (carbonilo) presente en un grupo uretano o éster, lo que podría implicar hidrólisis de este enlace (Kay *et al.*, 1993) resultado de la posible actividad de una esterasa o una proteasa. También se observó disminución en las bandas de 1540 cm^{-1} y 1270 cm^{-1} que son características de los enlaces N-H y C-N. Esto sugiere que hay una ruptura en los enlaces donde el nitrógeno está implicado (Pettit y Abbott, 1975). La ruptura del enlace N-H podría llevarse a cabo por una deshidrogenasa con la capacidad de romper los enlaces que unen los H^+ al nitrógeno, mientras que una proteasa podría



estar implicada en la ruptura del enlace N-C debido a su capacidad para romper la unión entre el carbono y el nitrógeno dada su actividad proteolítica.

La identificación de los hongos se llevó a cabo con la colaboración de la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón. El género de los hongos se determinó de acuerdo a su morfología microscópica con base en la clasificación de Saccardo (Barnett y Hunter, 1998) y se utilizaron técnicas moleculares para la identificación de las especies. Se amplificó una región de aproximadamente 1200 pb que incluyó el ITS1 (internal transcribed spacer 1), el gen ribosomal 5.8S, el ITS2 (internal transcribed spacer 2) y la región D1-D2 del gen 28S ribosomal (Hinrikson *et al.*, 2005). Para una identificación más precisa se amplificaron también secuencias parciales de los genes de actina y el translation elongator factor 1 (TEF1) para los hongos pertenecientes al género *Cladosporium* (Bensch *et al.*, 2012). La identificación se realizó usando la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) que compara las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank (Tabla 2).



Tabla 2. Identificación de las cepas de los hongos más degradadores

Cepa	Identificación	Gen	ID GeneBank
T1.PL.1	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605794
		Actina	KU605800
		TEF1	KU605786
A2.PP.5	<i>Cladosporium tenissium</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605789
		Actina	KU605796
		TEF1	KU605782
BP8.I.3	<i>Cladosporium asperulatum</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605793
		Actina	KU605799
		TEF1	KU605785
A3.I.1	<i>Cladosporium tenissium</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605790
		Actina	KU605797
		TEF1	KU605783
BP3.I.2	<i>Cladosporium asperulatum</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605791
		Actina	KU605798
		TEF1	KU605784
A2.H.4	<i>Cladosporium montecillanum</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605787
		Actina	KU605795
		TEF1	KU605781
BP3.I.7	<i>Penicillium chrysogenum</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605792
A2.PL.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ITS-ITS4/D1-D2	KU605788

En este trabajo se estudió cuales son los enlaces que se rompen en los compuestos presentes en el PU (Impranil) durante su degradación por acción de los hongos. Por otra parte también se realizó un análisis de las actividades enzimáticas extracelulares de los ocho hongos más degradadores cultivados en Impranil, se concentraron las proteínas extracelulares y se evaluaron tanto por ensayo de difusión radial como por zimografía la actividad esterasa, proteasa y ureasa; siendo éstas las más reportadas en la literatura. También se evaluó la actividad poliuretanolítica sobre Impranil por zimografía para identificar una enzima con la capacidad de degradar el PU por aclaramiento de sustrato. Dicha proteína se purificó e identificó para después caracterizarla enzimáticamente. Conociendo la naturaleza de la proteína que degrada poliuretano, se pueden plantear estrategias que permitirán utilizarla para procesos de biodegradación.



4. Hipótesis

Dado que los hongos filamentosos producen enzimas extracelulares con capacidad hidrolítica, es factible que la degradación de poliuretano se lleve a cabo por alguna de estas actividades. Asimismo, es posible profundizar en el conocimiento sobre la degradación del poliuretano analizando los compuestos químicos que se generan después de incubar al polímero con el hongo e identificando la actividad enzimática extracelular responsable.



5. Objetivos

5.1 Objetivo general

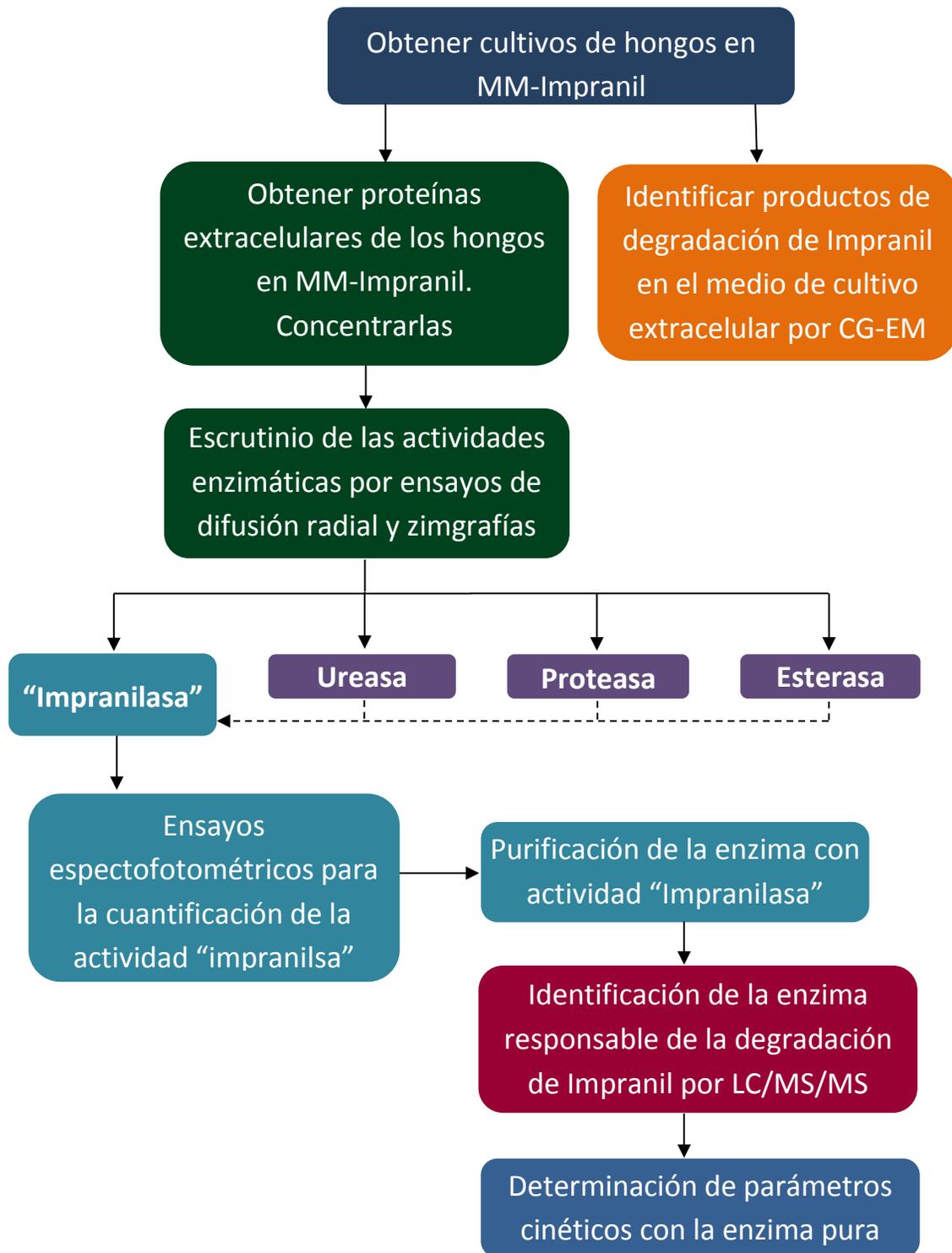
Identificar los productos generados en la degradación del barniz de poliuretano (PU) Impranil cuando es hidrolizado por la actividad de hongos filamentosos con capacidad de degradar PU y determinar la actividad enzimática extracelular que participa en la degradación del polímero.

5.2 Objetivos particulares

- I. Identificar los productos de degradación del Impranil al ser tratado con diversos hongos.
- II. Estandarizar un protocolo que permita obtener y concentrar enzimas extracelulares de hongos cultivados en medio con poliuretano.
- III. Identificar las actividades enzimáticas presentes en los concentrados de proteínas extracelulares de cultivo de hongos en MM-Impranil, que podrían ser las responsables de su degradación.
- IV. Caracterizar la actividad de la enzima capaz de degradar Impranil.



6. Estrategia experimental



7. Materiales y Métodos

7.1. Medio de cultivo.

Se utilizó un medio de cultivo artificial adecuado para que los hongos crecieran. Este medio debe contener fuente de nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas (Cl^- , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+}). También son necesarias otras sales minerales para propiciar el crecimiento, tales como elementos traza: Co, Cu, Zn, Mo, entre otras (Tabla 3).

Tabla 3. Composición del medio mineral utilizado para el crecimiento de los hongos con Impranil al 0.5% (Russell *et al.*, 2011).

Fórmula	Concentración (1 L)
NaH_2PO_4	19 mM
K_2HPO_4	33.5 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.6 mM
MgSO_4	250 μM
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	147 μM
$\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	14 μM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12 μM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 μM
CuCl_2	11 μM
MnCl_2	12 μM
HCl	1.8 mM

En este trabajo se utilizó Impranil® DLN (al 0.5% p/v) marca Bayer, el cual es un polímero alifático que contiene 50% en sólidos y tiene como solvente agua por lo que permite el crecimiento microorganismos. Éste polímero se aclara al ser hidrolizado (Howard, 2002) por lo que permite el seguimiento y análisis de su degradación.



7.2. Identificación de productos de biodegradación de PU.

La cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM) es una técnica analítica que separa mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles, la muestra es fragmentada en iones los cuales se aceleran en un tubo curvado que contiene un fuerte campo magnético y los conduce a un detector sobre el que se impactan en función de su relación masa/carga (Scai, 2011). Para conocer lo que ocurre al Impranil en el medio debido al crecimiento de los hongos, se realizó un análisis por CG-EM para detectar compuestos y cambios en los mismos en diferentes tiempos de incubación (0, 7 y 14 días). Con este propósito se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Para preparar el inóculo, reactivar los hongos (preservados en glicerol) en PDA por estría masiva; incubar 5 días a 30 °C.
2. Tomar un cuadro del medio con el hongo de 0.5 cm² y resembrarlo en 30 mL de medio PDB en un matraz de 125 mL. Dejarlo incubar por 7 días a 30 °C.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, macerar el micelio con la espátula.
4. Tomar el equivalente a 80 mg de micelio (peso húmedo) y colocarlo en tubos Eppendorf de 2 mL, centrifugar 12,000 x *g* y retirar el sobrenadante.
5. Agregar 1 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 estéril, agitar y volver a centrifugar; esto para lavar el micelio y retirar restos de PDB (repetir una vez más).
6. Inocular 40 mL de MM-Impranil con los 80 mg de micelio (peso húmedo) de las cepas T1.PL.1, A3.I.1 y A2.PP.5 en matraces de 125 mL, dejarlos incubar sin agitación a 25 °C, utilizar matraces con medio no inoculado como control.
7. Transcurridos los tiempos de incubación correspondientes, filtrar las muestras en papel Whatman No. 41, centrifugarlas a 12,000 x *g* por 15 min (centrífuga Sorvall RC5C Plus) y filtrar por Millipore de 0.45 µm para retirar restos de Impranil y conidias.
8. Realizar extracciones orgánicas para separar los productos de degradación de Impranil utilizando 3 extracciones con 10 mL de diclorometano para cada muestra con el objetivo de extraer los compuestos menos polares.
9. Dejar que las muestras lleguen a sequedad a temperatura ambiente. Una vez secas, resuspenderlas en 50 µL de diclorometano y metanol (1:1 v/v).
10. Para el análisis de CG-EM inyectar 1 µL en un cromatógrafo Agilent 6890N (columna DB-5MS, 5% fenil metil silicon, largo: 20 m, diámetro interno: 0.18 mm). El programa de temperatura para la estufa es el siguiente: temperatura inicial 40 °C (por tres min) aumento en 20 °C/min hasta 300 °C (por 15 min).



11. Realizar la identificación de los compuesto por Time of Flight Mass Spectrometry (TOF-MS) en un equipo LECO, modelo Pegasus 4D. Los compuestos fueron identificados comparando con la Librería NIST Mass Spec Data Center (2002 Library). Los compuestos identificados con un valor de similitud inferior a 850 se denominaron como compuestos relacionados al hit de la librería.

7.3. Concentración de proteínas extracelulares a partir de cultivos en MM-Impranil.

Para trabajar con las proteínas presentes en el medio extracelular de los cultivos de hongos en MM-Impranil es necesario separarlas de los residuos sólidos del medio y de las células, para luego concentrarlas. Esto se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Inocular 300 mL de MM-Impranil con 5 g de masa miceliar húmeda de cada uno de los hongos. Dejar un matraz con medio sin inocular.
2. Incubar por 6 semanas a 30 °C, tiempo suficiente para que el micelio crezca cubriendo toda la superficie del matraz.
3. Después de la incubación, filtrar el micelio en papel Whatman No. 41 y colectar el medio.
4. Centrifugar el medio a 15,000 x *g*, para sedimentar el Impranil remanente.
5. Filtrar el medio por membranas Millipore de 0.45 µm para retirar conidias y restos de Impranil.
6. Concentrar el medio (aproximadamente 300X) empleando centricones con membranas de corte de 10 kDa.
7. Cuantificar la proteína por el método de Bradford y utilizando una curva patrón de BSA.

7.4. Resolución de proteínas extracelulares por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).

La electroforesis es un método analítico semipreparativo en el que se separan las moléculas cargadas que migran bajo la influencia de un campo eléctrico dependiendo de su carga, masa molecular y estructura tridimensional. En el SDS-PAGE se emplea el detergente aniónico, dodecilsulfato de sodio (SDS), el cual se une a las proteínas por absorción no específica, desnaturizándolas y rompiendo las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria



confiriéndoles carga negativa, por lo que las proteínas migran al polo positivo separándose de acuerdo a su tamaño molecular (Laemmli, 1970).

1. Realizar el gel SDS-PAGE al 15 % (ver Anexo 1).
2. Cargar el primer pozo con 4 μ L de marcador de masa molecular Precisión Plus Protein Standars, Dual Color BIO-RAD).
3. Cargar 15 μ g de proteína de cada uno de los hongos en diferentes pozos con 5 μ L de amortiguador de carga y correr el gel en una cámara de electroforesis con amortiguador de corrida 1X (ver Anexo 1) a 120 V.
4. Una vez realizada la corrida, fijar las proteínas y teñirlas con solución de Coomassie (ver Anexo 1) por 12 h.
5. Desteñir con solución de destinción (ver Anexo 1) por 2 h para observar las bandas.

7.5. Escrutinio de actividades enzimáticas por ensayos de difusión radial en medios diferenciales.

Para conocer qué posibles actividades están involucradas en la degradación del Impranil, tomando como referencia los resultados de espectroscopía de FTIR previamente reportados por Álvarez-Barragán (2013), se realizó un análisis cualitativo de las actividades presentes en los concentrados proteicos extracelulares de los hongos, empleando ensayos de difusión radial que contienen substratos específicos para las actividades de interés. En este ensayo se colocan las enzimas concentradas en pozos realizados en los medios diferenciales dependiendo de la actividad que se requiera analizar.

1. Colocar en cajas Petri una fina capa de agar agua (2% de agar p/v, 5 mL) como base.
2. Agregar 10 mL de cada uno de los medios diferenciales para cada una de las actividades enzimáticas de interés.
3. Perforar pozos del medio diferencial y cargar con 50 μ g de cada uno de los concentrados proteicos extracelulares, dejar pozos para controles positivos y negativos.
4. Dejar incubar por 12 h a 30 °C. De acuerdo a la actividad, los medios a utilizar son los siguientes:
 - a) **Actividad ureasa:** medio urea de Christensen sólido sin peptona y glucosa (ver Anexo 1). Contiene urea y rojo de fenol como indicador. Un resultado positivo se observa como un cambio en la coloración de amarillo a rojo por



un aumento de pH provocado por la formación de amoníaco durante la hidrólisis de la urea. Cargar 0.04 U de Jack bean urease (Sigma No. Cat. U7752) como control positivo y 0.04 U, de la misma, hervida por 15 min como control negativo.

- b) Actividad esterasa:** medio mínimo con Tween20® y CaCl₂ (ver Anexo 1). Cuando se presenta acción enzimática de tipo esterasa, se genera hidrólisis del Tween20® lo que produce un alcohol y un ácido. Este último se asocia con una molécula de Ca²⁺ y causa un precipitado blanco. Cargar 0.05 U de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Sigma, No. Cat. 95608) como control positivo y hervir una de las muestras con actividad, por 15 min como control negativo.
- c) Actividad proteasa:** medio con agar-agua y leche descremada al 1% (ver Anexo 1). La leche descremada se aclara al ser hidrolizada por lo que los resultados positivos se aprecian como halos transparentes alrededor del pozo. Como control positivo se utilizan 10 µg de proteinasa K (Sigma, No. Cat 95608) y como control negativo 10 µg de proteinasa K hervida por 15 min.

7.6. Zimografías de las actividades enzimáticas encontradas.

La zimografía fue creada en 1962 por Gross y Lapière. Es un método acoplado a un SDS-PAGE que permite visualizar la presencia de actividad enzimática ya sea por la aparición de un producto o por la desaparición de un sustrato (Vandooren *et al.*, 2013)

Para determinar el tamaño de las proteínas con las actividades enzimáticas de interés se realizaron zimografías en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), de acuerdo a los siguientes protocolos:

7.6.1. Actividad ureasa:

5. Preparar un gel SDS-PAGE al 10 % y cargar 15 µg de cada una de las muestras con 5 µL de amortiguador de carga (ver Anexo 1), 4 µL de marcador molecular (Precisión Plus Protein Standards, Dual Color de BIO-RAD) y el control positivo (0.04 U de Jack bean urease).
6. Correr el gel en la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida (ver Anexo 1) a 120 V.



7. Una vez terminada la corrida, lavar el gel con agua desionizada e incubar con Tritón X-100 al 2.5% (Sigma, No. Cat. T8787) por 25 min (dos veces) para eliminar el SDS y favorecer la renaturalización de las proteínas *in situ*.
8. Incubar por una hora en amortiguador de acetatos 5 mM pH 6.5 frío con el objetivo de proporcionar las condiciones óptimas para la actividad de las proteínas.
9. Revelar el zimograma de acuerdo con la metodología reportada por Mora *et al.* (2005) que consiste en agregar una solución con urea 0.1 M (como sustrato), nitroazul de tetrazolio (NBT) (como indicador) 0.08% y DTT 0.5 mM (como catalizador). La hidrólisis de la urea genera protones que interactúan con los enlaces diamina del NBT generando formazán que tiene una coloración negro azulado (Figura 4).

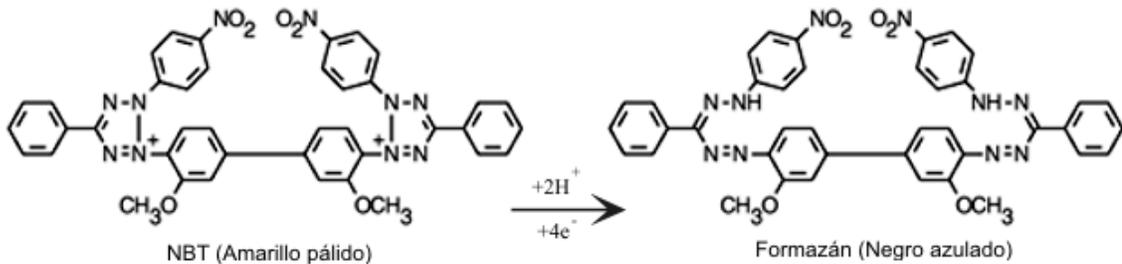


Figura 4. Reacción de reducción del nitroazul de tetrazolio para generar formazán que tiene una coloración negro azulado (Choia *et al.*, 2006).

7.6.2. Actividad proteasa:

1. Preparar un SDS-PAGE al 15% que contenga en el gel separador 0.2% de caseína no hidrolizada de acuerdo con la metodología reportada por (Anitha y Palanivelu, 2013).
2. Cargar el gel con 15 μ g de cada una de las muestras con 5 μ L de amortiguador de carga, emplear 10 μ g de Proteinasa K (Sigma, No. Cat. 95608) como control positivo. Utilizar 4 μ L de marcador molecular (Precisión Plus Protein Standards, Dual Color de BIO-RAD).
3. Después de la corrida, incubar el gel un par de veces en 20 mL de 1% v/v de Tritón X-100 por 30 min para retirar el SDS, lavar con agua destilada para retirar el exceso de Tritón e incubar 60 min en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 6.5.



4. Teñir el gel con 50 mL de solución de Azul de Coomassie (ver Anexo 1) y desteñir con 50 mL de solución de ácido acético-metanol. El Coomassie se fija a las proteínas y donde haya acción de las proteasas se observará una banda incolora.

7.6.3. Actividad esterasa:

1. Correr el gel SDS-PAGE al 15% con 15 µg de cada una de las muestras con 5 µL de amortiguador de carga, 4 µL del marcador molecular (Precisión Plus Protein Standards, Dual Color de BIO-RAD) y un control positivo, en este caso la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (0.05 U) (Sigma, No Cat 95608).
2. Después de separar las proteínas extracelulares, lavar el gel con agua desionizada e incubar con 20 mL de 2.5% de Tritón X-100 (v/v) por 25 min (dos veces) para eliminar el SDS y permitir la renaturalización *in situ* de las proteínas.
3. Preparar una solución 1.6 mM de 4-metilumbeliferil butirato a partir de un stock del mismo 50 mM (BioChemica, No. Cat. 19362) utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, No. Cat. 200-664-3) como disolvente.
4. Agregar el sustrato al gel e incubar 30 min con agitación media a temperatura ambiente para poner de manifiesto la actividad esterasa sobre el enlace éster del butirato, generando el producto fluorescente 4-metilumbeliferona, que se revela con luz ultravioleta (UV) (Díaz *et al.*, 1999) (Figura 5).

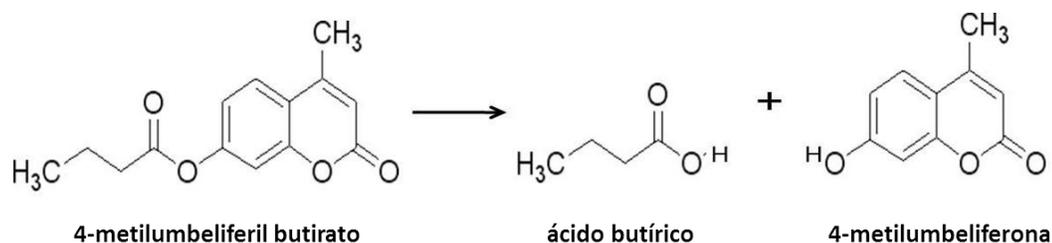


Figura 5. Reacción de hidrólisis del 4-metilumbeliferil butirato y sus productos: ácido butírico y 4-metilumbeliferona (Díaz *et al.*, 1999).

7.7. Determinación de la actividad “impranilasa”.

Para identificar a la o las proteínas que tengan la capacidad de aclarar el Impranil (actividad “impranilasa”) se emplearon diferentes estrategias que permitieron ir



analizando y seleccionando los concentrados proteicos que presentaran dicha actividad.

7.7.1. Ensayo de difusión radial.

Una vez obtenidos los concentrados de proteínas extracelulares de MM-Impranil, se realiza un ensayo de difusión radial en MM-Impranil sólido al 0.5% para saber si los concentrados presentan actividad “impranilasa”.

1. Colocar en cajas Petri una fina capa de agar agua (2% de agar, 5 mL) como base.
2. Agregar 10 mL de MM-Impranil que tenga en su composición 23.7 mg/mL de agar agua.
3. Perforar pozos del medio diferencial y cargar con 50 μ g de cada uno de los concentrados proteicos extracelulares. Utilizar proteína hervida por 15 min de uno de los concentrados proteicos como control negativo.
4. Dejar incubar por 12 h a 30 °C. El Impranil, que es un barniz de poliéster poliuretano, clarifica al ser degradado por lo que un resultado positivo se verá como halos de aclaramiento alrededor de los pozos.

7.7.2. Zimografía de actividad “Impranilasa”.

Para determinar cuáles son las proteínas presentes en los concentrados proteicos con capacidad de hidrolizar el Impranil, se montó un zimograma para visualizar el aclaramiento del Impranil *in situ*. Para esto se utilizó el protocolo modificado de Ruiz *et al.* (1999) en el cual se corre un SDS-PAGE y se le sobrepone un gel de agarosa con Impranil, permitiendo que las proteínas permeen del SDS-PAGE al gel con Impranil y se observen bandas de aclaramiento sobre las proteínas con actividad.

1. Correr un gel SDS-PAGE al 15%, cargar en los pozos 15 μ g de los concentrados proteicos con 5 μ L de amortiguador de carga y utilizar 8 μ L de marcador molecular (Precisión Plus Protein Standards, Dual Color de BIO-RAD).
2. Después de la corrida electroforética, lavar el gel con Tritón X-100 al 2.5% (v/v) para retirar el SDS del gel, dos veces por 20 min cada una
3. Preparar 30 mL de agarosa al 1.4% e Impranil al 1%.
4. Sobreponer al gel de acrilamida el gel de agarosa mientras aún esté líquido y una vez que solidifique agregar sobre los geles 20 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 para mantener la humedad.



5. Dejar incubar ambos geles sobrepuestos por 12 h en el amortiguador de fosfatos. Así las enzimas estarán en contacto con el Impranil. Las proteínas con actividad “impranilasa” aclararán el Impranil y en donde haya actividad se observarán bandas claras en el gel de agarosa de acuerdo al tamaño de la enzima.

7.7.3. SDS-PAGE de doble dimensión acoplado a zimografía para actividad esterasa.

Para conocer el punto isoeléctrico de proteínas con actividad esterasa se realizó un gel SDS-PAGE de doble dimensión acoplado a zimografía para esterasa.

Preparación de la muestra:

1. Utilizar 500 µg de proteína y cambiar el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 por el amortiguador IEF que contiene: 8 M Urea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% anfólitos de carga (MM de 3 a 10), 0.002% azul de bromofenol; utilizando centricones de corte de 10 kDa.
2. Correr SDS-PAGE al 15% acoplado a zimografía de “impranilasa” (incluyendo un carril con la muestra del concentrado proteico en amortiguador de fosfatos como control positivo), para corroborar que este tratamiento no haya provocado pérdida de las actividades de interés.

SDS-PAGE 2D: Las muestras se analizaron en la USAI (Unidad de servicios de apoyo a la investigación, FQ-UNAM) en donde se siguió el siguiente protocolo:

1. Utilizar 500 µg de proteína para una tira de 11 cm para correr la primera dimensión en la cual se separan las proteínas por su punto isoeléctrico en un gradiente de pH en una tira IPG. Debido a que se desconoce la naturaleza de las proteínas con la capacidad de degradar Impranil, utilizar un intervalo de pH de la tira IPG de 3 a 10.
2. Terminando el programa de focalización la tira se lava con 2 mL de solución de reducción con agitación por 15 min a temperatura ambiente.
3. Posteriormente realizar la corrida de la segunda dimensión en la cual se separan de acuerdo a su masa molecular. Para esto se utiliza un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS con un tamaño de 16x20 cm.
4. Realizar la zimografía para actividad esterasa (de acuerdo al protocolo descrito anteriormente) para determinar que proteínas en el gel tienen la actividad de interés.



7.8. Cuantificación de la degradación de Impranil por los concentrados proteicos y cálculo de la actividad específica.

Para determinar cuál de todas las cepas presenta mayor actividad “impranilasa”, se realizaron análisis cuantitativos para determinar la actividad específica (actividad generada por una cierta concentración de proteína durante un tiempo determinado).

Para cuantificar la degradación de los concentrados proteicos, se realizó un ensayo espectrofotométrico a una $DO_{600\text{ nm}}$ para medir el aclaramiento del Impranil por turbidimetría.

1. En tubos de reacción, colocar 100 μL de MM-Impranil al 1%, 770 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM e iniciar la reacción con 30 μg de cada uno de los concentrados proteicos junto con un control sin proteína.
2. Dejar incubando por 30 min a 30 °C y medir su $DO_{600\text{ nm}}$.
3. Obtener el porcentaje de degradación comparando estos datos con una curva patrón previamente elaborada, que relaciona la $DO_{600\text{ nm}}$ con concentraciones conocidas de Impranil.

7.8.1. Cálculo de la actividad específica.

Para poder comparar la actividad “impranilasa” de los 8 concentrados proteicos extracelulares de manera cuantitativa y así determinar qué concentrados presentan mayor actividad, se debe calcular la actividad específica.

1. Obtener curvas de actividad “impranilasa” (dicha actividad se determina por aclaramiento de Impranil a una $DO_{600\text{ nm}}$) contra tiempo, con una concentración de sustrato fija y diferentes concentraciones de enzima.
2. Colocar en un tubo de reacción para tener un volumen final de 1 mL, amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y 100 μL de MM-Impranil al 1% (equivalente a 0.1 mg de Impranil).
3. Iniciar la reacción a diferentes concentraciones de proteína: 5, 15, 30, 45 y 60 $\mu\text{g/mL}$
4. Medir la clarificación del medio para cada una de las concentraciones de proteína de cada concentrado proteico en intervalos de 30 s durante 6 min.
5. Realizar los cálculos pertinentes para obtener la actividad específica.



7.9. Purificación e identificación de la enzima con actividad “impranilasa”.

La zimografía para actividad “impranilasa” mostró en el concentrado proteico de la cepa A3.I.1, una proteína de 20 kDa con la actividad de interés la cual fue purificada empleando los siguientes pasos.

7.9.1. Cromatografía de exclusión molecular.

La cromatografía de exclusión está basada en la separación de los componentes de una muestra, generalmente mediante el empleo de una columna que contiene una resina porosa, la cual se denomina fase estacionaria. Los compuestos son arrastrados por una fase móvil (en este caso líquida) a través de los poros de la resina, permitiendo que las moléculas de mayor tamaño migren de manera más rápida por lo que la separación es dependiente del tamaño de los componentes de la mezcla. Para realizar el primer paso de purificación se seleccionó este tipo de cromatografía y se realizó de acuerdo a lo siguiente:

- 1.** Montar una columna (1 m de alto y 5 cm de diámetro) con la resina Superdex™ 200 (prep grade) (Amersham Biosciences, No. Cat. 17-1043-01) cuya resolución puede separar proteínas cuyas masas moleculares están entre 10 y 600 kDa, utilizando un volumen de 80 mL de resina.
- 2.** Lavar con 10 volúmenes de columna con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5, para equilibrar el sistema, con una velocidad de flujo de 500 μ L/min, a 4 °C.
- 3.** Cargar 6 mg del concentrado proteico (en 3 mL del mismo amortiguador) y eluir la muestra con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 a una velocidad de flujo de 1 mL/min, recolectando 80 fracciones.
- 4.** Analizar las fracciones de acuerdo a su concentración de proteína a una DO_{280nm} y su actividad “impranilasa” en un ensayo en MM-Impranil líquido (explicado anteriormente) en donde se cuantifica el Impranil remanente a DO_{600nm} por turbidimetría.
- 5.** Realizar SDS-PAGE al 15% con las distintas fracciones que presentan la actividad y teñirlo con solución de azul de Coomassie para observar el patrón de proteínas comparándolas con el concentrado proteico total y acoplar el gel a zimografía para “impranilasa” para comprobar que la actividad se mantuvo íntegra.
- 6.** Las fracciones que mostraron la actividad de interés fueron juntadas.



Para determinar la masa molecular de la proteína de interés se realizó una curva de calibración en la columna utilizando marcadores de masa molecular definidos (BIO-RAD No. Cat. 151-1901) que contiene moléculas de masas moleculares definidas: tioglobulina (670 kDa), gamma globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) y vitamina B12 (1.35 kDa).

1. Cargar la columna con 100 µg del marcador diluído en 3 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5.
2. Realizar la corrida utilizando como fase móvil amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y una velocidad de flujo de 1 mL/min, de tal forma que las condiciones sean iguales a las utilizadas en la purificación de la muestra.
3. Colectar 80 fracciones y determinar la concentración de las mismas espectrofotométricamente (280 nm).
4. Graficar los tiempos de retención contra el logaritmo de las masas moleculares de los marcadores para obtener la ecuación que permita determinar la masa molecular de la proteína de interés.

7.9.2. Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico permite separar una muestra en función de su carga. La fase estacionaria es una resina cargada ya sea positiva o negativamente (resina aniónica o catiónica respectivamente). Las moléculas de interés de la muestra interactúan con las moléculas de la resina; de forma reversible, reteniéndolas y separándolas del resto. Las proteínas se recuperan de la columna cuando se eluyen con un amortiguador con diferente pH o fuerza iónica al amortiguador de la muestra; ya que estos compiten por los sitios de unión a la fase sólida.

En el gel SDS-PAGE 2D se observó que la actividad “imparnilasa” se presentaba distribuida en varias bandas, todas del mismo tamaño pero con diferentes pIs, los cuales se encontraban en un intervalo entre 3 y 5. Para realizar la cromatografía de intercambio iónico se seleccionó una columna de intercambio aniónico con un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 en el cual la proteína está desprotonada confiriéndole carga negativa a los grupos funcionales los cuales interactuarían con las cargas positivas de la fase sólida.

Se seleccionó una columna HiScreen Capto Q que contiene una amina cuaternaria como ligando, de 4.7 mL de capacidad, con un rango de estabilidad de pH de 2-12 y



una capacidad iónica de 0.16-0.22 mmolCl⁻/mL medio, y se uso en el equipo de cromatografía líquida ÄKTA avant and UNICORN 6.1 (GE Healthcare Life Sciences, No. 28-981761 AA) disponible en la USAI de la Facultad de Química-UNAM.

1. Lavar la columna con agua desionizada y posteriormente activarla con el amortiguador de elución (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5) con un volumen equivalente a 10 veces el volumen de la fase sólida (4.7 mL).
2. Cargar la muestra (3 mg) y lavar con el amortiguador de elución, adicionando 1 volumen de la columna para que las proteínas que no interaccionan con la resina salgan de la columna.
3. Comenzar a aplicar un gradiente de NaCl con la mezcla de las soluciones de NaCl 1 M y el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5.
4. Recolectar las fracciones y medir la DO_{214 nm} y DO_{280 nm}.
5. Realizar geles SDS-PAGE al 15% y teñirlos con Coomassie para ver el patrón de proteínas y cuantificar la degradación Impranil de las fracciones de acuerdo al protocolo de cuantificación de la degradación en medio líquido con Impranil (descrito anteriormente).

7.9.3. Identificación de la enzima con actividad “impranilasa” por LC/MS/MS.

La LC/MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) es una técnica espectroscópica analítica que separa las muestras por cromatografía y está acoplada a un espectrómetro de masas que puede identificar desde moléculas pequeñas hasta macromoléculas, en este caso proteínas. Se fundamenta en la generación de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, las cuales se analizan de acuerdo a su relación masa/carga (m/z).

Para la preparación de la muestra se realizó lo siguiente:

1. Correr un SDS-PAGE al 15% con las fracciones que mostraron mayor actividad “impranilasa”, resultantes de la cromatografía de intercambio aniónico.
2. Teñir con Coomassie y cortar las bandas presentes alrededor de 20 kDa, colocar los pedazos de gel en un tubo Eppendorf de 0.6 mL y lavar dos veces con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5.

Las muestras fueron analizadas en la “Medical School Proteomics and Mass Spectrometry Facility, University of Massachussets” donde se llevó a cabo un análisis espectrométrico por LC/MS/MS en Q Exactive para la identificación de la proteína. La muestra se digirió en 75 µL de una solución que contiene 4 ng/µL de



tripsina o quimiotripsina, en 0.01% de surfactante (Promega): 50 mM de bicarbonato de amonio. Previo a la inyección de la muestra en LC/MS/MS, las muestras se disolvieron en 20 μ L de una solución que contenía 0.5% de acetonitrilo y 0.1% de ácido tricloroacético.

Se inyectó una alícuota de 2 μ L en la columna C18 (2 cm x 100 μ m) para concentrarla y desalarla. Los péptidos se eluyeron en una columna analítica C18 (75 μ m x 25 cm) con un gradiente lineal de 95% de fase móvil A (0.1% de ácido fórmico en agua) a 35% de fase móvil B (0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo) en un periodo de 40 min a una velocidad de flujo de 300 nL/min en un sistema Waters Nano Acquity UPLC. La adquisición de los datos se realizó en un espectrómetro de masas Q Exactive (Thermo Scientific). Los datos fueron procesados con el programa Proteome Discoverer (versión 1.4) antes de compararlos con el programa Mascot Server (versión 2.5) contra base de datos Uniprot. Los resultados de la búsqueda fueron almacenados en el programa Scaffold Viewer (Proteome Software, Inc.) para realizar la evaluación de la probable identidad de la proteína.

7.10. Caracterización cinética de la “impranilasa” usando Impranil como sustrato.

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima por el sustrato, en este caso la velocidad de degradación de Impranil por la proteína de interés y las condiciones óptimas de reacción.

7.10.1. Determinación de la linealidad de la reacción con respecto a la concentración de enzima.

1. En un volumen de reacción de 1 mL colocar amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y 100 μ L de MM-Impranil al 1% (equivalente a 0.1 mg de Impranil).
2. Iniciar la reacción con diferentes concentraciones de la proteína pura: 0.125, 0.250, 0.375 y 0.5 μ g/mL
3. Monitorear la reacción por turbidimetría a $DO_{600\text{ nm}}$ por 3 min cada 30 s.
4. Realizar los cálculos pertinentes para obtener la actividad específica.



7.10.2. Determinación de la temperatura óptima de reacción.

Se determinó la temperatura en la que la proteína presenta mayor actividad, se seleccionaron varias temperaturas en las cuales se realizaron los ensayos enzimáticos: 10, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 °C.

1. Para cada una de las reacciones, la concentración de proteína previamente establecida y el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 se colocan en un tubo. En otro tubo colocar Impranil 100 μ L al 1% equivalente a 0.1 mg (la suma del contenido de ambos tubos da como resultado un volumen de reacción igual a 1 mL).
2. Dejar ambos tubos preincubando independientemente por 15 min a la temperatura de reacción requerida.
3. Dar inicio a la reacción añadiendo el sustrato a la mezcla y monitorear por turbidimetría la degradación de Impranil a $DO_{600\text{ nm}}$ en el equipo Agilent 89090A (que cuenta con control de temperatura) previamente puesto a la temperatura a la que se desea realizar la reacción.
4. Obtener gráfico de temperatura óptima.

7.10.3. Determinación del pH óptimo de reacción.

Se seleccionaron varios pHs para realizar los ensayos enzimáticos: 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

1. Para cada una de las reacciones se colocó la concentración de proteína y se ajustó la temperatura óptima previamente establecida.
2. Como sustrato se utilizó 100 μ L de Impranil al 1% equivalente a 0.1 mg.
3. Para ajustar el pH deseado, utilizar el amortiguador Macilvaine que consta de una mezcla de ácido cítrico y fosfato monobásico de sodio, dependiendo de las concentraciones utilizadas, el cuál amortigua en un intervalo de pH entre 2.2 y 8.
4. Dar inicio a la reacción añadiendo el sustrato a la mezcla y monitorear por turbidimetría la degradación de Impranil a $DO_{600\text{ nm}}$.
5. Obtener gráfico de pH óptimo.

7.10.4. Determinación de la actividad específica.

Para conocer la actividad específica de la proteína pura se realizaron curvas con la temperatura y el pH en donde la proteína mostró mayor actividad. La concentración de proteína a utilizar se determinó con base en la curva de actividad específica, seleccionando 0.25 μ g/mL. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo a lo siguiente:



1. Preparar 10 mL de una solución stock de Impranil al 1% (equivalente a 1 mg/mL de Impranil) en amortiguador Mcllvaine pH 7.
2. Utilizar las concentraciones de Impranil equivalentes a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mg/mL, preparar las reacciones de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación de muestras para las reacciones de degradación de Impranil a diferentes concentraciones de PU.

Muestra	Amortiguador Mcllvaine pH 7	μL de proteína para tener 0.25 μg	μL de solución de Impranil	Concentración final de Impranil (μg)
1	860	50	90	90
2	870	50	80	80
3	880	50	70	70
4	890	50	60	60
5	900	50	50	50
6	910	50	40	40
7	920	50	30	30
8	930	50	20	20

3. Iniciar la reacción agregando el sustrato y monitorear su densidad óptica por turbidimetría ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$) por 3 min cada 30 s a 25°C.
4. Repetir cada concentración por triplicado.
5. Realizar la curva y los cálculos pertinentes.

7.11. Caracterización cinética de la “impranilasa” usando *p*-nitrofelin acetato como sustrato.

Se comparó la eficiencia catalítica de la proteína de interés contra las ya reportadas, se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos de la misma utilizando el sustrato comercial *p*-nitrofenil acetato (Alfa Aesar® Lote: 10130856) a la temperatura y pH óptimos previamente obtenidos.

El ensayo de actividad se fundamenta en la hidrólisis del *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) ya que genera como productos ácido acético, *p*-nitrofenol y *p*-nitrofenóxido (Figura 6). El *p*-nitrofenóxido puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una $\text{DO}_{405\text{ nm}}$. Debido a que el *p*-NPA se hidroliza en presencia de agua, se debe disolver en acetonitrilo (CH_3CN).



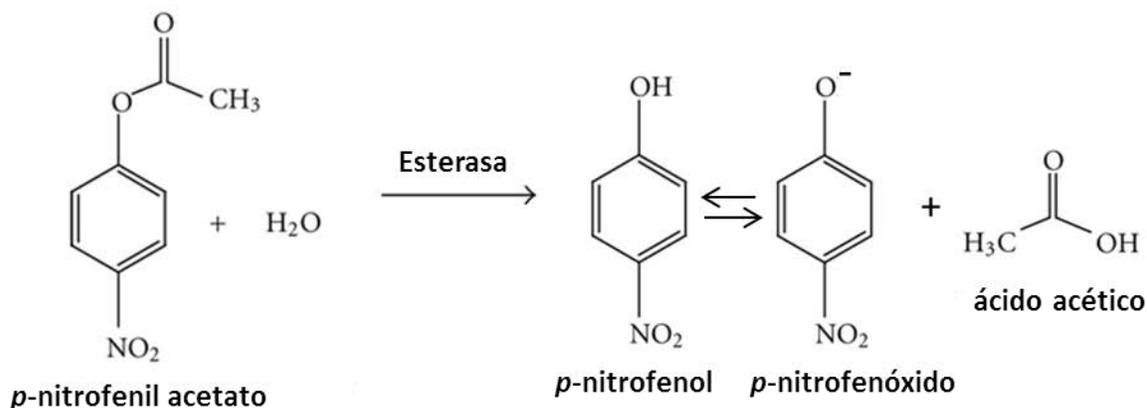


Figura 6. Reacción de hidrólisis del *p*-NPA para determinar actividad esterasa espectrofotométricamente (DO_{405 nm}).

7.11.1. Curva patrón para cálculo *p*-NPA hidrolizado.

Para comparar la DO de las muestras contra la concentración del *p*-NPA que se ha hidrolizado, se realizó una curva con diferentes concentraciones de *p*-NPA de acuerdo con lo siguiente:

1. Preparar una solución de *p*-NPA 100 mM al momento de realizar la curva, diluyendo con acetonitrilo. Cubrirla de la luz y mantenerla en frío.
2. Preparar las muestras en un volumen de reacción de 1 mL, en tubos Eppendorf, de acuerdo a la Tabla 5.



Tabla 5. Preparación de las muestras para realizar la curva patrón.

Muestra	Amortiguador Mcllvaine pH 7 (μL)	μL de la solución de <i>p</i> -NPA 100 mM	μmoles finales <i>p</i> -NPA
1	1000	0	0
2	997.5	2.5	0.25
3	995	5	0.5
4	990	10	1
5	985	15	1.5
6	980	20	2
7	975	25	2.5
8	970	30	3

3. Incubar las muestras a 25 °C por 12 h y determinar su $\text{DO}_{405 \text{ nm}}$.

7.11.2. Determinación de la linealidad de la reacción con respecto a la concentración de enzima.

1. Preparar una solución de *p*-nitrofelil acetato 100 mM al momento de llevar a cabo las reacciones diluyendo el reactivo en acetonitrilo. Cubrirla de la luz y mantenerla en frío.
2. En un volumen de reacción de 1 mL colocar 900 μL de amortiguador Mcllvaine pH 7 (ver Anexo 1) y diferentes cantidades de la proteína pura: 0.065, 0.125, 0.25 y 0.375 μg diluida en 50 μL del mismo amortiguador.
3. Iniciar la reacción adicionando 50 μL de la solución con el sustrato y monitorear la $\text{DO}_{405 \text{ nm}}$ por 3 min cada 15 s.
4. Obtener la actividad específica.

7.11.3. Determinación de los parámetros cinéticos.

Una vez determinada la concentración de enzima que permitió que la reacción se mantuviera lineal por el tiempo de reacción empleado, se llevaron a cabo las reacciones con diferentes concentraciones de sustrato para calcular los parámetros cinéticos:

1. Preparar una solución de *p*-NPA 100 mM en acetonitrilo (ver Anexo 1). Cubrir la solución de la luz y mantenerla en frío.
2. Las cantidades de *p*-NPA a usar son las siguientes: 2, 3, 4, 5, 6 y 7 μg en un volumen de reacción de 1 mL.



3. Utilizar los siguientes reactivos: amortiguador Mcllvaine pH 7, concentración de proteína de interés diluida en 50 μL del mismo amortiguador y diferentes concentraciones de la solución de *p*-NPA de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 6. Preparación de muestras para las reacciones de hidrólisis de *p*-NPA a diferentes concentraciones de sustrato.

Muestra	Amortiguador Mcllvaine (μL)	Proteína (μL) (Eq. a 0.125 μg)	Solución de <i>p</i> -NPA (μL)	μg <i>p</i> -NPA finales
1	930	50	20	2
2	920	50	30	3
3	910	50	40	4
4	900	50	50	5
5	890	50	60	6
6	880	50	70	7

4. Iniciar la reacción adicionando la solución de *p*-NPA y monitorear la $\text{DO}_{405 \text{ nm}}$ por 3 min cada 15 s. Estos valores son preliminares.
5. Debido a la hidrólisis del reactivo en agua, repetir las curvas de la Tabla 6 sustituyendo el volumen de la proteína por amortiguador. Estos son los valores de ajuste.
6. Para obtener los valores de hidrólisis del sustrato por acción de la proteína, restar los valores de ajuste a los valores preliminares.
7. Calcular los μmoles de *p*-NPA que reaccionaron de acuerdo a la curva patrón.
8. Obtener los parámetros cinéticos.



8. Resultados y discusión

8.1. Análisis de productos de degradación de Impranil presentes en el medio de cultivo de hongos degradadores de PU.

Para conocer los productos de degradación del Impranil generados por la actividad biodegradativa de los hongos, se realizó un análisis de los compuestos extracelulares en MM-Impranil por CG-EM de tres diferentes hongos: *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 con el mayor porcentaje de degradación en líquido, *C. tenuissimum* A3.I.1 con un porcentaje de degradación intermedio y *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1 con el menor porcentaje de degradación, además de un control sin inocular.

En la Figura 7 se muestran los cromatogramas de cada una de las muestras tomadas (el control y los medios tratados con los hongos) a diferentes tiempos (0, 7 y 14 días), donde están señalados los cambios de los compuestos significativos relacionados con la composición y productos de degradación del Impranil. En la Tabla 7 se presenta la identificación de los compuestos y el resumen de los cambios en porcentaje de área de cada una de las muestras. Para la identificación por EM se utilizó como criterio el valor de similitud, cuando los compuestos presentaron un valor de similitud inferior a 800 se consideró que eran compuestos relacionados a la molécula identificada (“library hit”) (ver Anexo 2).

En todas las muestras se encontraron moléculas que tienen predominantemente grupos funcionales del tipo: éster, diisocianato y alcohol; lo cual concuerda con los compuestos esperados dado lo que se conoce de la estructura del PS-PU.



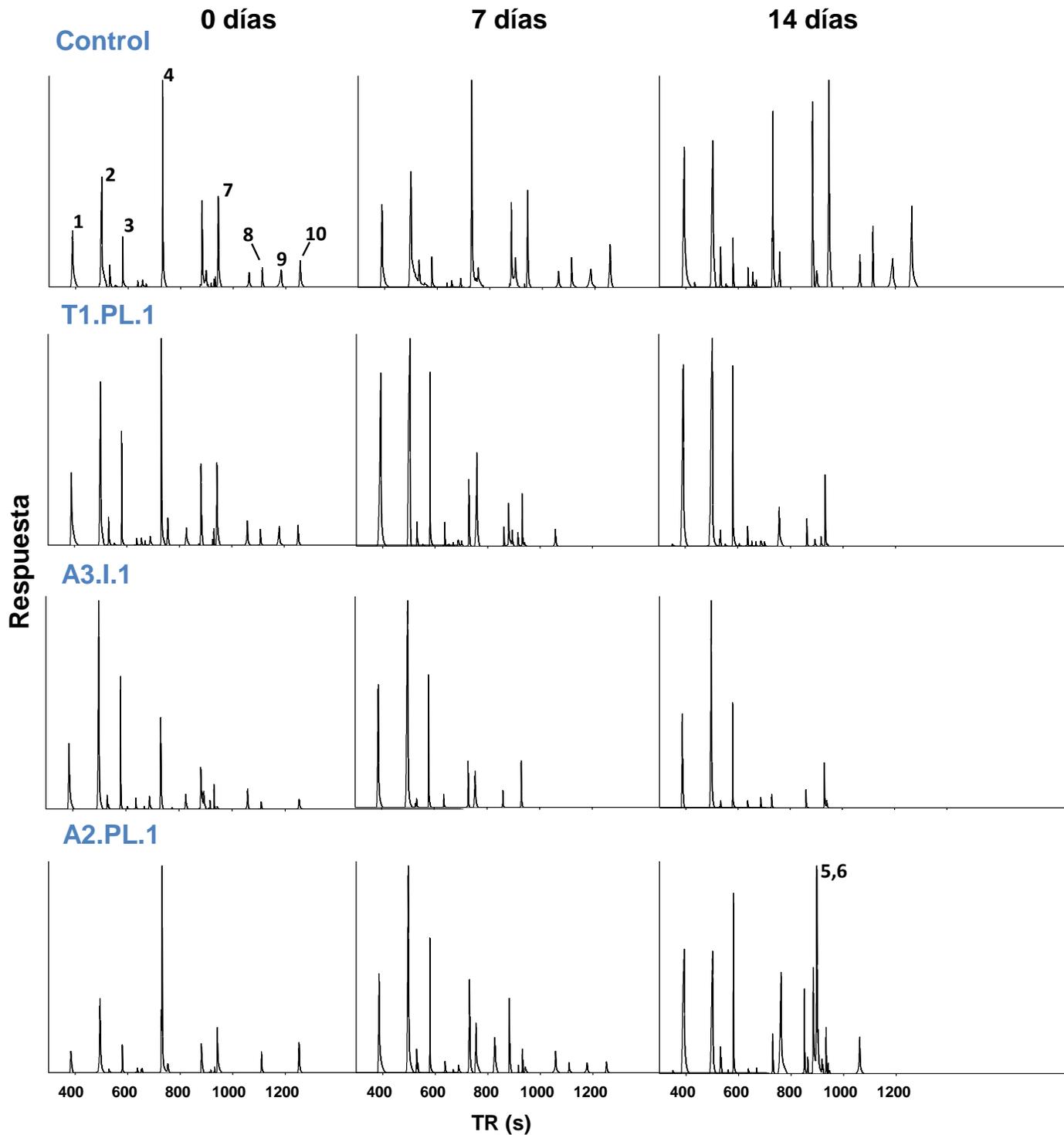


Figura 7. Cromatogramas de los compuestos identificados por CG-EM. Se muestran los compuestos presentes en cada una de las muestras de MM-Impranil inoculadas con las cepas *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1, *C. tenuissimum* A3.I.1, *A. fumigatus* A2.PL.1 y un control sin inocular, a diferentes tiempos (0, 7 y 14 días). Los números de picos de interés están relacionados con los compuestos de la Tabla 7. TR: tiempo de retención.



Tabla 7. Identificación por CG-EM de algunos compuestos presentes en el MM-Impranil tratado con hongos y en el control sin inocular, a diferentes tiempos (0, 7 y 14 días).

No.	TR (s)	Compuesto	% ÁREA CONTROL			% ÁREA T1PL1			% ÁREA A3I1			% ÁREA A2PL1		
			T0	T7	T14	T0	T7	T14	T0	T7	T14	T0	T7	T14
1	390.53	2,2-dimetil-1,3-propanediol	9.8	9.4	13.0	11.7	25.9	30.5	14.4	22.3	22.4	7.3	18.5	16.3
2	503.39	Hexano-1,6-diol	19.6	18.5	18.1	24.7	40.0	39.9	33.2	49.2	46.8	19.8	16.6	13.7
3	580.1	hexano, 1,6-diisocianato	3.2	1.7	1.0	5.6	7.1	9.8	7.4	8.9	10.6	2.8	20.5	6.1
4	731.53	Relacionado al ciclohexil ciclohexano carboxilato	14.9	14.4	13.5	13.6	3.6	-	10.3	3.8	2.0	25.9	18.2	1.9
5	897.26	Relacionado al etil linoleato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.7
6	898.02	Relacionado al decil oleato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.0
7	946.74	Relacionado al ácido adípico di(oct-4-il éster)	11.3	9.5	13.5	8.9	-	-	6.8	-	-	11.8	-	-
8	1110.59	Relacionado al tridecan-6-ol	2.2	2.4	2.4	2.1	-	-	1.1	-	-	3.6	0.7	-
9	1180.68	Relacionado al tetradecan-3-il prop-2-enoato	5.2	4.1	4.5	5.3	-	-	2.9	4.2	7.6	3.3	4.0	-
10	1260.5	Relacionado al ciclohexano (1-metil-etil)	4.6	5.3	8.0	3.3	-	-	3.6	-	-	4.7	3.6	-

 Aumenta o aparece

 Disminuye o desaparece

 No cambia

 No detectado

El análisis de las moléculas presentes en el control muestra que la mayoría de los compuestos permanecen estables durante la incubación en el tiempo estudiado, a excepción del pronunciado aumento del compuesto relacionado al ciclohexano (pico 10) el cual se genera posiblemente por la hidrólisis espontánea de otros compuestos durante la incubación. Esto indica que mayoritariamente el polímero es estable en el medio y no es afectado por las condiciones del experimento.

De manera general, en el caso de las muestras tratadas con los hongos a los 14 días, se observó una disminución de compuestos que tienen grupos éster: compuesto relacionado al ciclohexil ciclohexano carboxilato (pico 4), compuesto relacionado al ácido adípico diciclohexil éster (pico 7) y al compuesto relacionado al tetradecan-3-il prop-2-enoato (9); implicando la actividad hidrolítica de las



proteínas generadas por los hongos sobre estos compuestos. Esto sugiere que una de las principales enzimas responsables de la degradación tiene actividad esterasa.

A su vez, se observa que hay aumento en los compuestos que tienen grupos alcohol (picos 1 y 2) y en el hexano, 1,6-diisocianato (pico 3), estos compuestos se destacan debido a que son precursores en la síntesis de PU y su aumento implica ruptura del enlace uretano. Con este sistema es posible recuperar los precursores los cuales se pueden utilizar para sintetizar otras moléculas de PU. Desde hace tiempo se sabe que la recuperación y reciclaje de poliols es posible por medio de glicólisis de poliuretano (Braslaw y Gerlock, 1984). Recientemente se ha reportado que se pueden recuperar poliéster poliols a partir de la glicólisis del PET para la síntesis de espumas de poliuretano (Rossi *et al.*, 2003). Por otro lado se ha propuesto un mecanismo para reciclar el exceso de diisocianato que se genera durante la síntesis de PU, para la fabricación de otros polímeros (Yong *et al.*, 2013). Sin embargo, estas técnicas requieren el uso de procesos térmicos y químicos lo que genera importantes gastos, por lo que su recuperación utilizando hongos filamentosos podría ser un sistema sustentable, ecológico y económico.

La disminución del hexano 1,6-diol (pico 2), que ocurre cuando el medio es tratado con *A. fumigatus* A2.PL.1 se puede deber a que el hongo podría estar utilizando también este compuesto como fuente de carbono. En la Figura 8 se muestran las estructuras de las moléculas que presentaron dichos cambios.

Es interesante destacar que cuando el PU se trata con el hongo *A. fumigatus* A2.PL.1, se genera una importante cantidad de un compuesto relacionado al etil linoleato (pico 5) y un compuesto relacionado al decil oleato (pico 6) los cuales tienen un uso en la industria cosmética (Villalobos-Hernandez y Muller-Goymann, 2006).



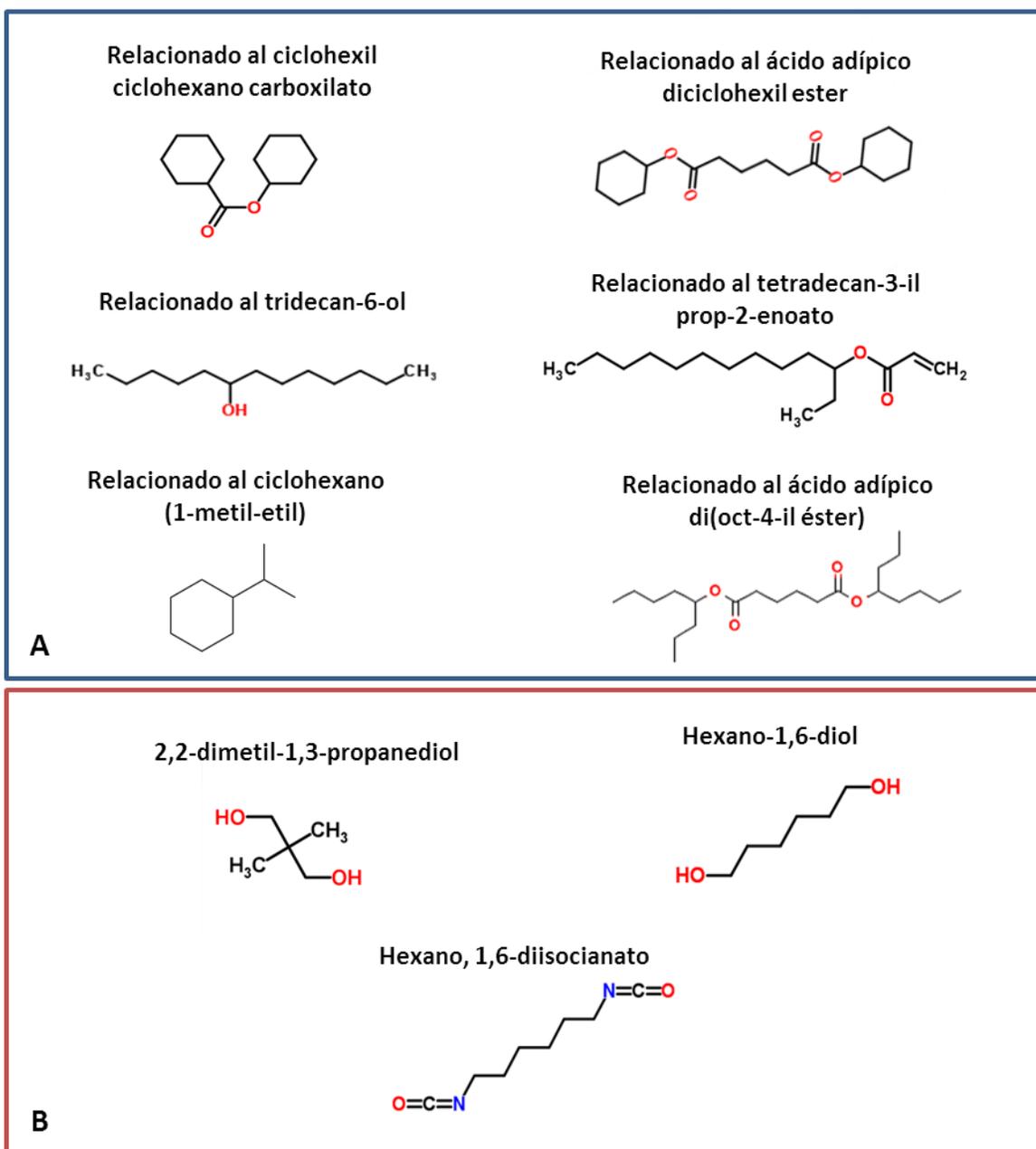


Figura 8. Estructuras de los compuestos identificados por CG-EM. Se muestran los compuestos que presentaron cambios a los 14 días de incubación cuando el MM-Impranil fue inoculado con las cepas *C. cladosporioides* T1.PL.1, *C. tenuissimum* A3.l.1 y *A. fumigatus* A2.PL.1, comparándolas con un control sin inocular (ver Tabla 7). **A)** Compuestos que presentaron disminución o desaparición. **B)** Compuestos que presentaron aumento.



8.2. Obtención y cuantificación de proteínas extracelulares de los hongos cultivados en MM-Impranil.

Para conocer qué proteínas extracelulares participan en la degradación de PU, se concentraron proteínas extracelulares de los ocho hongos que mejor degradan de Impranil, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Esto permitió obtener proteínas libres de micelio, conidias y restos de Impranil. Una vez realizado esto, se cuantificaron los concentrados proteicos por el método de Bradford, se corrió un SDS-PAGE al 15% y se tiñó con azul de Coomassie para observar el patrón de proteínas (Figura 9).

En el gel se observó similitud entre algunas bandas de los concentrados proteicos de los hongos que pertenecen al complejo *Cladosporium cladosporioides* los cuales son: *Cladosporium pseudocladosporioides* (T1.PL.1), *Cladosporium tenuissimum* (A2.PP.5 y A3.I.1) y *Cladosporium montecillanum* (A2.H.4); todos colectados en el Conjunto E de la Facultad de Química, así como entre los dos concentrados proteicos de los hongos clasificados como *Cladosporium asperulatum* (BP8.I.3 y BP3.I.2) ambos provenientes del basurero Bordo Poniente.

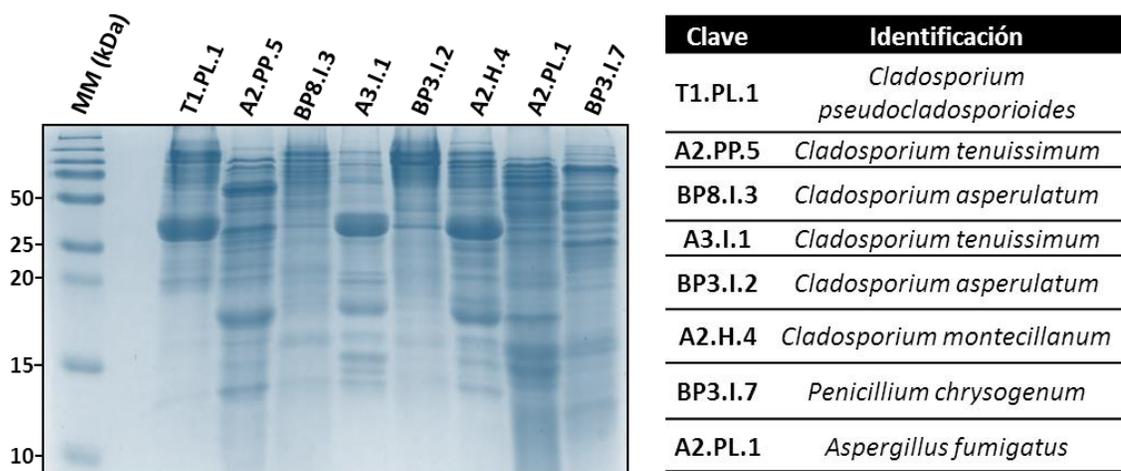


Figura 9. Patrón de proteínas de los concentrados extracelulares de los ocho hongos que mejor degradan Impranil e identificación de las cepas. SDS-PAGE al 15%, cargando 15 µg de proteína por carril, marcador de masa molecular: Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). El gel fue teñido con solución de Coomassie.



8.3. Escrutinio de actividades enzimáticas por ensayos de difusión radial.

Para demostrar de manera cualitativa cuáles de los concentrados proteicos presentaban las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de PU (ureasa, proteasa y esterasa), se realizaron primeramente ensayos de difusión radial en medios diferenciales para cada actividad, debido a su sencillez y eficacia.

8.3.1. Actividad ureasa.

Este ensayo se realizó utilizando medio urea de Christensen que contiene rojo de fenol como indicador y cuando hay hidrólisis de la urea el medio vira a rosa. La mayoría de los concentrados proteicos dieron negativo para esta prueba y sólo se pudo ver que hay una ligera coloración rosa alrededor del pozo con la proteína de *C. asperulatum* BP3.I.2 (Figura 10).

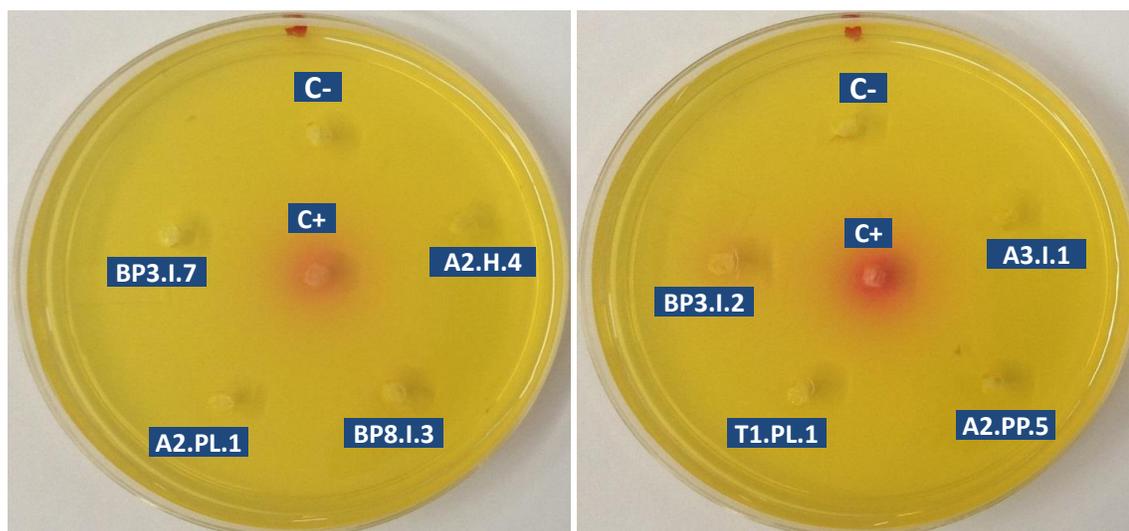


Figura 10. Ensayo de difusión radial en medio urea de Christensen para detectar actividad ureasa. Se cargaron 50 µg de cada uno de los concentrados proteicos de los hongos en los pozos. C+: control positivo 0.04 U de Jack bean urease (JBU), C-: control negativo 0.04 U de JBU hervido por 15 min. El ensayo se llevó a cabo incubando a 30 °C durante 12 h.



8.3.2. Actividad proteasa.

El ensayo se realizó haciendo pozos en medio con leche descremada al 1%, la cual al ser hidrolizada lleva a la formación de halos transparentes alrededor de los pozos. Todas las muestras de los hongos dieron positivo para esta prueba, sin embargo algunas como *C. tenuissimum* A2.PP.5 y *P. chrysogenum* BP3.I.7 formaron halos muy grandes mientras que otros hongos como *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 y *C. montecillanum* A2.H.4 formaron halos pequeños (Figura 11).

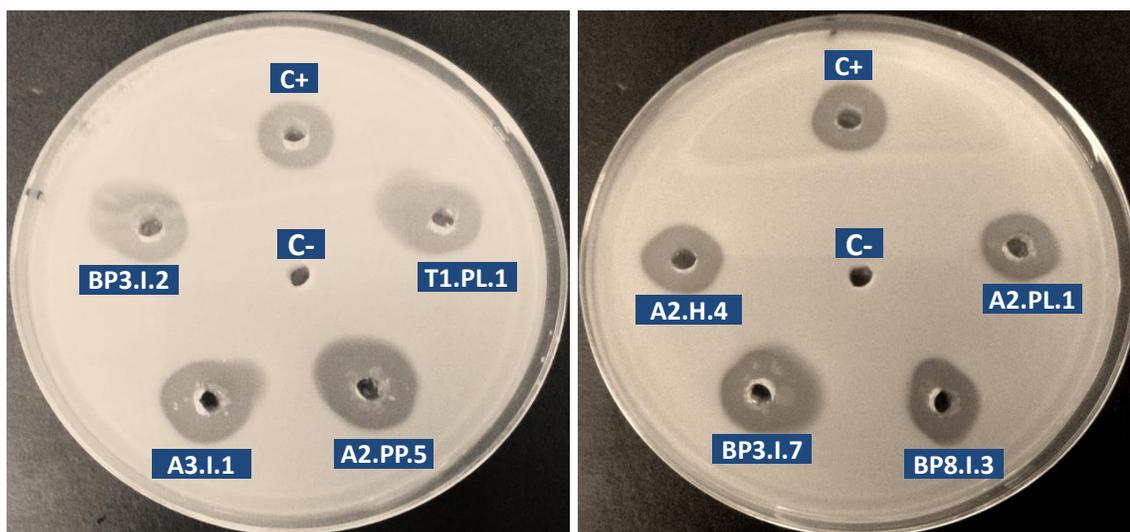


Figura 11. Ensayo de difusión radial con medio leche descremada al 1% para detectar actividad proteasa. Se cargaron 50 µg de proteína de los concentrados proteicos de los hongos en los pozos. C+: control positivo 10 µg de proteinasa K, C-: control negativo 10 µg proteinasa K hervida por 15 min. El ensayo se llevó a cabo incubando a 30 °C durante 12 h.

8.3.3. Actividad esterasa.

Cuando los enlaces éster del Tween20® se hidrolizan por actividad esterasa, se genera un alcohol y un ácido, el cual reacciona con el Ca^{2+} produciéndose un complejo que precipita alrededor del pozo. El resultado de esta prueba se observa en la Figura 12 donde se aprecia que los hongos que generaron un mayor halo de precipitación fueron *C. tenuissimum* A3.I.1 y A2.PP.5 los cuales son dos de los hongos que mejor degradan Impranil, el segundo y tercer lugar respectivamente. El hongo con menor actividad esterasa es *C. asperulatum* BP8.I.3 seguido por el concentrado proteico de *P. chrysogenum* BP3.I.7.



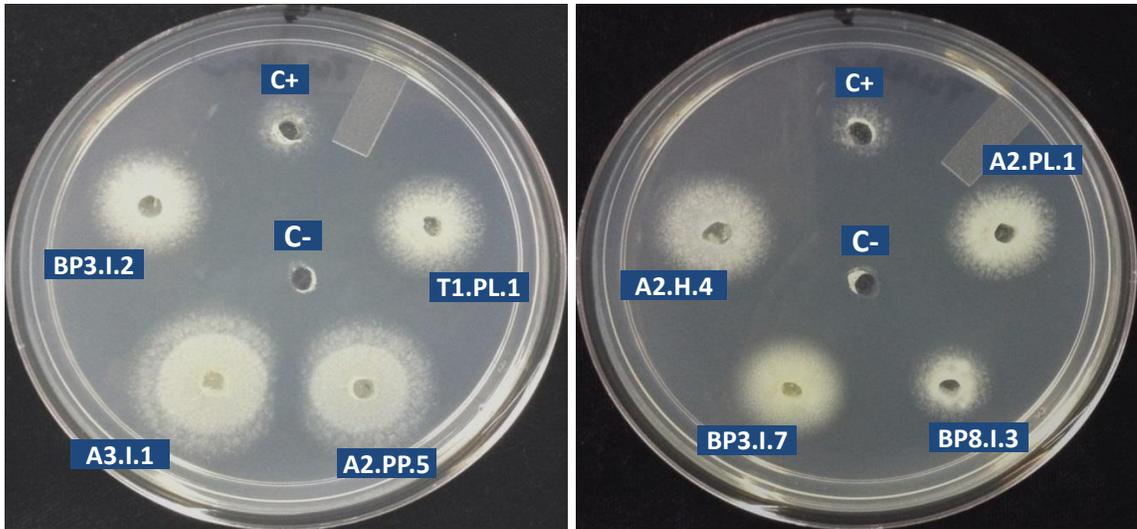


Figura 12. Ensayo de difusión radial con medio Tween20® y CaCl₂ para detectar actividad esterasa. Se cargaron 50 µg de proteína de los concentrados proteicos de los hongos que mejor degradan Impranil en los pozos. C+: control positivo 0.05 U de lipasa de *P. fluorescens*, C-: control negativo 0.05 U de lipasa de *P. fluorescens* hervido 15 min. El ensayo se llevó a cabo incubando a 30 °C durante 12 h.

8.4. Zimografía de las actividades enzimáticas encontradas.

Para determinar cuál de las proteínas presentaba la actividad enzimática de interés y así poderla identificar, se realizaron zimografías para las actividades ureasa, proteasa y esterasa, ya que todas mostraron actividad en los ensayos de difusión radial.

8.4.1. Actividad ureasa.

Se corrieron los concentrados proteicos de los hongos en un gel SDS-PAGE al 10%. Para detectar la actividad se utilizó urea como sustrato y nitro azul de tetrazolio (NBT) como indicador. Como control positivo se usó 0.02 U de Jack Bean Urease. Como se observa en la Figura 13 sólo el hongo *Cladosporium asperulatum* BP3.I.2 presentó actividad ureasa correspondiente a una banda alrededor de 150 kDa. Esto concuerda con el resultado obtenido en el ensayo de difusión radial siendo éste el único hongo ureasa positivo. Se sabe que algunos hongos utilizan la hidrólisis de la urea para generar amoníaco como mecanismo de virulencia como es el caso de



Cryptococcus neoformans (Cox *et al.*, 2000) y *Coccidioides immitis* (Cole, 1997). Sin embargo, no todos los hongos que producen ureasa son patógenos; algunos como *Aspergillus niger* producen ureasas que son ampliamente utilizadas en la industria (Ghasemi *et al.*, 2004).

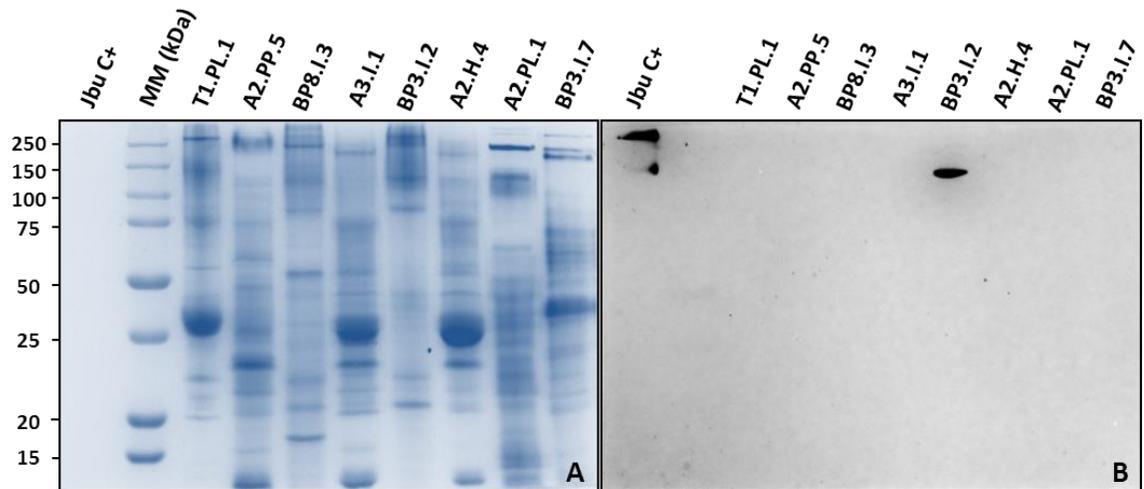


Figura 13. Zimograma de actividad ureasa. Se cargaron 15 μ g de cada uno de los concentrados proteicos de los hongos que mejor degradan de Impranil y fueron resueltos en un SDS-PAGE al 10%. Para la zimografía se utilizó como sustrato urea y como revelador NBT, C+: control positivo 0.02 U de Jack bean urease, marcador de masa molecular: Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A)** Tinción con solución de Coomassie del patrón de proteínas en el gel. **B)** Zimograma de actividad ureasa.

8.4.2. Actividad proteasa.

Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE que contenía 0.2% (p/v) de caseína no hidrolizada en el gel separador. Después de la corrida, el gel se tiñó con solución de Coomassie (0.1%, p/v). Debido a que este reactivo se fija a las proteínas, la actividad proteasa se observa como un halo claro en la zona de la proteína con esta actividad. Las cinco muestras de concentrado proteico con la mayor actividad de acuerdo a la cuantificación de la degradación de Impranil en medio líquido, y que corresponden al género *Cladosporium* sp., presentaron una proteína con actividad proteasa a un tamaño aproximado de 15 kDa, mientras que en los concentrados proteicos de *A. fumigatus* A2.PL.1 y *P. chrysogenum* BP3.I.7 no se observó dicha banda aunque si actividad proteasa con alta masa molecular (Figura 14). Las proteasas constituyen uno de los grupos más importantes de enzimas de uso



industrial debido a sus variadas aplicaciones tales como: detergentes, comida, farmacéuticas, entre otros (Maheshwari *et al.*, 2000). Uno de los principales productores de proteasas es *Aspergillus* sp. (Nakadari *et al.*, 1973), pero en general se sabe que los hongos las producen extracelularmente para degradar materia orgánica para su consumo.

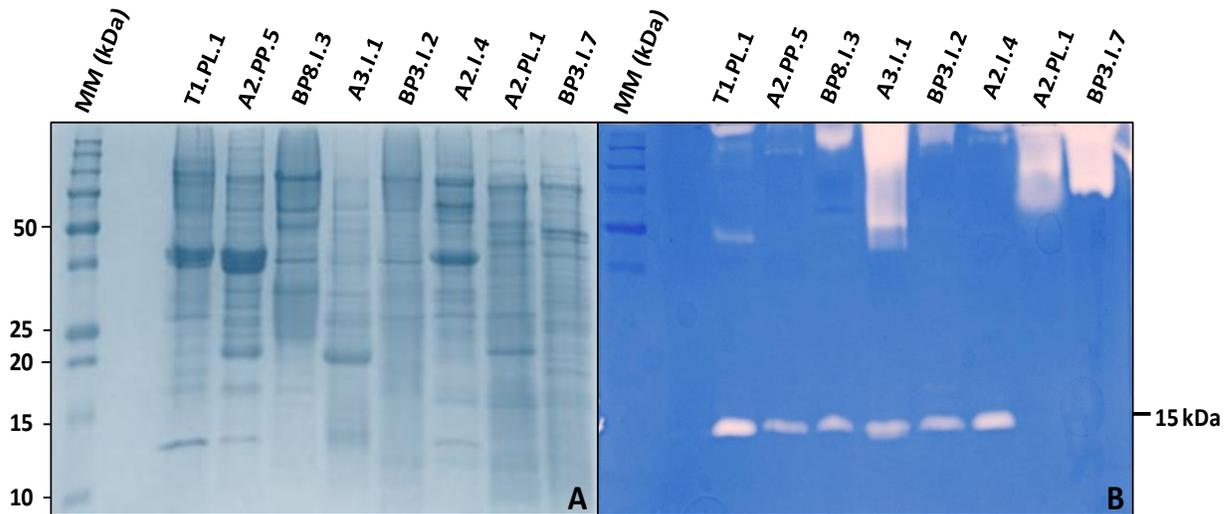


Figura 14. Zimograma de actividad proteasa. Se resolvieron 15 μ g de proteína de los concentrados proteicos de los hongos que mejor degradan Impranil en un gel SDS-PAGE al 15% con 0.2% de caseína en el gel separador como sustrato. Se utilizó como revelador solución de Coomassie, marcador de masa molecular: Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A)** Tinción con solución de Coomassie del patrón de proteínas en el gel. **B)** Zimograma para actividad proteasa e indicador de actividad en 15 kDa.

8.4.3. Actividad esterasa.

Se corrieron las muestras en un gel SDS-PAGE. Para detectar la actividad se utilizó el reactivo 4-metilumbeliferil butirato que al hidrolizarse genera 4-metilumbeliferona que puede ser detectado con luz UV. En todas las muestras se observaron distintas bandas con actividad esterasa, sin embargo, en todos los casos la banda alrededor de 20 kDa presentó la mayor actividad sobre todo en las cepas de *C. tenuissimum* A3.I.1 y A2.PP.5; siendo éstas dos las mismas que formaron el mayor halo de precipitación en el ensayo de difusión radial para esterasa (Figura 15). Se descartó que la presencia de bandas tenues se debiera a contaminación entre carriles debido a que las muestras fueron analizadas en geles



por separado y el patrón de actividad esterasa se mantenía. Las esterasas son enzimas ampliamente usadas en varias ramas de la industria (textil, alimenticia, química, entre otras) por su versatilidad y eficiencia. Un ejemplo es el empleo de la carboxil esterasa de *Pycnoporus cinnabarius* para la obtención del ácido ferúlico a partir de la pectina y el xilano. El ácido ferúlico es precursor de saborizantes como la vainilla (Lesage-Meessen *et al.*, 1996).

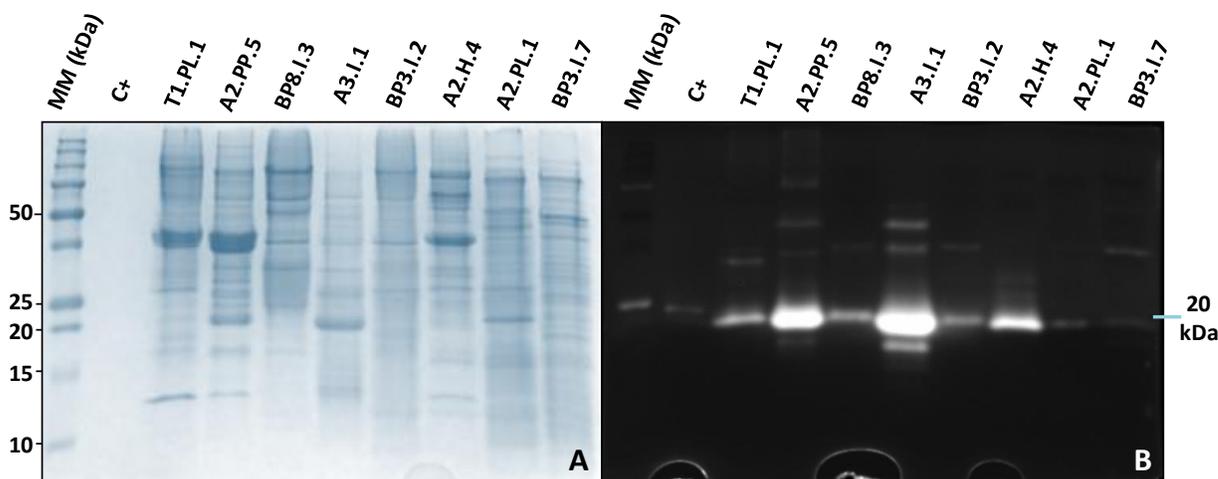


Figura 15. Zimograma de actividad esterasa. Se corrieron 15 μg de proteína de los concentrados proteicos de los hongos que mejor degradan Impranil en un gel SDS-PAGE al 15%. Se utilizó como sustrato 4-metilumbeliferil butirato, como revelador luz UV, C+: control positivo 0.05 U de lipasa de *P. fluorescens*, marcador de masa molecular: Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A)** Patrón de proteínas teñido con solución de Coomassie. **B)** Zimografía para actividad esterasa e indicador de actividad en 20 kDa.

8.5. Determinación de la actividad “impranilasa”.

Para realizar un escrutinio de la actividad “impranilasa” en los diferentes concentrados proteicos de los hongos más degradadores, se realizaron ensayos cualitativos para determinar cuál de éstos presentaba dicha actividad.

8.5.1. Ensayo de difusión radial en MM-Impranil.

Se utilizó MM-Impranil sólido sobre el cual se realizaron pozos y se cargaron 50 μg de proteína de cada uno de los concentrados proteicos. Se evaluó la presencia de halos de degradación alrededor de los pozos. Todos los concentrados proteicos generaron halos de degradación, sin embargo, los que generaron un mayor halo



fueron los de *C. tenuissimum* A3.I.1 y A2.PP.5 los cuales también son los que mostraron mayor halo de precipitación en el ensayo de difusión radial para esterases y presentaron mayor actividad en la zimografía de esterasa (Figura 16). Siendo también *C. tenuissimum* A2.PP.5 uno de los que presentó mayor halo de degradación en el ensayo de difusión radial para proteasas.

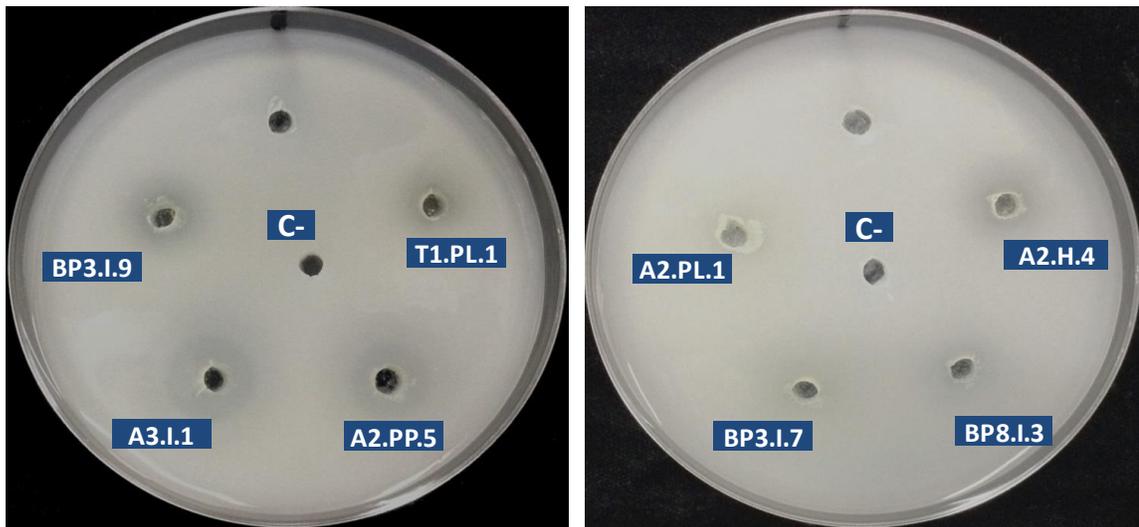


Figura 16. Ensayo de difusión radial en medio con Impranil para detectar actividad “impranilasa”. Se cargaron 50 μ g de proteína de los concentrados proteicos de los hongos en los pozos. C-: control negativo (concentrado de *C. tenuissimum* A3.I.1 hervido por 15 min). El ensayo se llevó a cabo incubando a 30 °C por 12 h.

8.5.2. Zimografía de actividad “impranilasa”.

Se realizó la zimografía reportada por Ruiz *et al.* (1999) modificada para detectar posibles actividades hidrolíticas sobre el Impranil. Sólo se detectaron proteínas con actividad “impranilasa” en los concentrados proteicos provenientes de los hongos *C. tenuissimum* A3.I.1, *C. tenuissimum* A2.PP.5 y *C. montecillanum* A2.H.4 (Figura 17), con tamaño aproximado de 20 kDa. El tamaño de estas bandas con actividad “impranilasa” coincide con los de las bandas con actividad esterasa (Figura 15), lo que sugiere que la actividad que hidroliza al Impranil podría ser una actividad esterasa. Esto concuerda con los resultados obtenidos por CG-EM donde se observa que hay disminución y pérdida de compuestos que llevan enlaces éster en su estructura.



Es interesante señalar que en el ensayo de difusión radial en MM-Impranil sólido y en la cuantificación de la degradación en MM-Impranil líquido, todos los concentrados proteicos presentaron actividad hidrolítica sobre el Impranil. Sin embargo, sólo se pudieron apreciar bandas con actividad “impranilasa” en los concentrados proteicos provenientes de los hongos *C. tenuissimum* A3.I.1 y A2.PP.5 y en *C. montecillanum* A2.H.4 lo cual se puede deber a que la actividad “impranilasa” es menos activa o a que es una actividad que reside en complejos multiprotéicos que fueron separados en el SDS-PAGE, en los concentrados proteicos de los otros hongos.

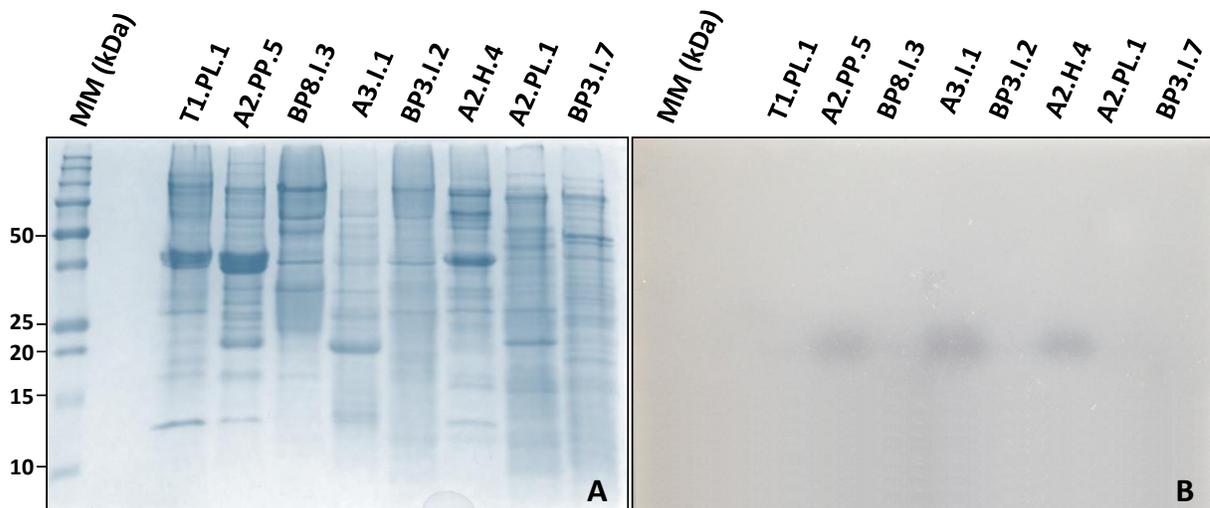


Figura 17. Zimograma de actividad “impranilasa”. Se corrieron 15 µg de proteína de los concentrados proteicos de los hongos en gel SDS-PAGE al 15%. Se utilizó como sustrato un gel de agarosa al 1.4% con Impranil al 1%, los gels fueron acoplados e incubados a 30 °C por 12 h. Marcador molecular (MM): Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A)** Patrón de proteínas teñido con solución de Coomassie. **B)** Zimograma de actividad “impranilasa”.

8.5.3. SDS-PAGE 2D acoplado a zimografía para actividad esterasa.

Debido a que el concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1 fue el que generó una mayor señal en los zimogramas para las actividades esterasa e “impranilasa”, se eligió para realizar una zimografía en SDS-PAGE 2D para determinar el punto isoeléctrico de la o las proteínas de interés. El gel se acopló a un zimograma para actividad esterasa debido a que este ensayo presenta mayor sensibilidad que el de la actividad “impranilasa”. En el gel se puede apreciar que la mayoría de las



proteínas se encuentran en un intervalo de pH entre 4 y 6, a pH superior hay poca presencia de proteínas (Figura 18A), la formación de “spots” en el gel indica que la muestra focalizó bien y que la corrida se realizó adecuadamente. En el zimograma para la actividad esterasa (Figura 18B) se observa que hay muchos “spots” de proteínas con actividad esterasa de alrededor de 20 kDa pero con diferentes puntos isoeléctricos, lo que sugiere que la proteína de interés está presente en varias isoformas con diferentes cargas.

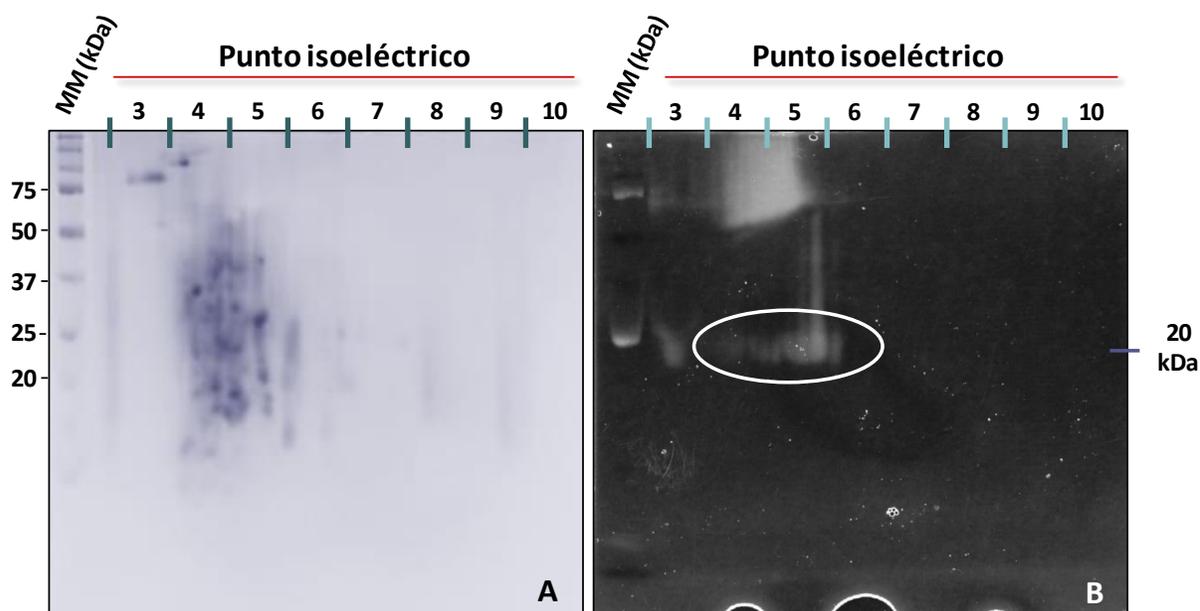


Figura 18. SDS-PAGE 2D al 15% y zimograma de actividad esterasa. Se resolvieron 500 μ g en el gel del concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1 tanto por su punto isoeléctrico (en tira IPG con un rango de pH de 3 a 10), como por tamaño (en gel SDS-PAGE al 15%). Marcador de masa molecular: Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A)** Gel teñido con solución de Coomassie. **B)** Zimografía para actividad esterasa donde se señala actividad en 20 kDa y punto isoeléctrico en un pH entre 4 y 6.

8.6. Cuantificación de la degradación y cálculo de la actividad específica de los concentrados proteicos.

8.6.1. Cuantificación de la degradación de Impranil en MM-Impranil líquido.

Para poder cuantificar la actividad “impranilasa” detectada en los ensayos de difusión radial, se montó un ensayo espectrofotométrico que permitió relacionar el aclaramiento del Impranil con su degradación utilizando una curva patrón con



concentraciones conocidas de Impranil a las que se les midió su $DO_{600\text{ nm}}$ (Figura 19).

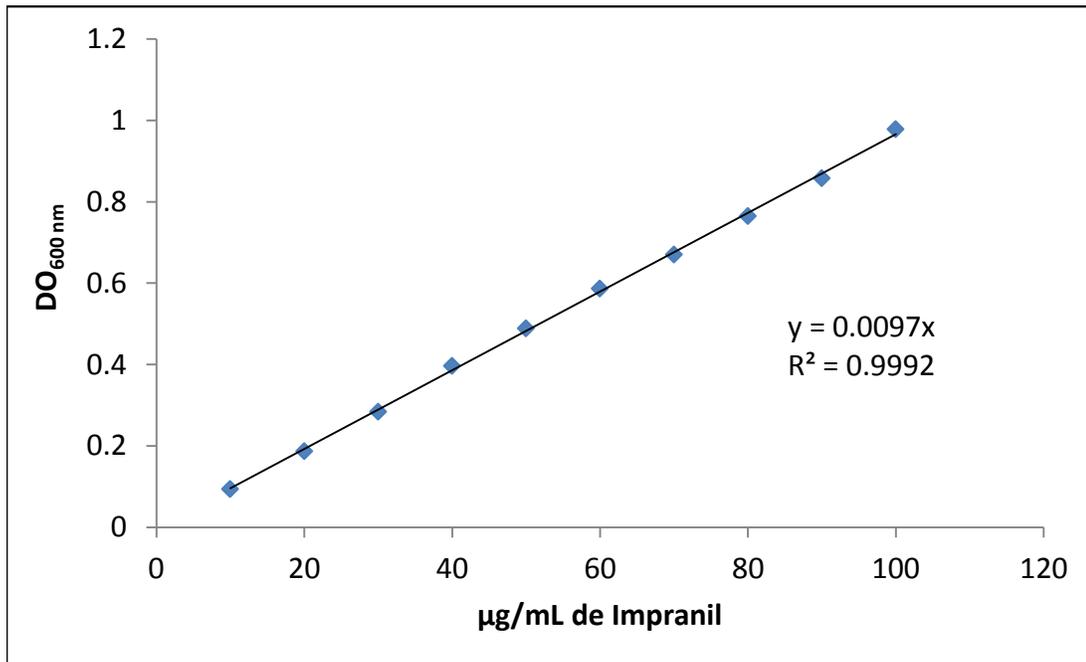


Figura 19. Curva patrón que relaciona concentraciones conocidas de Impranil con su DO. El Impranil se diluyó utilizando agua destilada y se determinó su $DO_{600\text{ nm}}$ ($n=3$).

Para el ensayo, se utilizó MM-Impranil al cual se le adicionaron los concentrados proteicos de los sobrenadantes de cultivos de hongos en Impranil. Las muestras se incubaron y se cuantificó la cantidad de Impranil remanente para calcular el porcentaje de degradación de cada extracto. En todas las muestras se detectó actividad “impranilasa”, como se había observado en el ensayo de difusión radial, pero sólo dos concentrados proteicos presentaron una degradación mayor a 40 µg/mL (40% de degradación), éstos fueron los concentrados proteicos de los hongos *C. tenuissimum* A2.PP.5 y *C. tenuissimum* A3.I.1. Estos concentrados son los que generaron mayores halos en los ensayos de difusión radial para la actividad esterasa e “impranilasa” indicando que son los más activos (Figura 20).



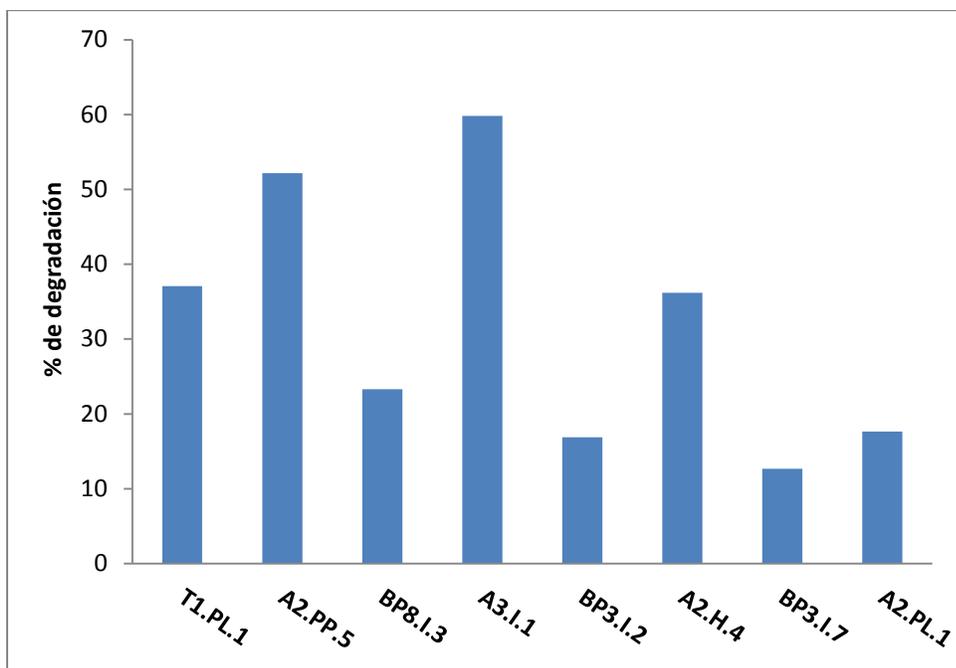


Figura 20. Porcentaje de degradación de Impranil de los concentrados proteicos de sobrenadantes de cultivo de hongos en MM-Impranil. Volumen de reacción: 1 mL, sustrato: Impranil 0.1 mg, amortiguador: fosfatos 50 mM pH 6.5, concentración de enzima 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las reacciones fueron incubadas por 30 min a 30 $^{\circ}\text{C}$ y la degradación se evaluó espectrofotométricamente por turbidimetría ($\text{DO}_{600\text{nm}}$).

8.6.2. Cálculo de la actividad específica de los concentrados proteicos.

Como segundo criterio para elegir que concentrado proteico se utilizaría para identificar a la enzima responsable de la degradación de Impranil, se evaluó la actividad específica de cada uno de los concentrados proteicos extracelulares de los hongos que fueron cultivados en MM-Impranil. La actividad específica se refiere a la cantidad de sustrato que cierta cantidad de enzima puede transformar a producto, por unidad de tiempo y es una medida de la velocidad a la que ocurren las reacciones enzimáticas. Para determinar la de cada concentrado proteico se realizaron cinéticas de degradación a una concentración de sustrato fija en un intervalo de 6 min con 0, 5, 15, 30, 45 y 60 μg de proteína. Se considera como actividad la desaparición de sustrato (Impranil) la cual se midió como el aclaramiento del medio en una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ relacionándolo con la curva patrón antes realizada. En la Figura 21 se observan las curvas de actividad del concentrado



proteico de *C. tenuissimum* A2.PP.5 con diferentes concentraciones de proteína contra tiempo.

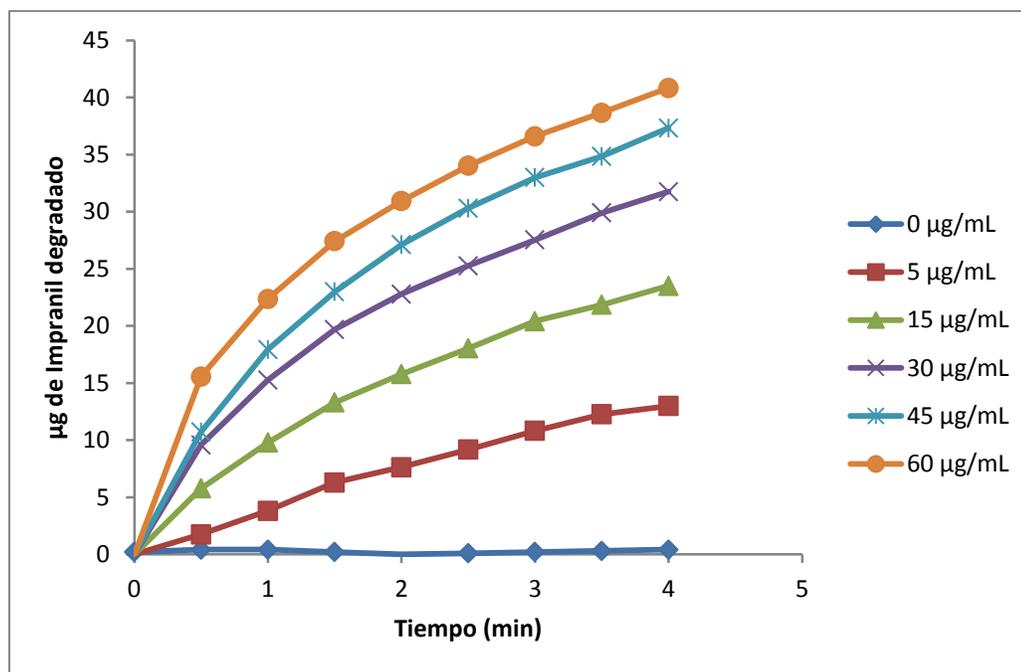


Figura 21. Análisis curso-temporal de hidrólisis de Impranil utilizando el concentrado proteico de *C. tenuissimum* A2.PP.5. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 1 mL con una concentración de 0.1 mg/mL de Impranil. Amortiguador: fosfatos 50 mM pH 6.5. Se utilizaron diferentes concentraciones de proteína y se cuantificó la degradación espectrofotométricamente por turbidimetría a $DO_{600\text{ nm}}$. La reacción fue monitoreada cada 30 s por 6 min.

En cada cinética se calculó la velocidad inicial (v_0) (pendiente), considerando únicamente los valores en la parte lineal de la curva. Posteriormente se graficó v_0 vs concentración de proteína. Considerando solamente las pendientes en la parte lineal de la curva, es posible determinar la actividad específica de la reacción. En la Figura 22 se observa el cálculo de la actividad específica para el concentrado proteico extracelular del hongo *C. tenuissimum* A2.PP.5 el cual corresponde a 0.6 µg de Impranil degradado/min/µg proteína.



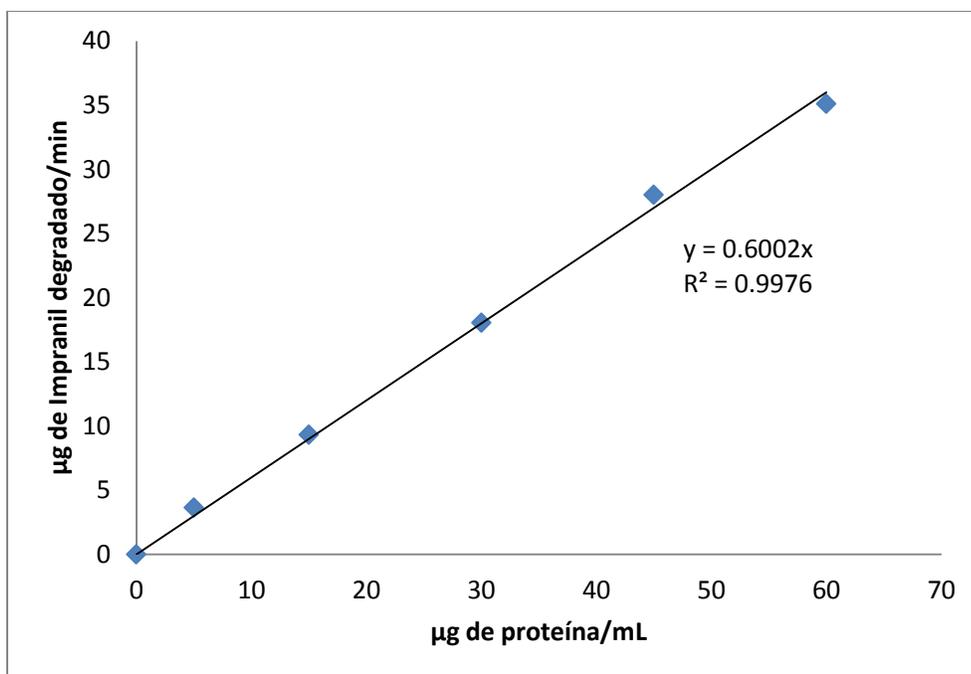


Figura 22. Cálculo de la actividad específica para el concentrado proteico extracelular de *C. tenuissimum* A2.PP.5. Gráfico de las velocidades iniciales (v_0) vs la concentración de proteína y ecuación que representa la actividad específica. (n=1)

Se realizaron los cálculos para cada uno de los concentrados proteicos de los ocho hongos (Tabla 8). El concentrado proteico con mayor actividad específica correspondió a *C. tenuissimum* A3.I.1 seguido por *C. tenuissimum* A2.PP.5 y *C. montecillanum* A2.H.4. Estos hongos, fueron los únicos en los que se pudo observar una banda alrededor de 20 kDa en la zimografía para la actividad “impranilasa”. Los hongos que presentaron menor degradación de Impranil y que también tuvieron menor actividad específica fueron *P. chrysogenum* BP3.I.7 y *Aspergillus fumigatus* A2.PL.1.



Tabla 8. Valores de actividad específica de los concentrados proteicos de los hongos

Hongo	* Actividad específica
A3.I.1	0.84
A2.PP.5	0.60
A2.H4	0.53
BP8.I.3	0.06
T1.PL.1	0.04
A2.PL.1	0.01
BP3.I.7	< 0.01
BP3.I.2	< 0.01

** μg de Impranil degradado/min/ μg proteína*

8.7. Purificación e identificación de la enzima con actividad “impranilasa”.

Se eligió la proteína de 20 kDa del concentrado proteico proveniente del hongo *C. tenuissimum* A3.I.1 para ser purificada e identificada. Esta proteína fue seleccionada por ser la que presentó mayor actividad en el zimograma de Impranil y a que proviene del concentrado proteico con mayor actividad específica.

Se realizaron dos pasos de purificación, el primero una columna de exclusión molecular y el segundo una cromatografía de intercambio iónico. Finalmente se corrió un SDS-PAGE de donde se cortó la banda correspondiente a la proteína con la actividad “impranilasa”/esterasa y se envió a identificar por MS/MS.



8.7.1. Cromatografía de exclusión molecular con el concentrado proteico de A3.I.1.

Se corrió una columna de exclusión molecular con el concentrado proteico y las fracciones fueron analizadas por su cantidad de proteína midiendo la $DO_{280\text{ nm}}$ y por su actividad “impranilasa” cuantificando el Impranil remanente a una $DO_{600\text{ nm}}$.

En la fracción 31 se observó la mayor concentración de proteína, la cual coincidió con el mínimo de la curva de Impranil remanente lo que indica una mayor degradación (Figura 23). Esto significa que en ese pico es donde se encuentra la mayor concentración de proteína con la actividad buscada. Dicha proteína comienza a apreciarse desde la fracción 20 hasta la 46 en donde deja de observarse actividad y la concentración disminuye.

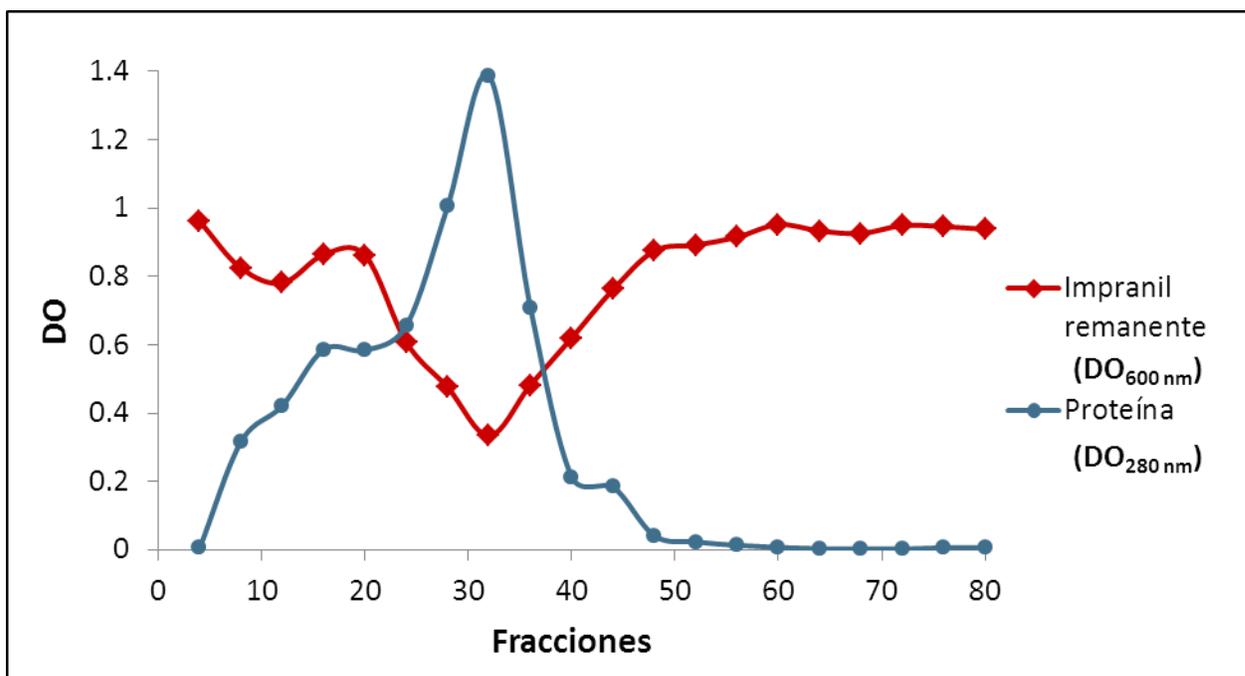


Figura 23. Determinación de la concentración de proteínas y actividad “impranilasa” en las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión molecular. La concentración de proteína se determinó por $DO_{280\text{ nm}}$. La actividad “impranilasa” se determinó realizando reacciones con volumen de 1 mL, 20 μL de cada fracción e Impranil (0.1 mg/mL) como sustrato, amortiguador: fosfatos 50 mM pH 6.5; se determinó su $DO_{600\text{ nm}}$.



Para analizar la actividad de las fracciones y los patrones de proteínas de éstas, se corrieron geles SDS-PAGE acoplados a zimogramas de esterasa y de Impranil con cada cuatro de las fracciones desde la 20 a la 48 (20 μ L por fracción), comparándolas con el concentrado total de *C. tenuissimum* A3.I.1. Es en la fracción 32 donde se encontró abundantemente la proteína de interés (Figura 24A). Para observar en que otras fracciones circundantes a la 32 se encontraba también la proteína de 20 kDa con la actividad de interés, se corrió otro gel SDS-PAGE con las fracciones de la 28 a la 35 (20 μ L por fracción) y se tiñó con Coomassie (Figura 24B). En este gel se observa que son las fracciones de la 30 a la 33 en donde se encuentra mayoritariamente la proteína de interés.

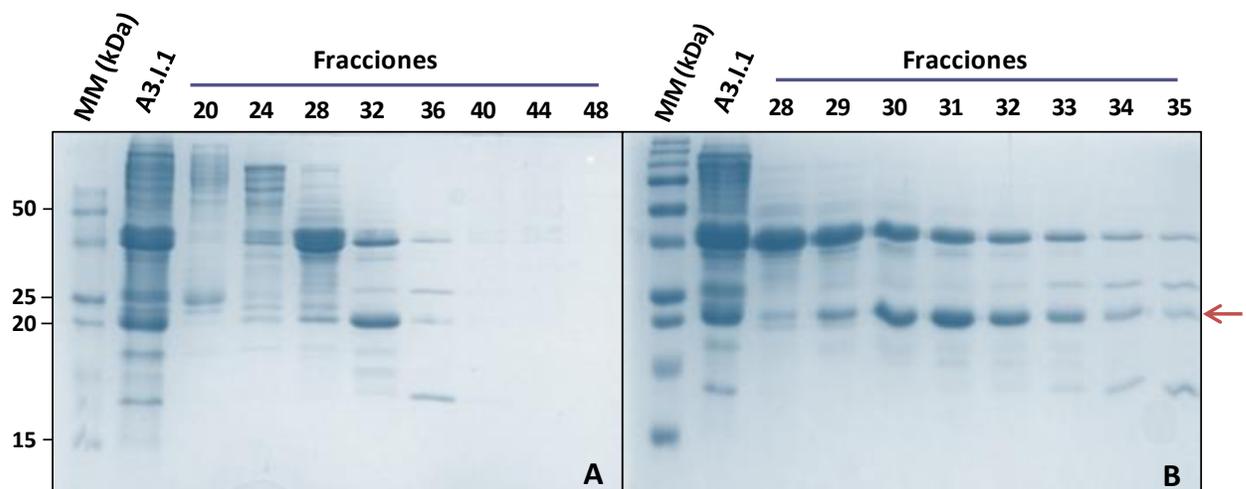


Figura 24. Análisis de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular por SDS-PAGE. Marcador molecular (MM): Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A)** SDS-PAGE al 15% de las fracciones que mostraron actividad “impranilasa” en el ensayo en MM-Impranil líquido (20 a 48). **B)** SDS-PAGE al 15% teñido con Coomassie de las fracciones que contienen la proteína de interés (28 a 35), la flecha señala la MM de la proteína de interés.

Para corroborar que las fracciones 28 a la 35 mantuvieran la actividad, se realizaron zimografías tanto para “impranilasa” como para esterasa. Todas las fracciones tienen actividad “impranilasa” (Figura 25B) y esterasa (Figura 25D) con una masa molecular aproximada de 20 kDa, siendo las fracciones 30 a 33 las que muestran mayor actividad en ambos casos. Esto es debido a que es en estas fracciones es donde se observa la mayor concentración de proteína de 20 kDa (Figuras 25A y 25C).



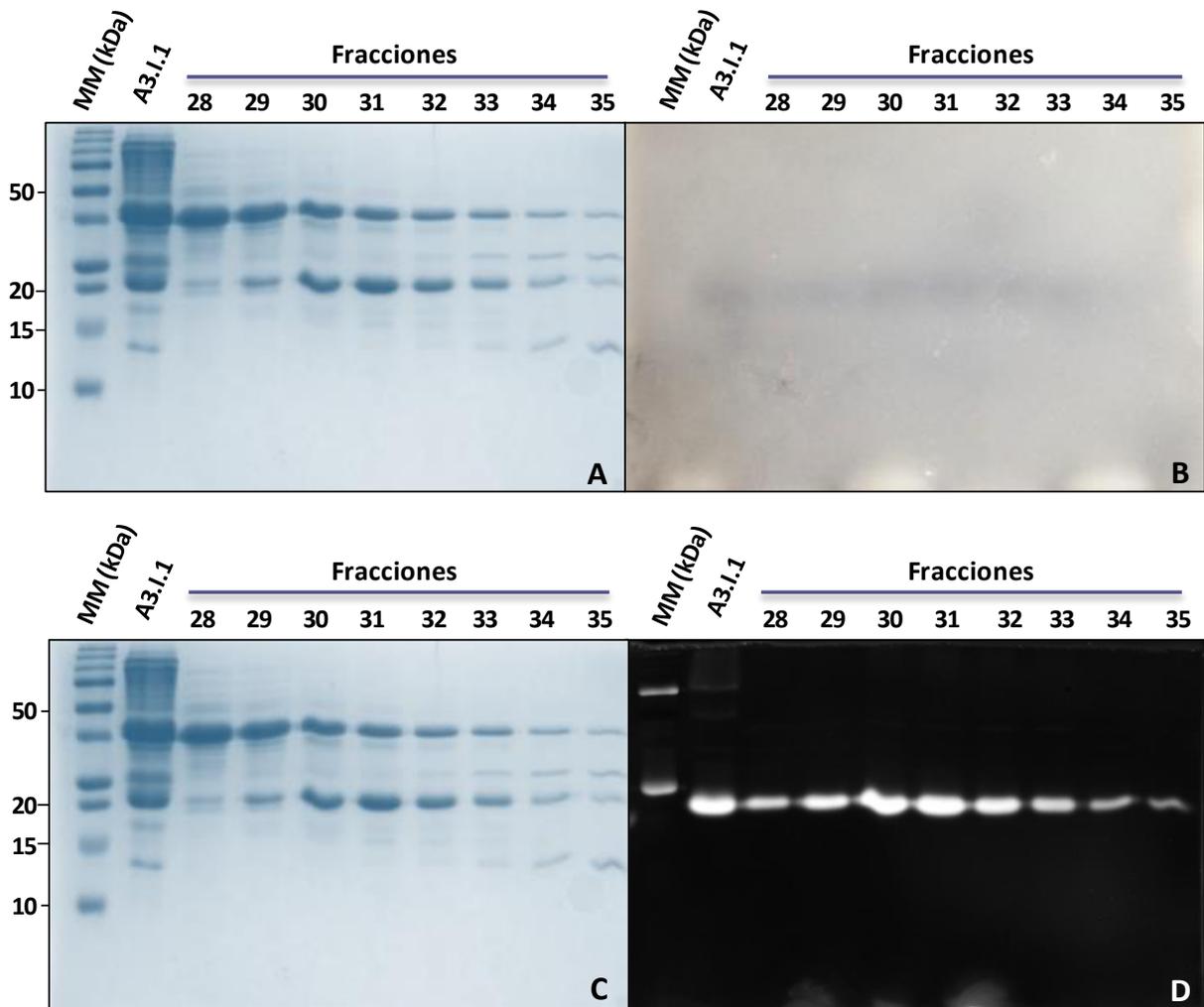


Figura 25. Zimogramas de actividad “impranilasa” y esterasa de las fracciones de la columna de exclusión molecular que presentaron la proteína de interés. Marcador molecular (MM): Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A) y C)** SDS-PAGE al 15 % teñido con solución de Coomassie de las fracciones con la proteína de interés (20 kDa) derivadas de la columna de exclusión molecular corrida con el concentrado proteico extracelular de *C. tenuissimum* A3.I.1 cultivado en MM-Impranil mostrado en el segundo carril. **B)** zimograma de actividad “impranilasa” donde se muestra la actividad del concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1 y las fracciones 28 a 35. **D)** Zimograma para actividad esterasa donde se muestra la actividad del concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1 y las fracciones 28 a 35.



Dados los resultados obtenidos en ambos zimogramas, las fracciones de la 30 a la 33 se juntaron y se concentraron en un centrífugo de corte de 10 kDa.

8.7.1.1. Curva de calibración con marcador de masa molecular definido (BIO-RAD No. Cat. 151-1901).

Para determinar la masa molecular de la proteína de interés, se corrió la columna en las mismas condiciones que en la purificación con 100 µg del marcador comercial y se colectaron 80 fracciones que se cuantificaron por su $DO_{280\text{ nm}}$. Con dichos valores, se realizó la gráfica que relaciona el logaritmo de la masa molecular de cada uno de los compuestos con el tiempo de retención, con la cual se obtuvo la ecuación como se observa en la Figura 26.

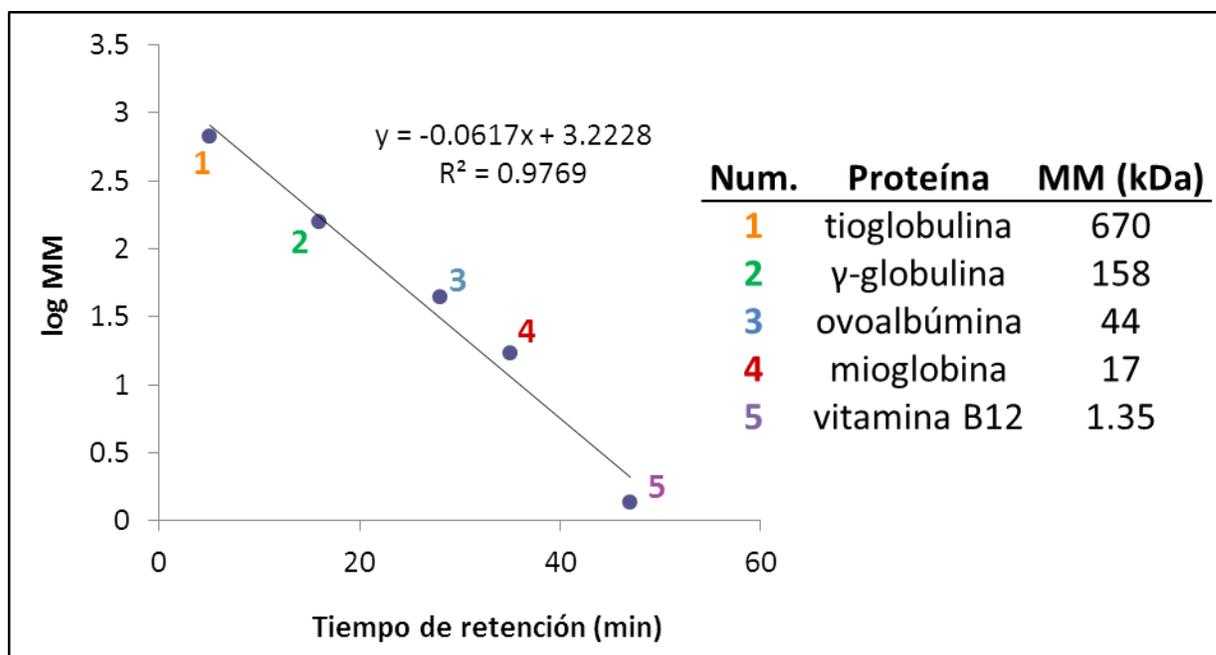


Figura 26. Curva de calibración de la columna de exclusión molecular con marcadores de masa molecular definido (BIO-RAD No. Cat. 151-1901). La gráfica muestra la relación entre el logaritmo de la masa molecular con el tiempo de retención y su respectiva ecuación.

Para determinar la masa molecular de la proteína de interés, la columna se cargó con 7 mg del concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1 con las condiciones antes mencionadas, se colectaron 60 fracciones de 1 mL y se determinó la



concentración de proteína a una $DO_{280\text{ nm}}$ y la actividad “impranilasa” por turbidimetría ($DO_{600\text{ nm}}$). En la Figura 27 se observa un pico con mayor actividad “impranilasa” que coincide con la mayor concentración de proteína en un tiempo de retención de 30 min. Utilizando la ecuación anteriormente obtenida, se calculó una masa molecular de dicha fracción que correspondió a 23.53 kDa, la cual es cercana a lo observado en los geles SDS-PAGE.

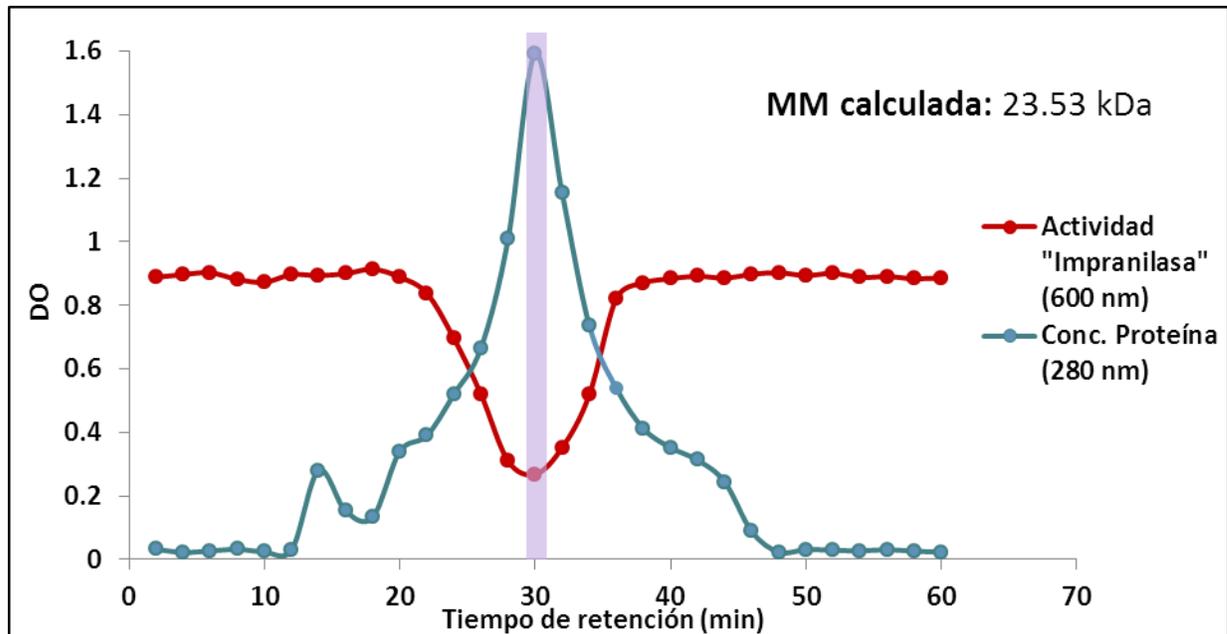


Figura 27. Determinación de la concentración de proteína y actividad “impranilasa” en las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión molecular y cálculo de la masa molecular (MM) de la proteína de interés. La concentración de proteína se determinó por la $DO_{280\text{ nm}}$ de las fracciones. La actividad “impranilasa” se determinó realizando reacciones con volumen de 1 mL, 20 μL de cada fracción e Impranil (0.1 mg/mL) como sustrato, amortiguador: fosfatos 50 mM pH 6.5; se determinó su $DO_{600\text{ nm}}$. La barra sombreada indica la fracción conteniendo la proteína de interés; la MM se calculó utilizando la ecuación obtenida en la Figura 26.

8.7.2. Cromatografía de intercambio iónico con el concentrado proteico de A3.I.1.

Como siguiente paso de purificación, se eligió una columna de intercambio iónico. Dada la información obtenida en el SDS-PAGE 2D en el cual se observó un punto isoelectrónico de las proteínas con actividad entre 4 y 6, se seleccionó una columna



de intercambio aniónico. De las fracciones resultantes, se midió proteína a 214 y 280 nm, el espectro de elución se observa en la Figura 28 en donde se señalan los siete principales picos con mayor $DO_{214\text{ nm}}$.

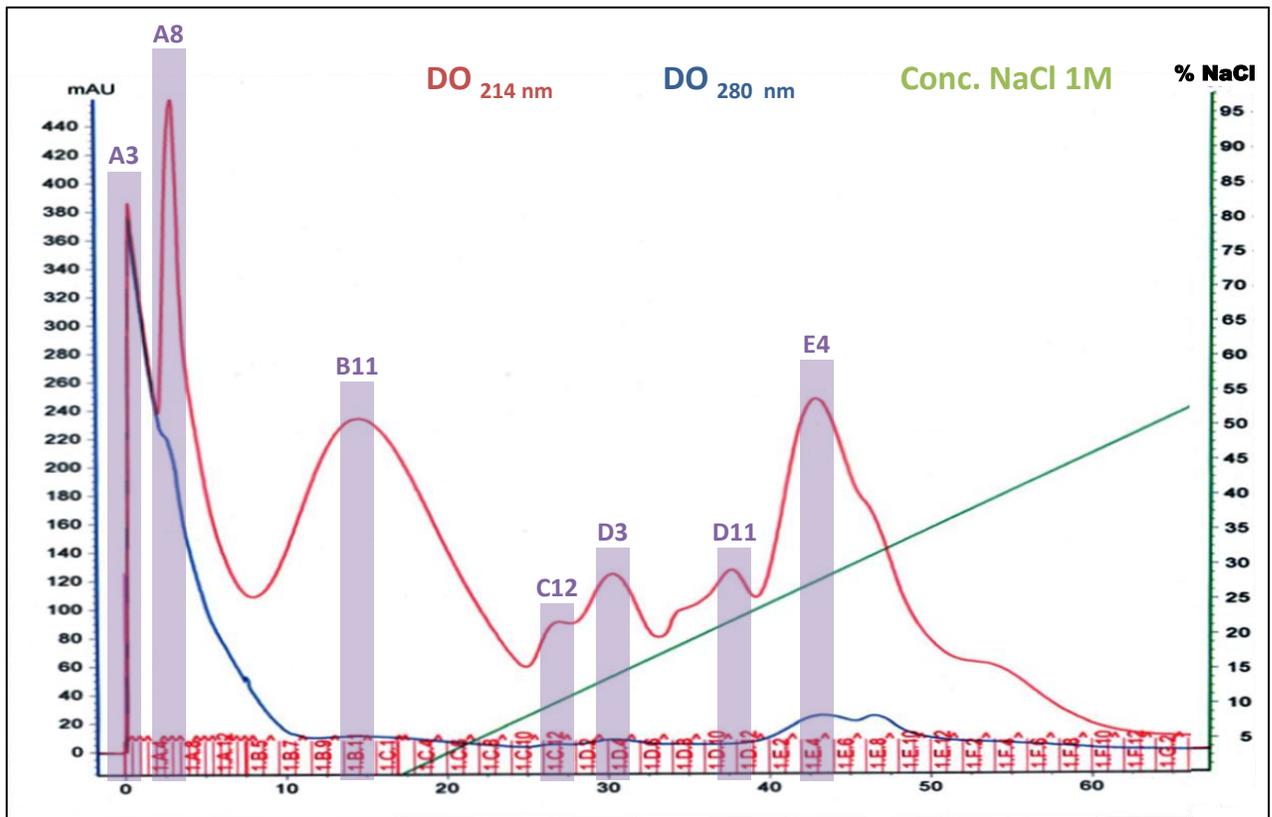


Figura 28. Espectro de elución de las proteínas de *C. tenuissimum* A3.I.1 en la cromatografía de intercambio aniónico. Las proteínas fueron previamente purificadas por cromatografía de exclusión molecular y fueron seleccionadas aquellas con la actividad de interés. En rojo: $DO_{214\text{ nm}}$, en azul: $DO_{280\text{ nm}}$, en verde: aumento en la concentración de NaCl para eluir las fracciones con carga, barras en morado: fracciones con alta concentración de proteína de acuerdo a la determinación de su $DO_{214\text{ nm}}$.

Las siete fracciones que contenían mayor $DO_{214\text{ nm}}$ fueron analizadas con el ensayo de degradación de Impranil, comparando la actividad con 30 μg del concentrado proteico total de *C. tenuissimum* A3.I.1 y 30 μg del concentrado de las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular (Figura 29). Las fracciones con mayor actividad fueron B11 y C12, las fracciones subsecuentes D3, D11 y E4 mostraron actividad menor actividad en orden decreciente. Aunque las fracciones



A3 y A8 presentaron los máximos de $DO_{214\text{ nm}}$, no se detectó actividad “impranilasa” en ellas.

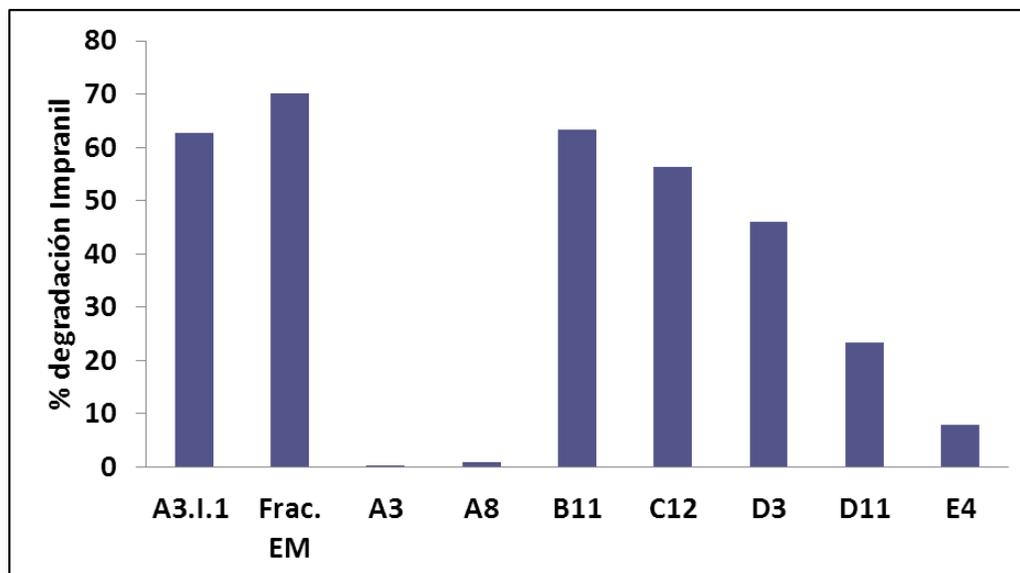


Figura 29. Cuantificación de la degradación de Impranil de las fracciones con mayor concentración de proteína (214 nm) en la cromatografía de intercambio aniónico. Volumen de reacción 1 ml, sustrato: Impranil (0.1 mg/mL), amortiguador: fosfatos 50 mM pH 6.5, concentración de enzima por reacción: 30 $\mu\text{g/mL}$ de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico, 30 $\mu\text{g/mL}$ de las fracciones provenientes de la cromatografía de exclusión molecular (Frac. EM) y 30 $\mu\text{g/mL}$ del concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1 sin purificar. La reacción se incubó por 30 min y se determinó su $DO_{600\text{ nm}}$ (turbidimetría).

Para observar el perfil de proteínas de cada una de las fracciones, se realizó un gel SDS-PAGE al 15% y se corrió con 20 μL de cada una de las 7 fracciones, incluyendo 30 μg del concentrado crudo de *C. tenuissimum* A3.I.1 y 30 μg de las fracciones provenientes de la columna de exclusión molecular que mostraron actividad. Se realizó la zimografía tanto para la actividad sobre Impranil como para la actividad esterasa y luego el gel fue teñido con solución de Coomassie. En la Figura 30 se aprecia que tanto el concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1 como las fracciones de la EM presentan una proteína de 20 kDa con gran actividad la cual se puede ver tanto en el zimograma de esterasa como de “impranilasa”. Por otro lado, en las fracciones provenientes de la cromatografía de intercambio iónico, la actividad esterasa de 20 kDa fue disminuyendo progresivamente en las fracciones



de la B11 a la E4 (Figura 30D), siendo la B11 la más activa y la que mayor concentración de proteína presentó (Figura 30A y 30C). La actividad “impranilasa” para estas fracciones sólo se observa en las fracciones B12, C11 y D3 (Figura 30B), posiblemente debido a la poca sensibilidad del ensayo. Como se esperaba, las actividades esterasa e “impranilasa” coinciden en todos los casos.



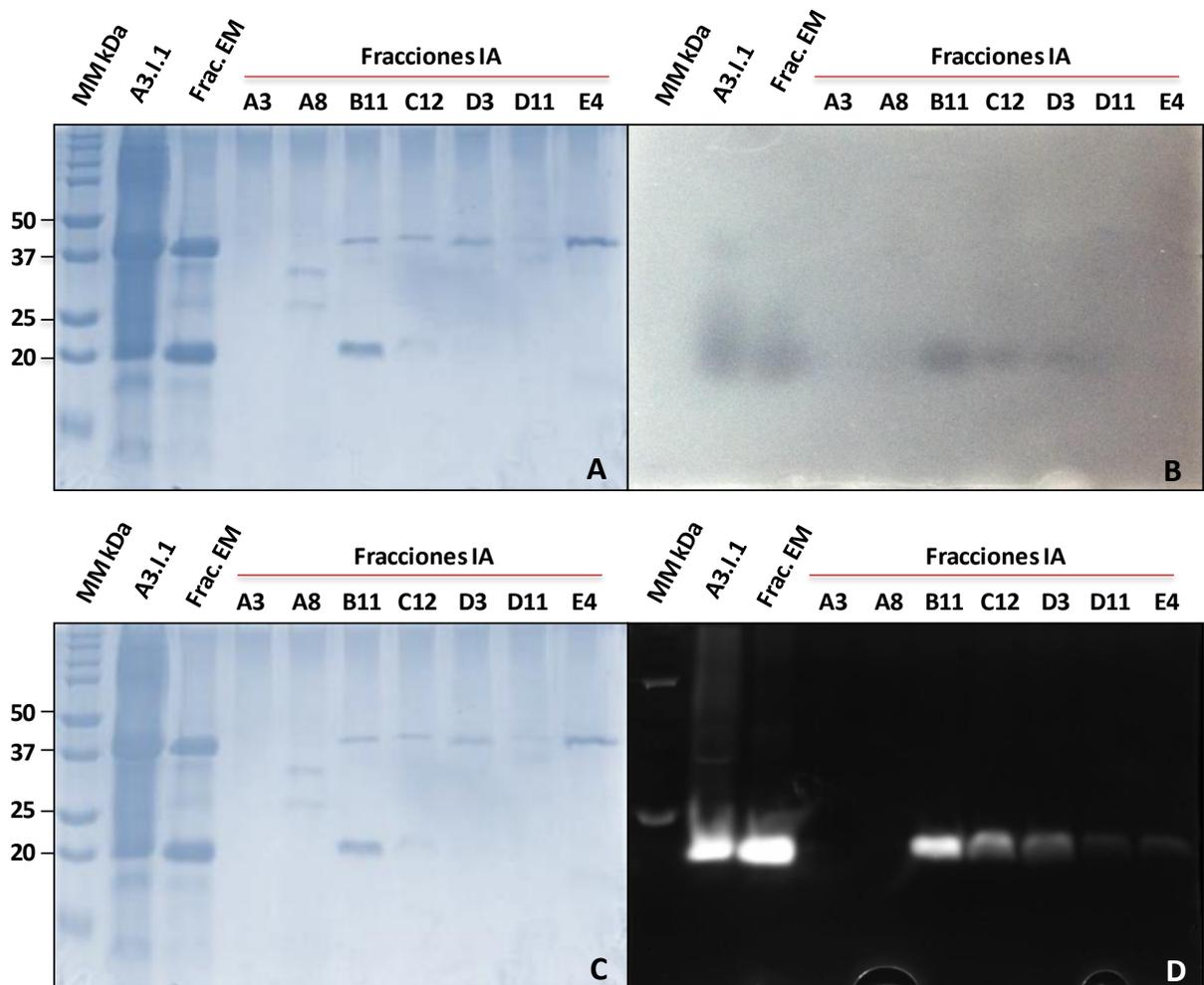


Figura 30. Zimogramas de actividades “imbranilasa” y esterasa de las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico que presentaron la proteína de interés. Marcador molecular (MM): Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). **A) y C)** SDS-PAGE al 15 % teñido con solución de Coomassie de las fracciones con la proteína de interés (20 kDa) derivadas de la cromatografía de intercambio aniónico corrida con las conjunto de fracciones provenientes de la EM (exclusión molecular) como segundo paso de purificación de la proteína de 20 kDa de *C. tenuissimum* A3.I.1 cultivado en MM-Imbranil mostrado en el segundo carril. **B)** Zimograma de actividad “imbranilasa” donde se muestra la actividad del concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1, las actividad de las fracciones provenientes de la purificación por exclusión molecular (Frac. EM) y las fracciones con actividad de la purificación por intercambio aniónico en 20 kDa. **D)** Zimograma para actividad esterasa donde se muestra la actividad del concentrado proteico de *C. tenuissimum* A3.I.1, la actividad de las fracciones provenientes de la purificación por exclusión molecular (Frac. EM) y las fracciones con actividad de la purificación por intercambio aniónico de 20 kDa.



Para determinar en cuales fracciones aledañas de la B11 se encontraba la proteína de interés, se corrieron geles SDS-PAGE al 15% con las fracciones de la B6 a la C9, los geles se tiñeron con solución de Coomassie (Figura 31). En estos geles se observa que las fracciones de la B7 a la C7 son las que presentan a la proteína de 20 kDa más abundantemente, lo cual coincide con el pico de proteína detectado por su $DO_{214\text{ nm}}$, en el cromatograma.

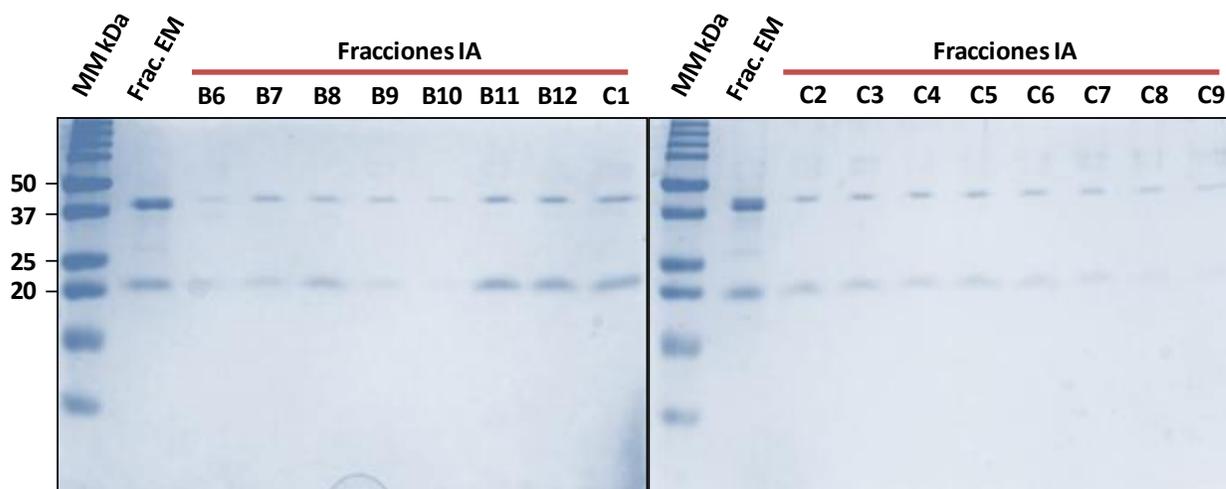


Figura 31. Análisis de las fracciones más degradadoras de Impranil de la cromatografía de intercambio aniónico por SDS-PAGE. Marcador molecular (MM): Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). Se cargaron 20 μL de cada fracción por carril y se incluyeron el conjunto de las fracciones provenientes de la columna de exclusión molecular (Frac. EM).

8.7.3. Identificación de la proteína con actividad “impranilasa”.

Para la identificación de la proteína con actividad impranilasa, se corrió un SDS-PAGE al 15 % con las fracciones de la B11 a la C3 en donde se cargó la máxima capacidad del pozo, incluyendo un pozo grande donde se cargó tres veces la concentración de C1. Este gel se reveló por Coomassie y las bandas de 20 kDa fueron cortadas. La banda de C1x3 fue enviada a analizar a la University of Massachusetts Medical School a la unidad de Proteomics and Mass Spectrometry Facility por MS/MS. La muestra fue digerida con dos enzimas: tripsina y quimiotripsina, dando como resultado varios fragmentos de diferentes péptidos que se analizaron por MS/MS. Todas las muestras provenientes de MS/MS fueron



analizadas utilizando el software Mascot (Matrix Science, Londres, UK; versión 2.5.1). Mascot fue programado para buscar en la base de datos NCBI nr_20150405 (para hongos). Los resultados revelados por el programa Mascot fueron analizados en el programa Scaffold (versión Scaffold_4.4.3, Proteome Software Inc. Portland, OR). La identificación de los péptidos fue aceptada siempre y cuando se pudiera establecer una probabilidad superior al 80% con el algoritmo Peptide Prophet. La identificación de la proteína era aceptada si se podía establecer una probabilidad superior al 90% y contenía al menos dos péptidos identificados. La probabilidad de los péptidos fue asignada por el algoritmo Protein Prophet. Las proteínas que comparten evidencia de péptidos significativa se agruparon en clusters.

En la Tabla 9 se muestran todas las proteínas analizadas con el programa Scaffold que cumplieron todos los criterios de selección antes descritos y que presentaron una masa molecular cercana a la de la proteína de interés calculada (alrededor de 23.5 kDa). Todas las proteínas pertenecen a la familia de las carbohidrato esterasas y cuatro de ellas específicamente a la subfamilia de las cutinasas. Todas las proteínas tienen un porcentaje de identificación superior al 95% con excepción de la cutinasa de *Aspergillus fumigatus*. La abundancia de espectros varía en función de la enzima con la que la proteína fue previamente digerida, se observa que en el análisis de la carbohidrato esterasa de *Myceliophthora thermophila* hay 13 espectros cuando el tratamiento se hace con tripsina siendo la única proteína derivada del mismo. Sin embargo, cuando la digestión se realiza con quimotripsina aparecen una mayor cantidad de fragmentos que fueron identificados como pertenecientes a diversas cutinasas, siendo la cutinasa-2 de *Verticillium alfalfae* la más abundante contando con 29 espectros (ver Anexo 3).

Aunque los porcentajes de cobertura de los péptidos identificados son bajos (3.9-12.4%) el análisis mostró que entre éstos existen secuencias de péptidos específicas que son únicas para las proteínas identificadas independientemente de su tamaño. Dadas estas consideraciones se identificó a la proteína de interés (“impranilasa”) como una cutinasa perteneciente a la familia de las carbohidrato esterasas.



Tabla 9. Valores de masa molecular, probabilidad de identificación y % del espectro asociados a las proteínas identificadas en la muestra por espectrometría de masas.

Nombre de la proteína	Masa Molecular (Da)	Probabilidad de identificación	Porcentaje de cobertura de la secuencia	Espectros totales	
				Tripsina	Quimiotripsina
Carbohidrato esterasa de la familia 5 [<i>Myceliophthora thermophila</i> ATCC 42464]	23,764.9	95.50%	3.90%	13	0
Cutinasa-2 [<i>Verticillium alfalfae</i> VaMs.102]	23,386.5	99.90%	3.57%	0	29
Cutinasa 1 [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	22,263.6	99.90%	3.76%	0	3
Cutinasa [<i>Aspergillus fumigatus</i> var. RP-2014]	22,468.7	98.10%	12.40%	0	2

Las cutinasas (3.1.1.74) son enzimas que catalizan la hidrólisis de polímeros de cutina a monómeros de cutina (Figura 32) cuya estructura consta de un enlace éster unido a cadenas alifáticas, la cual es muy similar a la estructura del poliuretano. La cutina es un componente estructural polimérico de la cutícula de plantas. Se sabe que las cutinasas de varios hongos son capaces de hidrolizar *p*-nitrofenil ésteres y ácido hexadecanóico (Purdy y Kolattukudy, 1975).

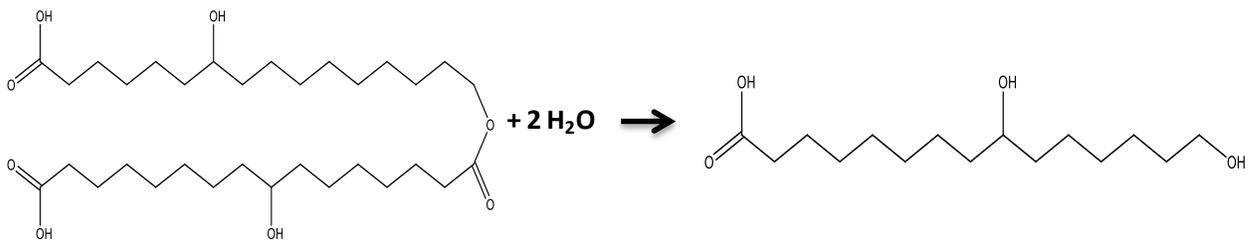


Figura 32. Reacción de hidrólisis de la cutina. (<http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.1.1.72>)

Las cutinasas son moléculas compactas de un solo dominio cuya estructura tridimensional consta de un arreglo ($\alpha/\beta/\alpha$)-sandwich, con un núcleo hidrofóbico que contiene cinco estructuras β -plegadas levemente torcidas rodeadas de 4 α -



hélices (Figura 33) (Longhi y Cambillau, 1999). Pertenecen a la clase de las serina esterasas y a la superfamilia de las α/β -hidrolasas, tienen una “maquinaria” catalítica compuesta por un nucleófilo, un ácido y una histidina, lo cual es una característica común que comparten la mayoría de las esterasas, lipasas y serín proteasas. El sitio activo consiste de una triada catalítica compuesta de serina, ácido aspártico e histidina (Figura 32) los cuales son altamente conservados entre las diferentes secuencias de cutinasas de hongos filamentosos.

También cuenta con 4 cisteínas (C) que conforman un par de puentes disulfuro. El primero se forma entre las dos cisteínas más cercanas al grupo N-terminal, uniéndolo a un giro β y participa en la estabilización del plegamiento de toda la molécula. El segundo puente disulfuro consta de las dos cisteínas más cercanas al grupo carboxilo terminal las cuales juegan un papel importante en la estabilización de dos giros β consecutivos donde se localiza el ácido aspártico catalítico (D) (Loghni y Cambillau, 1999). Al igual que la tríada catalítica, estas cisteínas son altamente conservadas entre las cutinasas de diferentes especies de hongos.

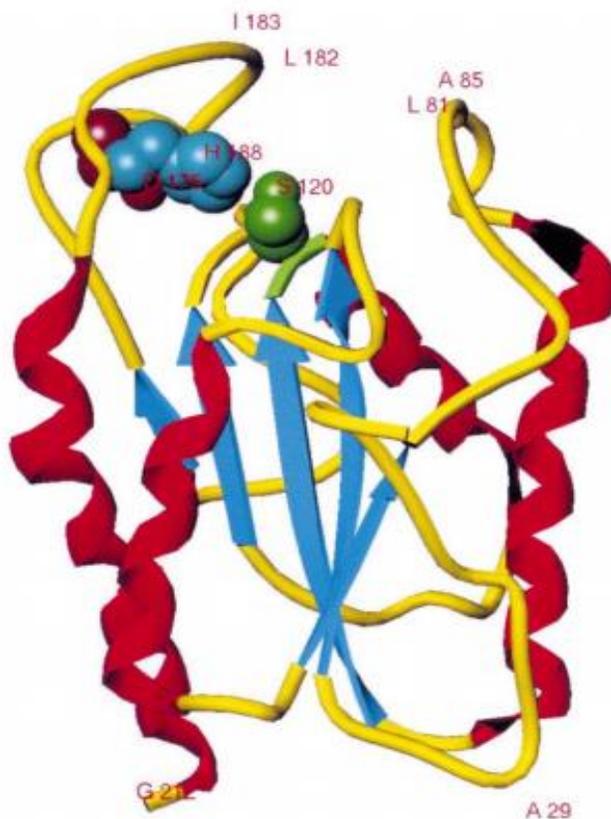


Figura 33. Estructura tridimensional representativa de la cutinasa perteneciente al hongo *Fusarium solani*. Se observan las estructuras α -hélices en rojo, β -plegadas en azul y las vueltas en amarillo. Los residuos de la triada catalítica se observan representados por esferas: verde para serina, azul para histidina y rojo para el ácido aspártico (Longhi y Cambillau, 1999).



De acuerdo a la base de datos BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>) el pH óptimo de las cutinasas en hongos está entre 7.5 y 8 y con un intervalo de actividad entre 3 y 9. La temperatura óptima reportada es de 25-30 °C, el tamaño reportado está entre 20 y 39 kDa el cual concuerda con el calculado para la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 de 23.5 kDa.

Se sabe que las cutinasas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces éster de varios polímeros incluyendo poliacrilonitrilo, poliamida y el polietilenoftalato (Guebitz y Cavaco-Paulo, 2007) (Figura 34). James Baker *et al.*, (2012) reporta cutinasas de diferentes hongos utilizadas para la hidrólisis de ésteres y la biosíntesis de polímeros. Géneros como *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Humicola insolens* y *Fusarium solani* producen cutinasas con actividad a diferentes intervalos de pH. La cutinasa de *Fusarium solani* ha sido la más estudiada y se ha utilizado *in vitro* para hidrolizar ésteres sintéticos (Purdy and Kolattukudy 1973; Liu *et al.*, 2009), triglicéridos de cadena larga (Melo *et al.*, 1995) y películas de polietileno (Gomes *et al.*, 2014). No existe en la literatura reportes de cutinasas de *Cladosporium* sp. ni cutinasas relacionadas con la degradación de poliuretano.



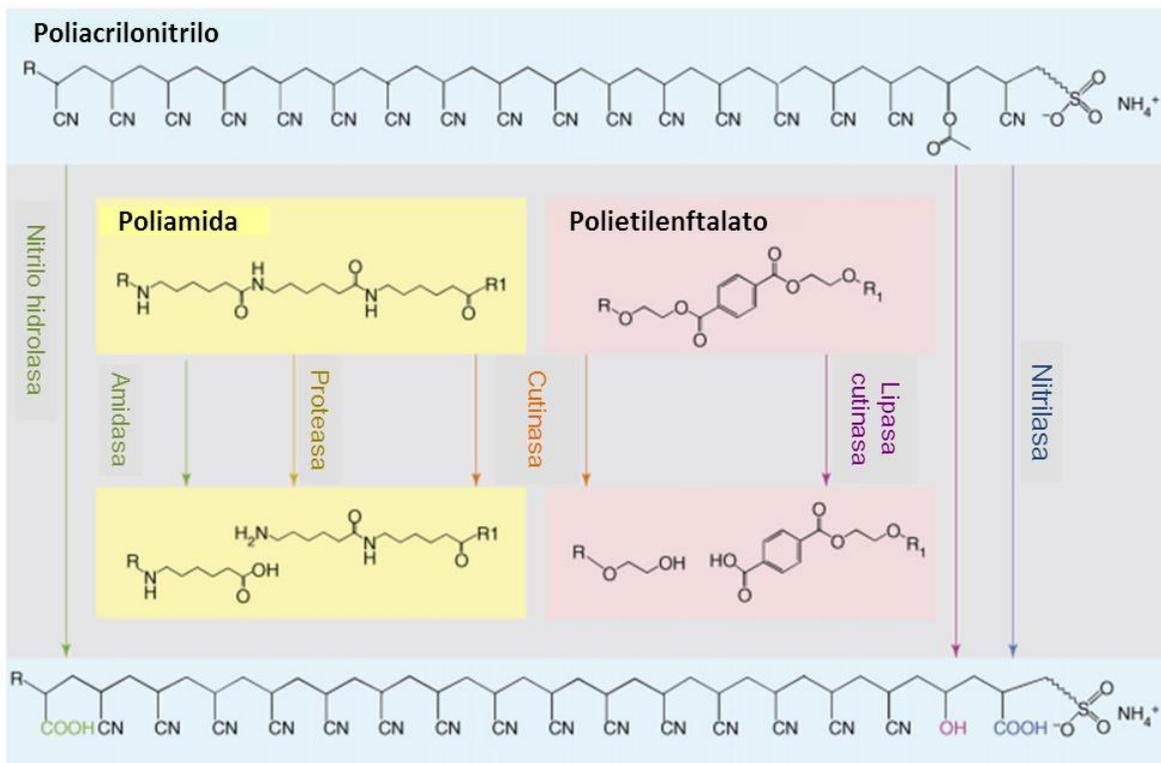


Figura 34. Reacciones de hidrólisis que puede catalizar la cutinasa sobre diferentes polímeros (modificado de Guebitz y Cavaco-Paulo, 2007).

8.8. Caracterización cinética de la “impranilasa”.

Para obtener proteína pura se repitió la purificación de la cutinasa por cromatografía de exclusión molecular. Se obtuvieron fracciones de la proteína de interés pura en las fracciones de la 26 a la 32, siendo la 30 la que tuvo mayor concentración de proteína y por lo mismo fue la que se empleó para los ensayos cinéticos (Figura 35). Todas las fracciones fueron cuantificadas por Bradford.



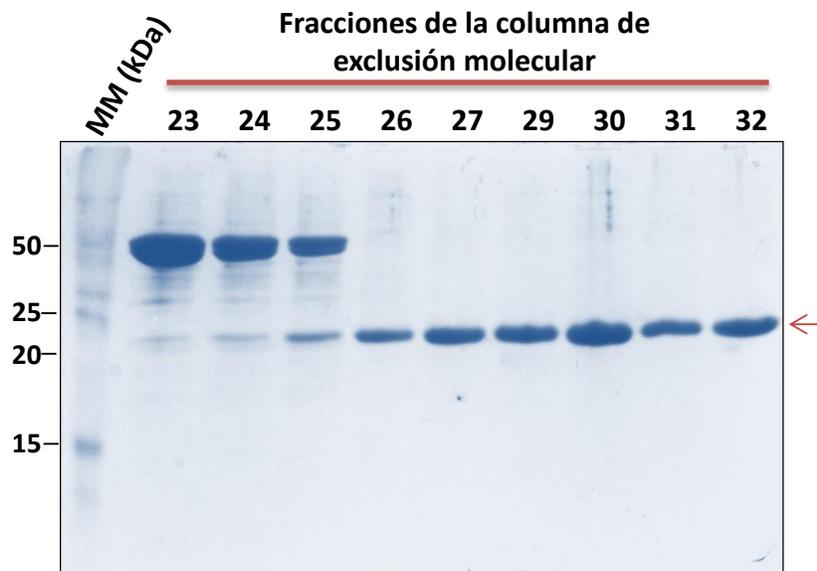


Figura 35. Análisis de las fracciones de la columna de exclusión molecular por SDS-PAGE mostrando la cutinasa pura. La columna se cargó con 7 mg del concentrado proteico extracelular de *C. tenuissimum* A3.I.1 cultivado en MM-Impranil. Se muestran las fracciones 23 a 32. Marcador molecular (MM): Precision Plus Protein Standards™ Dual Color (BIO-RAD). La flecha señala la cutinasa pura de aproximadamente 23 kDa.

8.8.1 Cálculo de la actividad específica de la cutinasa utilizando Impranil como sustrato.

Para el cálculo de la actividad específica se realizaron cinéticas como previamente se describió (sustrato Impranil 1% (0.1 mg), amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5) con diferentes concentraciones de proteína (0.125, 0.25, 0.375 y 0.5 μ g) en un volumen de reacción de 1 mL y se monitoreó por turbidimetría a $DO_{600\text{ nm}}$ cada 30 s por 4 min. En la Figura 36 se muestran las cinéticas obtenidas para cada concentración.



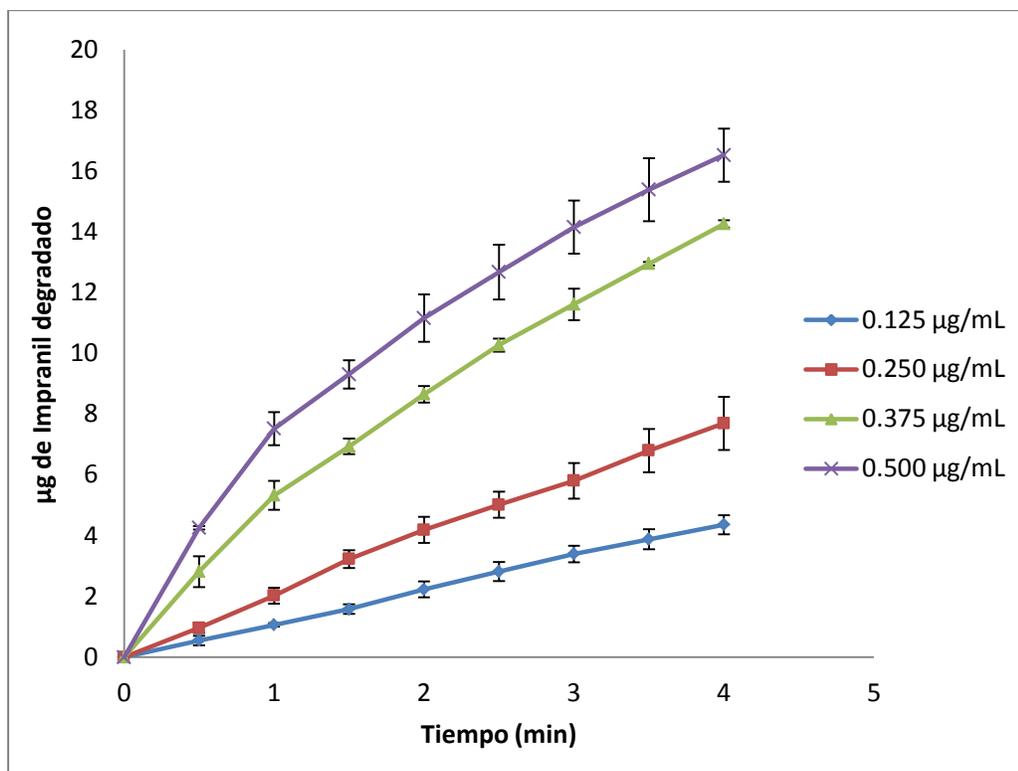


Figura 36. Análisis curso-temporal de degradación de Impranil por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1. Volumen de reacción 1 mL, concentración de sustrato: 100 µL Impranil (1%), amortiguador de reacción: fosfatos 50 mM pH 6.5. Las reacciones fueron cuantificadas por turbidimetría a una $DO_{600\text{ nm}}$, con diferentes concentraciones de proteína. (n=3).

En cada cinética se calculó la velocidad inicial (v_0) (pendiente), considerando únicamente los valores en la parte lineal de la curva. Posteriormente se graficó v_0 vs concentración de proteína con lo que se determinó la actividad específica de la reacción, la cual corresponde a los µg de Impranil transformados por cada µg de enzima por minuto (Figura 37). La actividad específica de la “impranilasa” con la cutinasa pura de *C. tenuissimum* A3.I.1 fue de 12.683 µg de Impranil degradado/min/µg de proteína. La actividad específica aumentó 15.1 veces como consecuencia de la purificación, ya que la actividad específica de concentrado proteico sin tratar fue de 84 µg de Impranil/min/µg de proteína (Tabla 8).



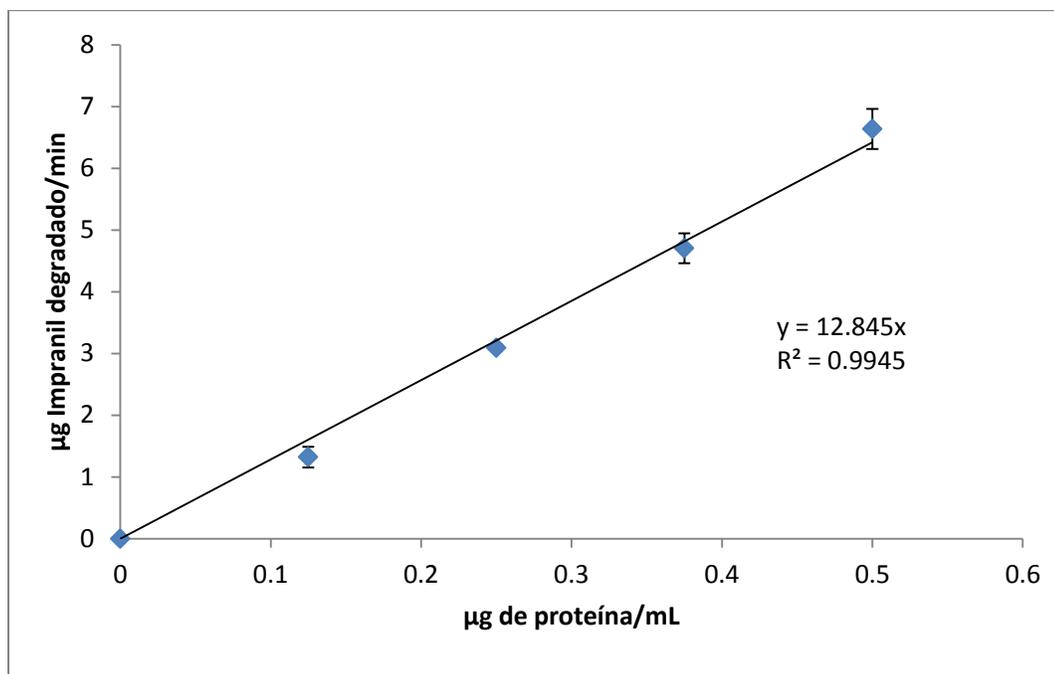


Figura 37. Cálculo de la actividad específica de la cutinasa pura sobre Impranil. Gráfico de las velocidades iniciales (v_0) vs la concentración de proteína y ecuación que representa la actividad específica. ($n=3$).

8.8.2. Determinación de la temperatura óptima de reacción.

Para determinar la temperatura en la que la cutinasa puede degradar más eficientemente el Impranil se realizaron ensayos enzimáticos a diferentes temperaturas con una concentración de enzima equivalente a $0.25 \mu\text{g/mL}$ (de acuerdo con los resultados de experimento anterior). La cinética se siguió durante 3 min, tomando lecturas cada 30 s. Se evaluó la degradación de Impranil determinando la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ a 10, 20, 25, 30, 40, 50 y 60°C . En la Figura 38 se observa la variación en la actividad de la enzima dependiendo de la temperatura, siendo 25°C la temperatura donde se presenta mayor actividad.



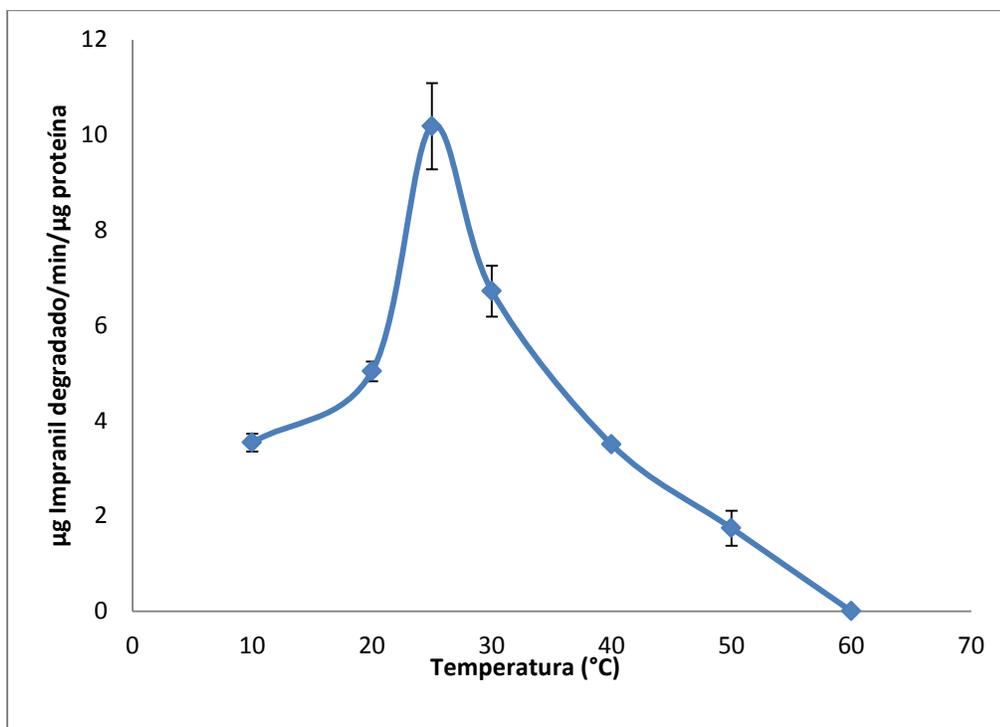


Figura 38. Efecto de la temperatura de reacción sobre la actividad degradativa de la cutinasa. Volumen de reacción: 1 mL, sustrato: Impranil (0.1 mg/ml), amortiguador: fosfato 50 mM pH: 6.5, concentración de proteína 0.25 µg/mL. La temperatura fue de 10, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 °C y se analizó en el equipo Agilent 89090A, que cuenta con control de temperatura. (n=3).



8.8.3. Determinación del pH óptimo de reacción.

Con el fin de determinar cuál sería el pH donde existe mayor degradación con la enzima, se realizaron reacciones a diferentes pHs (3, 4, 5, 6, 7 y 8) utilizando el amortiguador Mcllvaine (cuyo rango de pH es de 2.2 a 8). Las reacciones se realizaron utilizando como sustrato Impranil 1% (10 mg), una concentración de enzima equivalente a 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 25 $^{\circ}\text{C}$, de acuerdo con el resultado de temperatura óptima de reacción. La cinética se siguió cada 30 s por 3 min y se evaluó la degradación de Impranil por turbidimetría a 600 nm. En la Figura 39 se observa la variación de la actividad de la enzima dependiendo del pH, mostrando la máxima actividad a pH 7, el cual es cercano al pH óptimo de las cutinasas reportadas que se encuentra entre 7.5 y 10; con un rango de actividad entre 3-10. A pH 3 se pierde la actividad y a pH 8 la actividad disminuye.

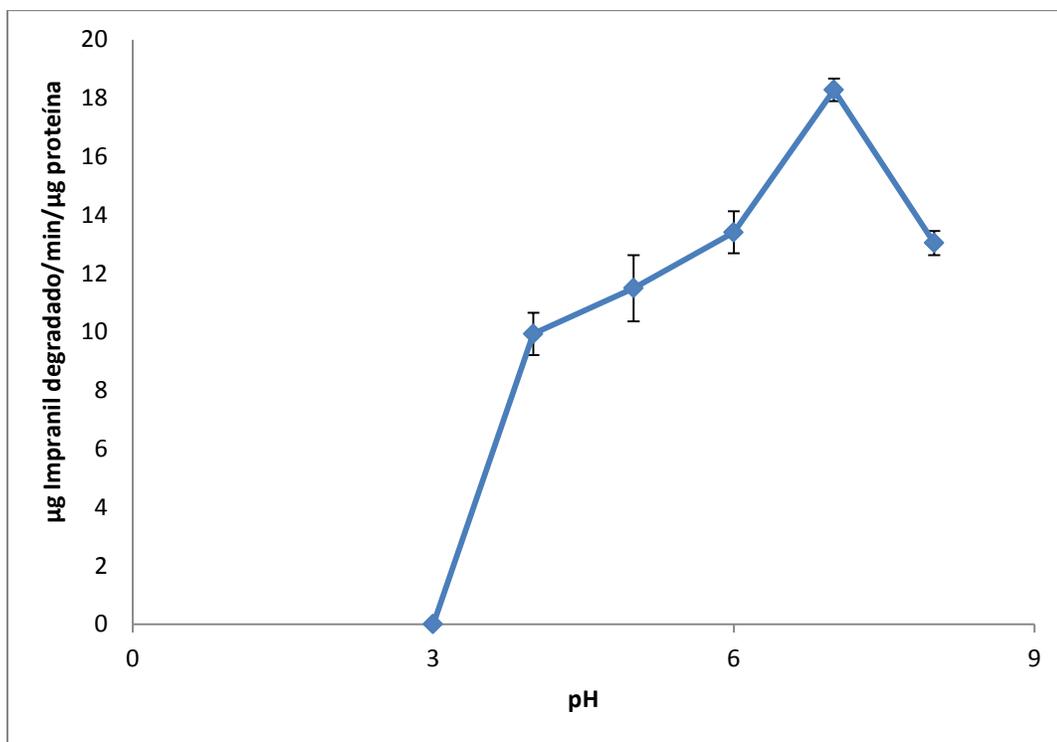


Figura 39. Efecto del pH sobre la actividad degradativa de la cutinasa en Impranil. Volumen de reacción 1 mL, sustrato: Impranil 10 mg/mL, 25 $^{\circ}\text{C}$, concentración de proteína 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se utilizó el amortiguador Mcllvaine que tiene un amplio rango de posibles pHs, los pHs probados en este ensayo fueron de 3 a 8. (n=3).



8.9. Caracterización cinética de la “impranilasa” con *p*-NPA como sustrato.

Para analizar la eficiencia catalítica con un sustrato tipo para la actividad esterasa (*p*-NPA) de la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1, se realizaron curvas con diferentes concentraciones de sustrato y proteína, que permitieron calcular las características cinéticas de la proteína (K_m , k_{cat} , K_m/k_{cat}). Estos valores fueron comparados con los valores reportados para otras cutinasas en la base de datos BRENDA.

8.9.1. Curva patrón que relaciona la $DO_{405\text{ nm}}$ con la hidrólisis del *p*-NPA.

Se realizó una curva patrón que permitió relacionar la $DO_{405\text{ nm}}$ con la hidrólisis del *p*-NPA (Figura 40).

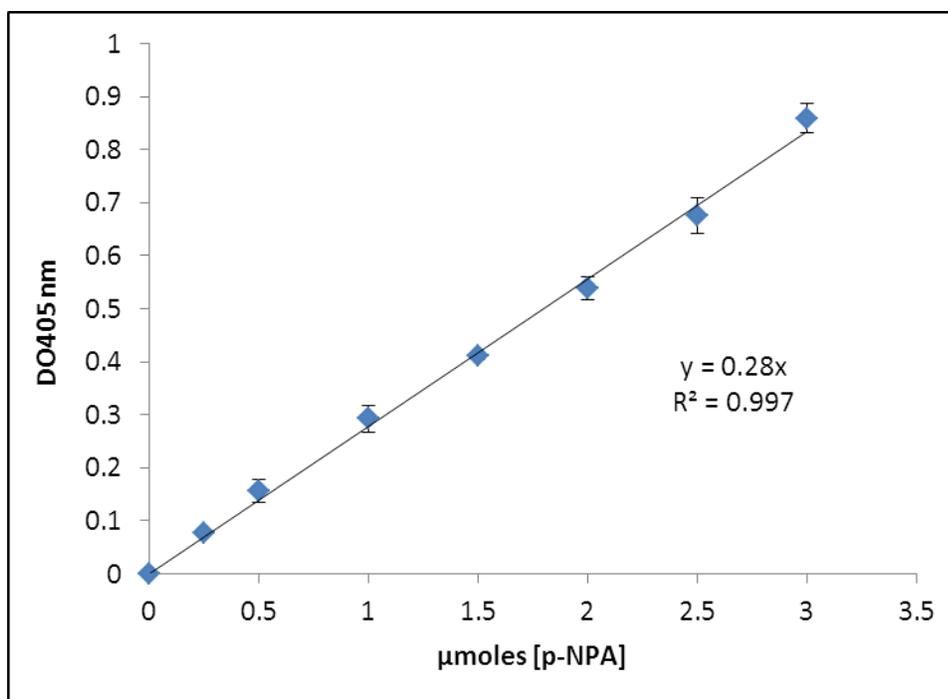


Figura 40. Curva patrón que relaciona la hidrólisis de *p*-NPA con la $DO_{405\text{ nm}}$ ($n=3$). Volumen de reacción 1 mL, amortiguador: Mcllvaine pH7, 25 °C.



8.9.2. Cálculo de la actividad específica con *p*-NPA como sustrato.

Se realizaron cinéticas con *p*-NPA como sustrato y diferentes concentraciones de la cutinasa pura (0.065, 0.094, 0.125, 0.187 y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las reacciones fueron monitoreadas colorimétricamente a una $\text{DO}_{405 \text{ nm}}$ cada 15 s por 3 min (Figura 41A). En cada una se calculó la velocidad inicial (v_0) (pendiente), considerando únicamente los valores en la parte lineal de la curva. Posteriormente se graficó v_0 vs concentración de proteína con lo que se determinó la actividad específica de la reacción que fue de 11.092 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína (Figura 41B).



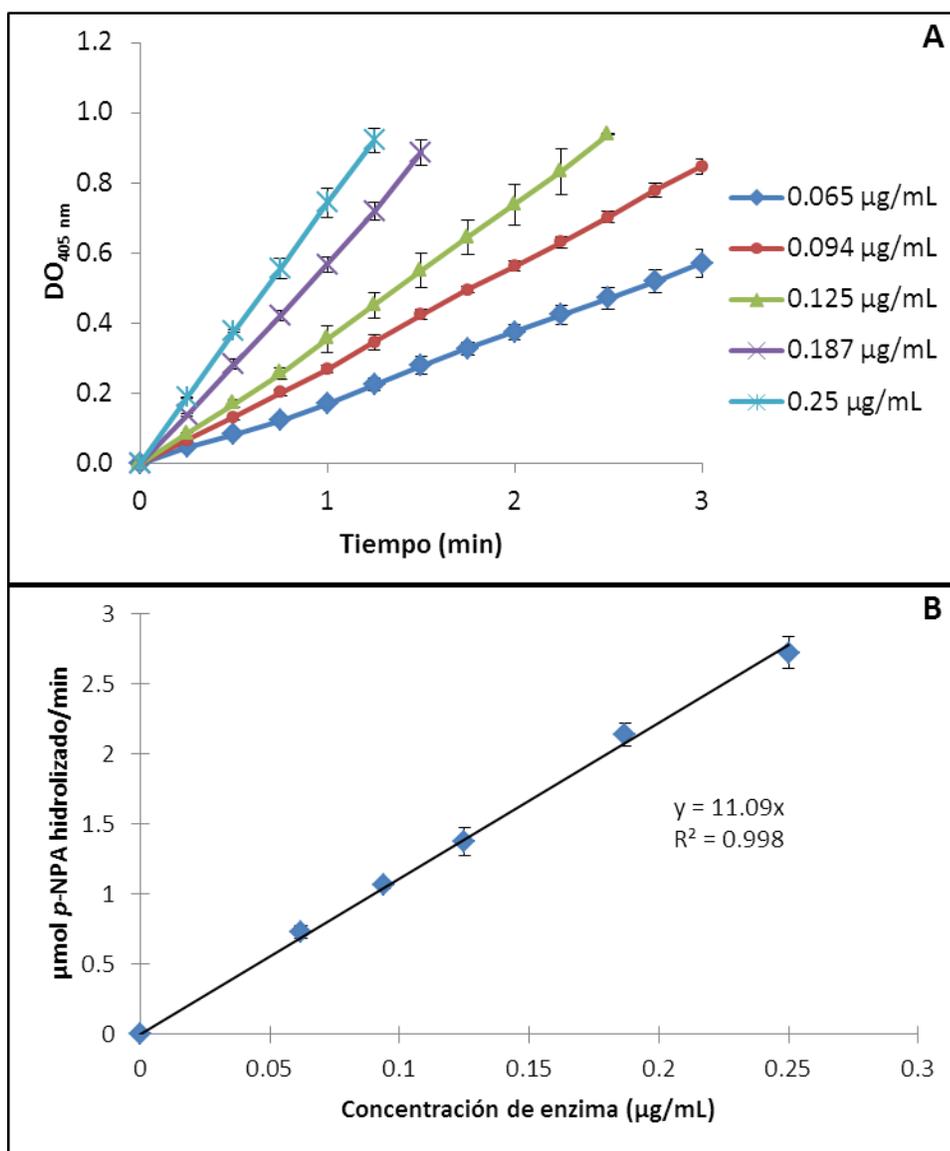


Figura 41. Análisis curso-temporal de hidrólisis de *p*-NPA por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.1.1 utilizando diferentes concentraciones de proteína (A) y cálculo de su actividad específica (B). A) Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 1 mL con, concentración de *p*-NPA 5 mM, amortiguador: Mcllvaine pH 7, 25°C, concentración de proteína: 0.065, 0.094, 0.125, 0.187 y 0.250 µg/mL. La reacción se monitoreo cada 15 s por 3 min. Se monitoreó la producción de *p*-nitrofenóxido a DO_{405 nm}. (n=3). B) Gráfico de las velocidades iniciales (v_0) vs la concentración de proteína y ecuación que representa la actividad específica.



8.9.3. Determinación de los parámetros cinéticos utilizando *p*-NPA como sustrato.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos se realizaron curvas con diferentes concentraciones de sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo con las condiciones establecidas anteriormente en un volumen de 1 mL, con 0.125 μg de cutinasa pura de *C. tenuissimum* A3.I.1, amortiguador Mcllvaine pH 7, temperatura de 25°C y diferentes concentraciones de *p*-NPA (1-7 mM) (Figura 42).

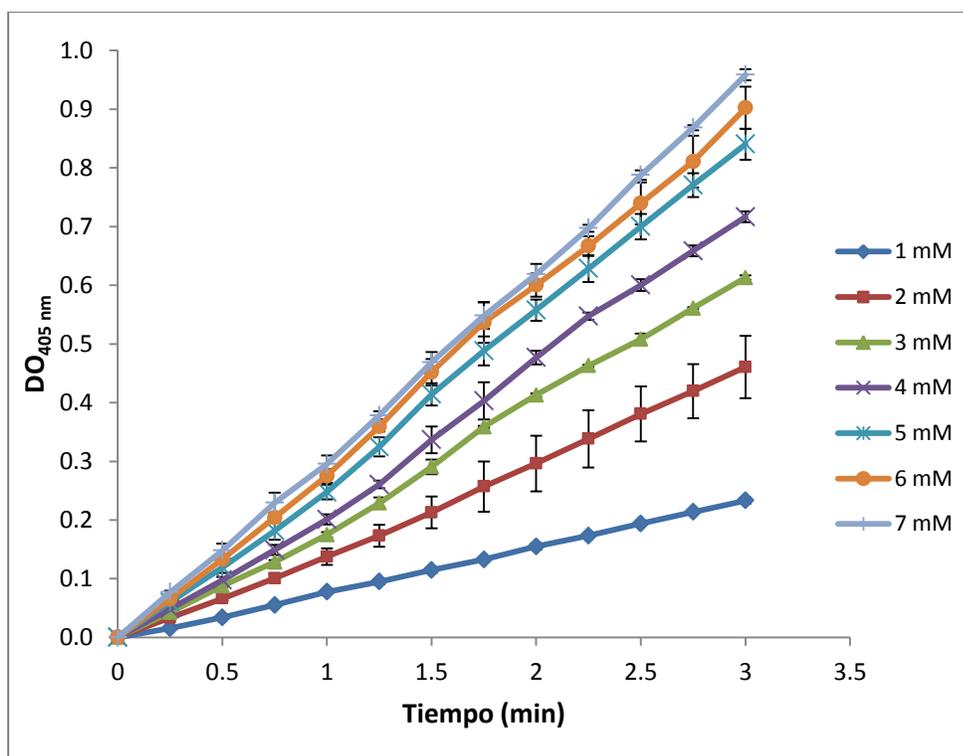


Figura 42. Análisis curso-temporal de hidrólisis de *p*-NPA por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 utilizando diferentes concentraciones de sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 1 mL. Las concentraciones de *p*-NPA probadas fueron de 1 a 7 mM, amortiguador: Mcllvaine pH 7, concentración de proteína: 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La reacción se siguió cada 15 s por 3 min. Se monitoreó la producción de p-nitrofenóxido a la $DO_{405 \text{ nm}}$. (n=3).



La Figura 43 muestra la cinética de la cutinasa con diferentes concentraciones de *p*-NPA. Para calcular los parámetros cinéticos se realizó una regresión no lineal con ayuda del programa Nonlinear Least Squares Regression (Curve Fitter) (<http://statpages.info/nonlin.html>) la cual fue ajustada de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad [S] = \text{a la concentración de sustrato en M}$$

Los parámetros obtenidos se compararon con los reportados en la base de datos BRENDA los cuáles fueron obtenidos con *p*-NPA como sustrato y en condiciones de temperatura y pH similares a las utilizadas en este trabajo (<http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.1.1.74>, 19/04/2016). Dichos valores se encuentran resumidos en la Tabla 10, incluyendo algunas características de la proteína.

De acuerdo con el programa se obtuvo un valor de K_m de 3.62 ± 0.12 mM, la K_m o constante de Michaelis-Menten representa la concentración de sustrato con la cual se alcanza la velocidad máxima y su valor indica la afinidad que tiene la enzima por el sustrato. Una K_m elevada implica una baja afinidad por el sustrato. En comparación con otras cutinasas reportadas, las cuales en la mayoría de los casos se observa un valor de K_m entre 0.00067 y 3 mM utilizando *p*-NPA como sustrato; la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 demostró no ser tan afín por el *p*-NPA como las otras cutinas.

El valor de la V_{max} se obtiene cuando la velocidad comienza a ser independiente de la concentración de sustrato, es un valor teórico y representa cuando toda la enzima se encuentra unida al sustrato. Para la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 se obtuvo un valor de 13.73 ± 0.20 mM/min/ μ g el cual se utilizó para obtener la constante catalítica (k_{cat}), también llamada número de recambio, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]} \quad [E_t] = \text{concentración total de la enzima en M}$$

Esta constante se refiere a la capacidad del complejo enzima-sustrato para generar producto y se define como el número de moles de S convertidos en P por unidad



de tiempo. La k_{cat} de la cutinasa fue de 5.39 s^{-1} la cual es baja comparada con las reportadas para *Fusarium solani* y *Thermobifida cellulosilytica*.

Para determinar la eficiencia catalítica se realizó el cálculo de la relación k_{cat}/K_m la cual se le conoce como constante de especificidad. En este caso se obtuvo un valor de: $1.49 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Comparándolo con los valores reportados para otras cutinasas que están entre 0.00000167 y $291 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, el valor obtenido es bajo por lo que la proteína no tiene una buena eficiencia catalítica.

Aunque se haya obtenido un alto valor de K_m y una baja eficiencia catalítica, se debe considerar que en este trabajo se demostró la degradación de PU por CG-MS por parte de las enzimas fúngicas. Por lo que compuestos con enlaces uretano posiblemente sean sustratos más afines para la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1. Se sabe que las cutinasas tienen la posibilidad de hidrolizar varios tipos de compuesto por lo que, para caracterizar la actividad de ésta cutinasa sobre el PU se tendrían que hacer cinéticas empleando otras moléculas estructuralmente relacionadas al polímero, y con ello valorar la actividad catalítica real de esta proteína sobre la degradación de PU.



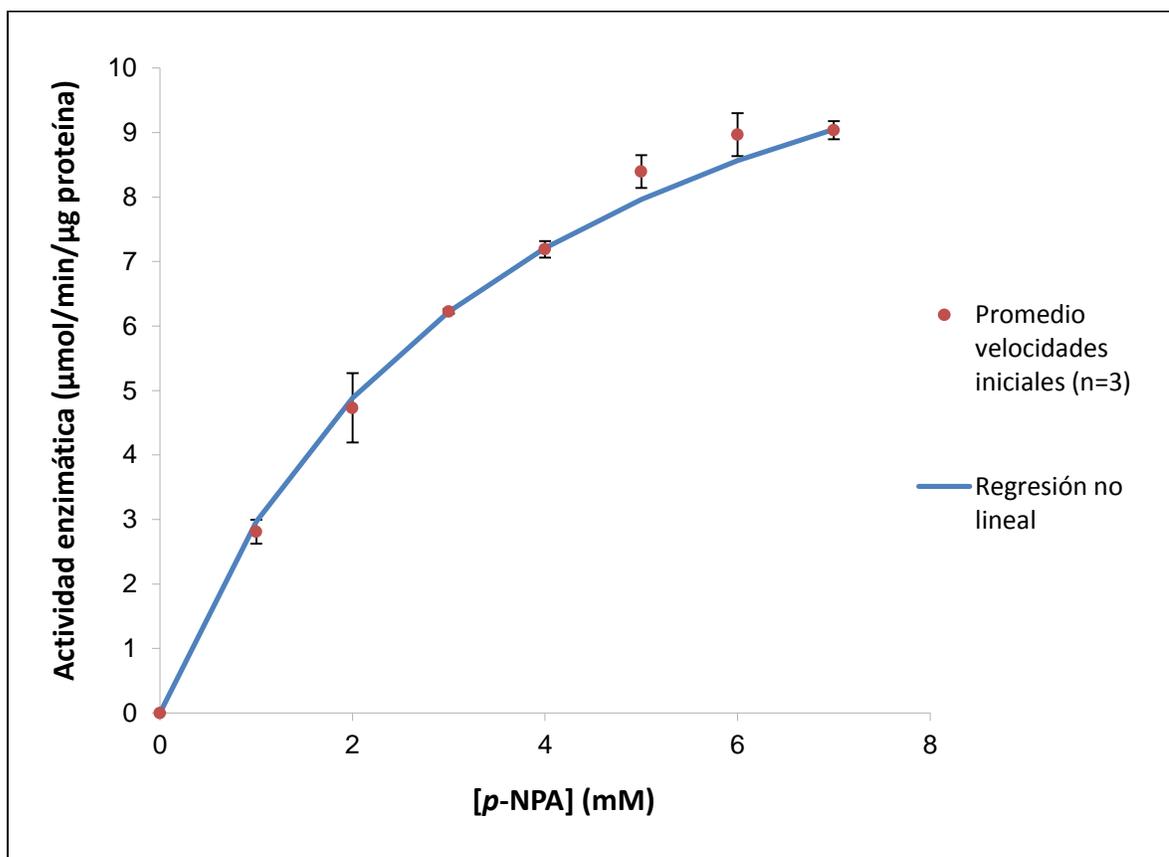


Figura 43. Promedio de las velocidades iniciales (v_0) relacionadas a la concentración de p -NPA que fue hidrolizado por la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 y ajuste a un modelo de regresión no lineal (Nonlinear Least Squares Regression (Curve Fitter)). (n=3).



Tabla 10. Características de la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1 comparadas contra las reportadas en BRENDA analizadas en condiciones similares (<http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.1.1.74>)*

Microorganismo	pH	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	T (°C)	Referencia
<i>Fusarium solani</i>	7.5	0.00067	2.83 x 10 ⁻⁸	4.2 x 10 ⁻⁵	-	Liu <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	7.5	0.00496	2.28 x 10 ⁻⁹	1.67 x 10 ⁻⁶	-	
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	7	0.8	35	44	25	Herrero Acero <i>et al.</i> , 2013
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	7	1.2	36	30	25	
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	7	1.3	207	159	25	
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	7	1.5	7	5	25	
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	7	1.5	436	291	25	
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	7	1.7	260	153	25	
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	7	1.9	25	13	25	
<i>Fusarium solani</i>	8	3	230	78	30	Gonçalves <i>et al.</i> , 2000
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	7	3.98	5.68	1.43	25	-
<i>Glomerella cingulata</i>	8	63	30.24	0.48	25	Seman <i>et al.</i> , 2014



9. Conclusiones

- Se determinaron cambios en los compuestos presentes en el Impranil, cuando es incubado con las cepas *C. tenuissimum* A3.I.1, *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 y *A. fumigatus* A2.PL.1; y un control sin inocular. Se observó disminución de los compuestos con enlaces éster y aumento en compuestos con grupos diisocianato y alcohol, lo que sugiere ruptura del enlace uretano.
- Se logró estandarizar un método eficiente para obtener y concentrar proteínas extracelulares provenientes de cultivos de hongos filamentosos cultivadas en medio mineral con Impranil como única fuente de carbono.
- Realizando un escrutinio donde se emplearon ensayos de difusión radial y zimografías, se determinó que: sólo la cepa *C. asperulatum* BP3.I.2 tiene actividad ureasa, las seis cepas de *Cladosporium* mostraron actividad proteasa de 15 kDa y todas las cepas correspondiente a un polipéptido de 20 kDa
- De acuerdo al zimograma y a la cuantificación de la actividad “impranilasa”; se determinó que el concentrado protéico de la cepa *C. tenuissimum* A3.I.1 fue el mas activo y se seleccionó su proteína de 20 kDa para ser purificada e identificada.
- La purificación se llevó a cabo empleando cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico y se identificó, por espectrometría de masas, como una cutinasa de 23.53 kDa.
- Utilizando como sustrato *p*-NPA se determinaron los parámetros cinéticos de la cutinasa pura, una K_m de 3.62 ± 0.12 mM, V_{max} de 13.73 ± 0.2 mM/min/ μ g, k_{cat} de 5.39 s⁻¹ y una k_{cat}/K_m de 1.49 mM⁻¹s⁻¹.
- No se tienen reportes de cutinasas pertenecientes al genero *Cladosporium* ni con la capacidad de degradar poliuretano, por lo que el estudio de esta proteína es de gran relevancia.



10. Perspectivas

- Para conocer los enlaces que hidroliza la cutinasa sobre Impranil, realizar estudios de CG-MS de los compuestos presentes en el polímero antes y después del tratamiento con la enzima.
- Identificar el gen que codifica para la cutinasa utilizando las secuencias de los péptidos obtenidas por masas para generar primers que permitan amplificar el gen.
- Generar enzima recombinante en sistemas de expresión para controlar la producción de proteína.
- Ahondar en la capacidad de la cutinasa para degradar el poliuretano determinando su actividad en diferentes sustratos con enlaces ester y uretano en su estructura.
- Determinar si la cutinasa de *C. tenuissimum* A3.I.1. es capaz de degradar otros polímeros como son diversos poliuretanos y otros plásticos.
- Desarrollar un proceso biotecnológico que permita degradar poliuretano ya sea utilizando la enzima pura o el hongo.



Referencias

- Alavi-Nikje MM, Bagheri-Garmarudi A, Idris BA. 2011. Polyurethane waste reduction and recycling: from bench to pilot scales. *Des Monom Polym.* 14:395-421.
- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T. 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70:422-429.
- Álvarez-Barragán J. 2013. Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Anitha TS, Palanivelu P. 2013. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Prot Expr Purif.* 88(2):214-220
- Baker PJ, Poultney C, Liu Z, Gross R, Montclare JK. 2012. Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(1):2229-40.
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. APS Press. St. Paul Minnesota. USA. 218 p.
- Barratt SR, Ennos AR, Greenhalgh M, Robson GD, Handley PS. 2003. Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *J App Microbiol.* 95:78-85.
- Boubendir A. 1993. Purification and biochemical evaluation of polyurethane degrading enzymes of fungal origin. *Diss Abstr Int.* 53:4632-4638
- Braslaw J, Gerlock J. 1984. Polyurethane Waste Recycling. 2. Polyol Recovery and Purification. *Ind Eng Chem Process Des Dev.* 1904:557-561
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. 2010. Studies in Mycology No. 72 – The genus *Cladosporium*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 72:1-407.
- BRENDA, The Comprehensive Enzyme Information System. <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.1.1.74>.
- Cangemi JM, Dos Santos A, Neto SC, Chierice GO. 2008. Biodegradation of polyurethane derived from castor oil. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 18:201-6.
- Choi HS, Kima JW, Chaa YN, Kima C. 2006. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem.* 27: 31-44.
- Cole GT. 1997. Ammonia production by *Coccidioides immitis* and its possible significance to the host fungus interplay. *Host Fungus Interplay.* Vol 67:247-263.



- Conde-Ortiz MP. 2012. Presente y Futuro de la Industria del Plástico en México. <http://www.ptq.pemex.gob.mx/productosyservicios/eventosdescargas/Documents/Fo ro%20PEMEX%20Petroqu%C3%ADmica/2012/03%20Mercado%20pl%C3%A1sticos%20 2012.pdf>.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *App Environ Microbiol.* 73:5817-5824.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Handley PS, Robson GD. 2010. Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *App Environ Microbiol.* 76:810-819.
- Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun* 68:443-448.
- Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Walz SL, Schultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 33:103-113.
- Cregut M, Bedas M, Assaf A, Durand-Thouand M-J, Thouand G. 2011. Applying Raman spectroscopy to the assessment of biodegradation of industrial wastes. *Environ Sci Pollut Res.* 16:33-44.
- Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *App Environ Microbiol.* 16:900-905.
- Diaz P, Prim N, Pastor F. 1999. Direct fluorescent-based lipase activity assay. *Biotech.* 27:697-70
- Filip Z. 1979. Polyurethane as the sole nutrient source for *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *Europ J Appl Microbiol Biotechnol.* 15:20-24.
- Ghasemi MF, Bakhtiari MR, Fallahpour M, Noohi A, Moazami N, Amidi Z. 2004. Screening of urease production by *Aspergillus niger* strains. *Iranian Biomed J* 8: 47-50.
- Gomes LB, Klein JM, Brandalisell RN, Zenill M, Zoppasll BC, Coulon AN. 2014. Study of oxo-biodegradable polyethylene degradation in simulated soil. *Materials Research.* 17: 121-126.
- Gonçalves AM, Serro AP, Aires-Barros MR, Cabral JM. 2000. Effects of ionic surfactants used in reversed micelles on cutinase activity and stability. *Biochim Biophys Acta.* 1480:92-106.
- Gregorí B, Alba L, Brown A, Fernández M, Moura B, Hoz Y. 2007. Los poliuretanos biodegradables. Estudio bibliográfico de su síntesis y aplicaciones. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223114970002>.
- Guerbitz GM, Cavaco-Paulo A. 2007. Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers. *Trends in Biotech.* 26:32-38.



- Herrero Acero E, Ribitsch D, Dellacher A, Zitzenbacher S, Marold A, Steinkellner G, Gruber K, Schwab H, Guebitz GM. 2013. Surface engineering of a cutinase from *Thermobifida cellulositica* for improved polyester hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 110:2581-90.
- Hincapié-Llanos GA, Ramírez-Cardona ME. 2009. Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores. *Rev Invest Aplicad.* 5:15-25.
- Hinrikson HP, Hurst SF, De Aguirre L, Morrison CJ. 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. *Med Mycol.* 43:S129-37
- Howard GT. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 40:245-252.
- Howard GT. 2012. Polyurethane biodegradation. *In: Microbial Degradation of Xenobiotics, Environmental Science and Engineering.* (S. N. Singh, ed.). Springer-Verlag. Berlín. 371-394.
- Kay MJ, McAbe RW, Morton LGH. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int Biodet Biodeg.* 31:209-225.
- Ibrahim IN, Maraqa A, Hameed KM, Saadoun IM, Maswadeh HM. 2011. Assessment of potential plastic-degrading fungi in Jordanian habitats. *Turk J Biol.* 35:551-557.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Thibault JF, Ceccaldi BC, Brunerie P, Asther M. 1996. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol.* 50:107-13
- Liu H, Bao X. 2009. Overexpression of the chitosanase gene in *Fusarium solani* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Curr Microbiol.* 58:279-282
- Liu Z, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss GL, Kong XP, Gross R, Montclare JK. 2009. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J Am Chem Soc.* 131:15711-6.
- Longhi S, Cambillau C. 1999. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *BBA.* 1441:185-196.
- Loredo-Treviño A, García G, Velasco-Téllez A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2011. Polyurethane foam as substrate for fungal strains. *Adv Biosc Technol.* 2:52-58.
- Mahajan N, Gupta P. 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *RSC Adv.* 5:41839-41834.
- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. 2000. Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:461-488.



- Mathur G, Prasad R. 2012. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus*. Appl Biochem Biotechnol. 167:1595-1602.
- Matsumiya Y, Murata N, Tanabe E, Kubota K, Kubo M. 2009. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. J App Microbiol. 108:1946-1953.
- Melo, E.P., Aires-Barros, M.R., Cabral, and J.M.S. 1995. Triglyceride hydrolysis and stability of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* in AOT-iso-octane reversed micelles. Appl. Biochem. Biotechnol. 50:45-56.
- Mora D, Monnet C, Parini C, Guglielmetti S, Mariani A, Pintus P, Molinari F, Daffonchio D, Manachini PL. 2005. Urease biogenesis in *Streptococcus thermophiles*. Res Microbiol. 156:897-903.
- Nakadari T, Nasuno S, Iguchi N. 1973. Purification and properties of leucine aminopeptidase II from *Aspergillus oryzae*. Agric Biol Chem. 37:767-774.
- Owen S, Otani T, Masaoka S, Ohe T. 1996. The biodegradation of low-molecular-weight urethane compounds by a strain of *Exophiala jeanselmei*. Biosci Biotechnol Biochem. 60:244-248.
- Pathirana RA, Seal KJ. 1983. *Gliocadium roseum* (Bainier), a potential biodeteriogen of polyester polyurethane elastomers. Biodeter. 5:679-689.
- Pettit D, Abbott, SG. 1975. Biodeterioration of Footwear. In: Microbial Aspects of the Deterioration of Material. J.R. Gilbert and D.W. Lovelock, eds. London~ New York, San Francisco: Academi. pp. 237-253.
- Purdy RE, Kolattukudy PE. 1975. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani*. Biochem. 14:2824-2831.
- Rahman M, Brazel CS. 2004. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. Prog Polym Sci. 29:1223-1248.
- Ren X. 2003. Biodegradable plastics: a solution or a challenge? J Clean Prod. 11:27-40.
- Rossi P, Kosior E, Iovenitti P, Massod S, Sbarski I. 2003. Polyester polyols for polyurethane foams from recycled PET. Plastic and Recycling Tech. 19:51-59.
- Ruiz C, Main T, Hilliard N, Howard GT. 1998. Purification and characterization of two polyurethane enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. Biodt Biodegrad. 43:43-47.
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kaucera J, Sandoval AG, Dantzler KW, Hickman D, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Nuñez SJ, Santiago M, Townes MA, Vishnevetsky M, Williams NE, Nuñez-Vargas PA, Strobel SA. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. Appl Environ Microbiol. 77:6076-6084.



- Scai Unidad de Espectrometría de Masas Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación. 2011. <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html>.
- Seman WM, Bakar SA, Bukhari NA, Gaspar SM, Othman R, Nathan S, Mahadi NM, Jahim J, Murad AM, Bakar FD. 2014. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions. *J Biotechnol.* 184:219–228
- Seo JS, Keum YS, Li QX. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health.* 6: 278-309.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotech Adv.* 26:246-265.
- Shibasaki S, Kawabata A, Tanino T, Kondo A, Ueda M, Tanaka M. 2009. Evaluation of the biodegradation of polyurethane and its derivatives by using lipase-displaying arming yeast. *Biocontrol Sci.* 14:171-175.
- TecnaPol S. A. de C. V. 2008. <http://www.tecnapol.com/content/view/42/41/lang.es/>
- Urbanski J, Czerwinski W, Janicka K, Majewska F, Zowall H. 1977. Handbook of analysis of synthetic polymers and plastics. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. 2013. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Meth.* 10:211-220.
- Villalobos-Hernandez JR, Muller-Goymann CC. 2006. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: the synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale. *Int J Pharm.* 322:161-170.
- Yong H, Zhang X, Zhang X, Huang H, Chang J, Chen H. 2013. A recycling model of excess toluene diisocyanate isomers in the preparation of polyurethane prepolymer. *J App Polymer Science.* 127: 2176-2183.
- Zafar U, Houlden A, Robson GD. 2013. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *App Environ Microbiol.* 79:7313-7324.
- Zafar U, Nzeram P, Langarica-Fuentes A, Houlden A, Heyworth A, Saiani A, Robson GD. 2014. Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting and analysis of associated fungal communities. *Biores Technol.* 158:374-377.
- Zavenhoven R. 2004. Treatment and disposal of polyurethane wastes: options for recovery and recycling. *Energy engineering and environmental protection publications.* Helsinki University of Technology. Department of Mechanical Engineering. pp 6-36.



Anexo 1. Preparación de soluciones

Medio papa dextrosa agar (PDA)

Para 1 Litro

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 min.
3. Filtrar por 5 capas de gasa.
4. Reponer el agua perdida para obtener 1 L, dividir en alícuotas de 250 mL.
5. Agregar 5 g de agar y 5 g de dextrosa por cada 250 mL, después de haber aforado.
6. Esterilizar por autoclave a 121 °C/15 min.

Nota: para preparar cajas de PDA el medio se debe verter en las cajas Petri cuando aún este tibio, evitando la presencia de grumos, se deja solidificar y se invierten. Todo debe hacerse en zona aséptica.

Medio caldo papa dextrosa (Potato dextrose broth, PDB)

Para 1 Litro

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 min.
3. Filtrar por 5 capas de gasa y centrifugar a 8,000 rpm 10 min. Utilizar el sobrenadante (tirar el pellet).
4. Reponer el agua perdida para obtener 1 L, dividir en alícuotas de 250 mL.
5. Agregar 5 g de dextrosa por cada 250 mL, después de haber aforado.
6. Esterilizar por autoclave a 121 °C/15 min.



Medio mínimo mineral (MM)

(Basado en el medio empleado por Russel *et al.*, 2011)

Solución A (10 X) para 1 L

NaH ₂ PO ₄	26.18 g
K ₂ HPO ₄	61.80 g

Solución B (100 X) para 1 L

(NH ₄) ₂ SO ₄	103.30 g
MgSO ₄	3.01 g

Solución C (1000 X) para 1 L

FeCl ₃ •6H ₂ O	39.70 g
ZnCl ₂ •4H ₂ O	2.92 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	3.86 g
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	2.47 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.47 g
CuCl ₂	1.48 g
MnCl ₂	1.51 g

Ácido (10 X) para 1L

HCl	18 mL
-----	-------

1. Preparar las soluciones A y B, esterilizar en autoclave 121 °C/15 min.
2. Preparar la solución C (elementos traza) disolviendo cada uno de los elementos en 50 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave a 121 °C/ 15 min, una vez estériles juntar todos los elementos traza y aforar a 1 L con agua destilada estéril.
3. Para realizar el medio, agregar la cantidad correspondiente de soluciones A, B y C. Agregar el agua desionizada (estéril) y agregar la fuente de carbono correspondiente.
4. Agregar el HCl y ajustar el pH a 6.

Nota: Para hacer medio sólido el orden cambia se debe agregar hasta el final la solución C y aforar con una solución de agua agar 2% en vez de agua.



Medio mínimo con Impranil® DLN al 0.5% de sólidos (MM-Impranil)

Realizar la mezcla de las soluciones A y B del MM y antes de agregar la solución C se le adiciona la cantidad requerida de Impranil® DLN. Tomar en cuenta que en la ficha técnica del barniz de poliuretano base agua (Impranil® DLN), se indica que el contenido de sólido es 50% por lo que para obtener una solución con una concentración al 0.5% hay que agregar el 1% de barniz referente al volumen total que se desea preparar.

Agua Agar

Agar	20.3 g/L
Agua	1 L

Para prepararlo se realiza la mezcla de agua con agar y se esteriliza en autoclave a 121 °C/15 min.

Medio urea de Christensen

Para 1 Litro

Urea	20 g
Agar	15 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Peptona	1 g
Glucosa	1 g
Rojo fenol	12 mg

1. Adicionar todos los componentes, excepto el agar, a 100 mL de agua desionizada.
2. Agitar hasta disolver y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.45 µm (solución A).
3. Adicionar el agar a 900 mL de agua desionizada y calentar a ebullición, agitando hasta disolver.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C/15 min.
5. Enfriar y adicionar la solución A en forma aséptica.



6. Mezclar y distribuir en cajas previamente preparadas para el ensayo de difusión radial.

Medio mínimo con leche descremada

Para 1 Litro

Leche descremada	10 g
Agar	16 g

Disolver la leche descremada en 100 mL de agua desionizada para obtener una solución al 10 X.

La caseína es una fosfoproteína proveniente de la leche de consistencia polvosa y de color crema. Se puede substituir la leche por caseína. Se debe preparar una solución al 4% de caseína para obtener una solución al 10X.

1. Pesar 10 g de leche descremada y disolverlo en 100 mL de agua desionizada para tener una solución al 100X.
2. Esterilizar por autoclave a 121°C/ 15 min.
3. Preparar la mezcla de MM en un matraz: 100 mL de solución A, 10 mL de solución B y 1 mL de solución C, ya estériles.
4. Agregar 100 mL de la solución leche descremada.
5. Pesar el agar, agregarlo en 100 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave 121 °C/15 min.
6. Una vez que la solución con agar esté tibia, agregarlo a la mezcla de soluciones con leche descremada.
7. Aforar a 1 L con agua destilada estéril.
8. Vaciar en cajas Petri (previamente preparadas para el ensayo de difusión radial) y dejar enfriar en zona aséptica.



Medio Tween 20® (Lelliot y Stead, 1987)

Para 1 Litro

Peptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1 g
Agar	16 g
Tween 20	10 mL
Agua destilada	1 L

1. Disolver en 800 mL de agua destilada la peptona, el cloruro de calcio y el cloruro de sodio.
2. Ajustar el pH a 7.4.
3. Agregar el Tween20
4. Aforar a 1 L.
5. Agregar el agar.
6. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.
7. Vaciar en cajas Petri previamente preparadas para el ensayo de difusión radial cuando la mezcla esté tibia y se vea translúcida la solución.

Gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).

Acrilamida 30% para 100 mL

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

1. Pesar los compuestos, disolverlos en 80 mL de agua en una parrilla con agitación y un poco de calor.
2. Aforar a 100 mL con agua desionizada en una probeta, filtrar la mezcla en un embudo con un filtro Whatman No. 1 u otro de poro grande, después de que se haya disuelto completamente almacenar a 4 °C.



Persulfato de amonio al 20% (10 mL)

Persulfato de amonio 200 mg

Este reactivo es higroscópico y puede deteriorarse creando problemas de gelificación. Se recomienda mantenerlo guardado en un desecador a temperatura ambiente.

1. Pesar el reactivo, disolverlo en 10 mL de agua desionizada.
2. Hacer alícuotas de 500 μ L en tubos eppendorf, etiquetarlas congelarlas a -20 °C. Al momento de usar, descongelar un tubo.

Preparación de geles SDS-PAGE 15%

Gel separador 15% (2 geles)

Agua desionizada	2.5 mL
Amortiguador separador	2.5 mL
Acrilamida al 30%	5 mL
Persulfato de amonio al 20%	62.5 μ L
TEMED	6.2 μ L

1. Armar al equipo de Bio-Rad para preparación de geles, utilizar los cristales de 1 mm de espesor, asegurarse que se encuentren completamente limpios y desengrasados.
2. Mezclar, el agua, el amortiguador separador y la acrilamida (30%).
3. Agregar casi al mismo tiempo el persulfato y el TEMED, agitar un poco y verter entre los cristales.
4. Poner inmediatamente un poco de etanol encima, para facilitar la polimerización y alinear el gel.
5. Dejar polimerizar y posteriormente quitar perfectamente todo el etanol antes de vaciar el gel apilador.



Gel apilador (2 geles)

Agua desionizada	2.4 mL
Amortiguador apilador	1.04 mL
Acrilamida al 30%	700 μ L
Persulfato de amonio al 20%	30 μ L
TEMED	5 μ L

1. Preparar de la misma forma que el gel separador.
2. Colocar encima del gel separador y colocar inmediatamente el peine para formar los carriles.
3. Dejar polimerizar para poder desprender el peine.

Amortiguador separador para 100 mL

Tris-base	18.17 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris, disolverlo en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH. Agregar el SDS y aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N

Amortiguador apilador para 100 mL

Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris disolverlo en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8
2. Agregar el SDS y aforar con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Ajustar el pH a 6.8 con HCl 12N



Amortiguador de carga 5X para 10 mL

Tris 1M pH 6.8	3.125 mL
Glicerol	5.0 mL
SDS (1% final)	0.5 g
Azul de bromofenol 10%	0.2 mL
β -mercaptoetanol	(ver nota)

1. Pesar y medir los ingredientes y llevarlos a 10 mL con agua desionizada.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Inmediatamente antes de usar agregar 4 μ L de β -mercaptoetanol por 20 μ L de amortiguador de carga. El amortiguador de esta receta es 5 veces concentrado es decir se debe usar 1/5 de amortiguador de carga por 1 volumen de muestra.

Amortiguador de corrida 10X

Para un litro

Tris-base	30 g
glicina	144 g
SDS	10 g

1. Disolver en 600 mL de agua desionizada la glicina, calentar un poco y agitar.
2. Agregar el Tris y esperar a que casi por completo esté solubilizado.
3. Verificar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8.
4. Agregar el SDS en polvo, disolverlo y ajustar el volumen a 1000 mL en una probeta. Almacenar a temperatura ambiente.
5. Antes de usarlo para correr el gel, medir 70 mL de este amortiguador 10X y llevarlo a 700 mL con agua desionizada.



Solución de Coomassie (100 mL)

Coomasie 0.05% en 50% metanol: 10% ácido acético glacial

Coomasie brillante blue R250	0.05 g
Metanol QP	50 mL
Agua	40 mL
Ácido acético glacial	10 mL

1. Pesar y medir los reactivos, disolverlos en un vaso de precipitados de vidrio (no usar plástico) con agitación a temperatura ambiente.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución desteñidora para 250 mL

20% Metanol: 7.5% ácido acético

Ácido acético glacial	18.75 mL
Metanol grado técnico	50 mL

1. Medir los reactivos y aforar a 250 mL.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de MUF-butirato 50 mM

1. Disolver 74 mg del 4-metilumbeliferil butirato en 6 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Separar en alícuotas de 1 ó 2 mL y etiquetar con la fecha y concentración (50 mM)
3. Almacenar a -20 °C. Deja de ser estable si se descongela más de 4 veces.
4. Para realizar la dilución a 1.6 mM se utiliza etilenglicol. Preparar sólo lo necesario para un gel (3 mL)



Solución de Tritón-X100 2.5%

Para un litro

Tritón-X100 25 mL

1. Disolver 12 mL de la solución de Tritón-X100 en 500 mL de agua desionizada.
2. Aforar a 1 L.

Preparación de amortiguador McIlvaine

Na₂HPO₄ 14.196 g
Ácido cítrico 21.014 g

1. Preparar 500 mL de solución de Na₂HPO₄ 0.2 M y 500 mL de solución de ácido cítrico 0.1 M por separado.
2. Combinar las soluciones para obtener 20 mL de solución a diferentes pH de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla i. mL necesarios de las dos soluciones para preparar amortiguador McIlvaine a un pH determinado

pH	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (mL)	0.1 M ácido cítrico (mL)
3	4.11	15.89
4	7.71	12.29
5	10.3	9.7
6	12.63	7.37
7	16.47	3.53
8	19.45	0.55

Ajustar el pH en el potenciómetro ajustando con las soluciones de Na₂HPO₄ como base y ácido cítrico como ácido para que quede al pH deseado.

Solución de *p*-NPA 100 mM en acetonitrilo (500 µL)

p-NPA 9.05 mg
Acetonitrilo 500 µL

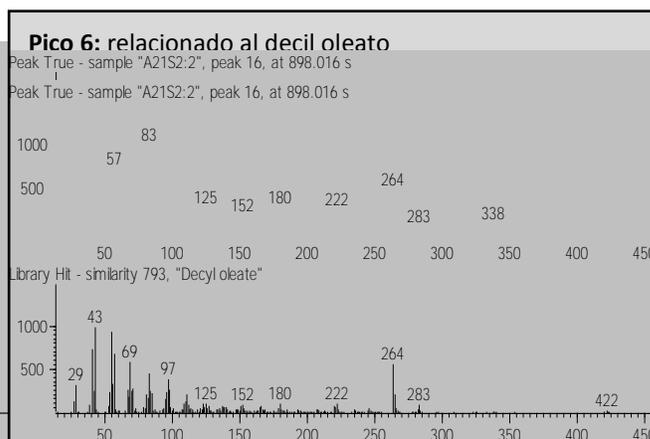
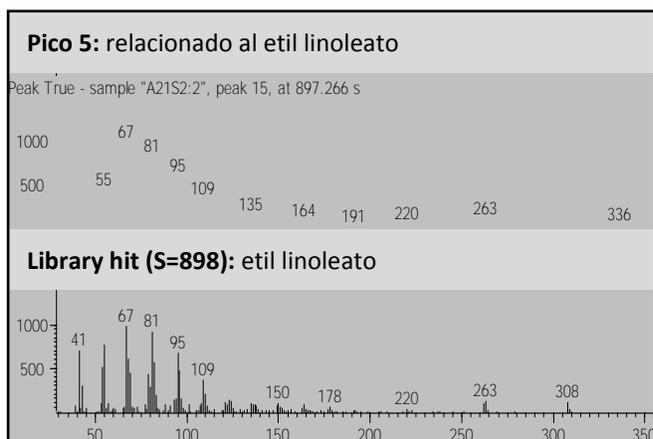
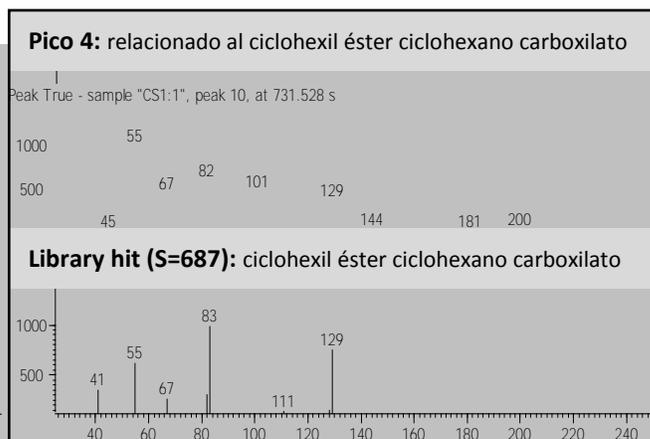
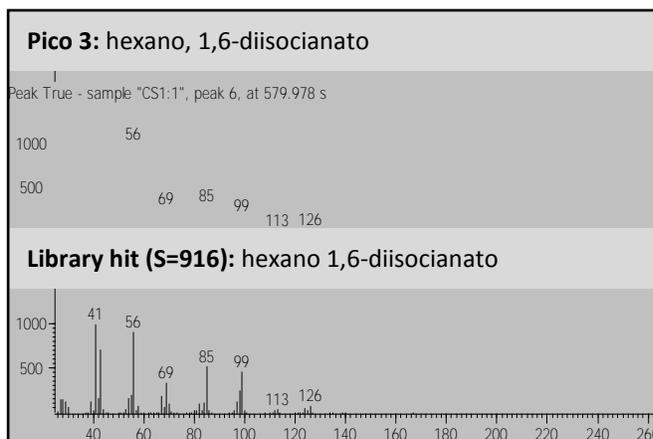
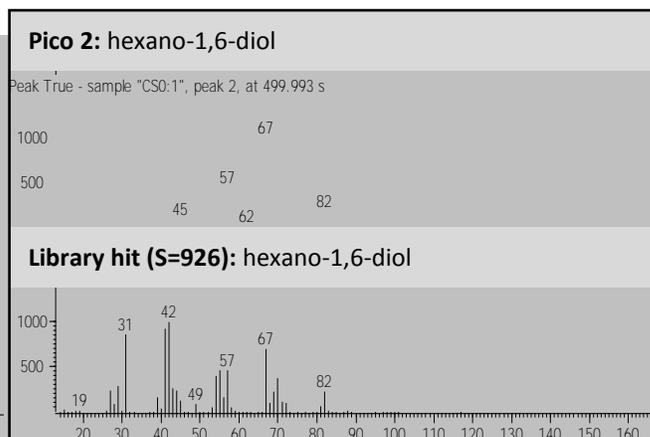
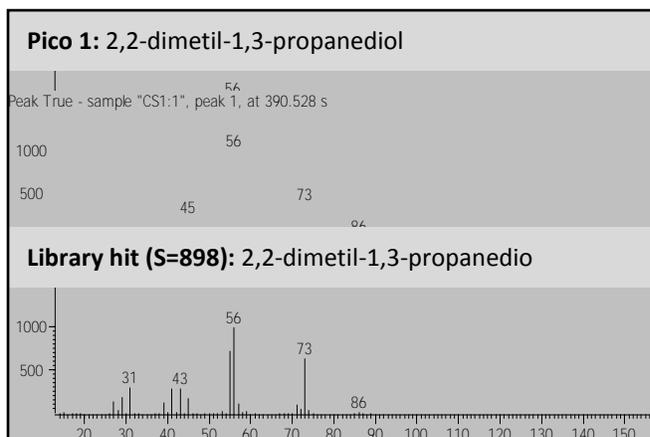


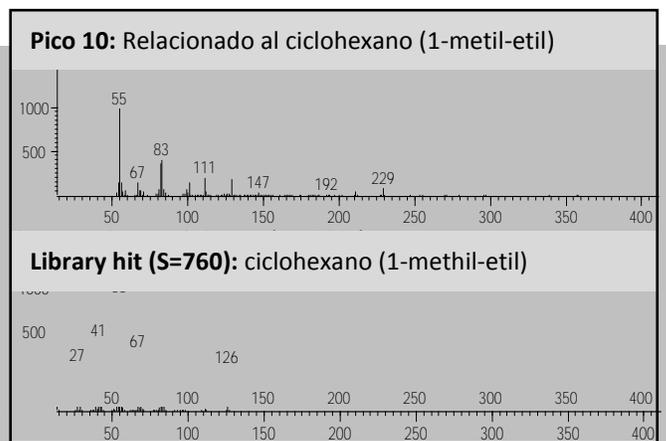
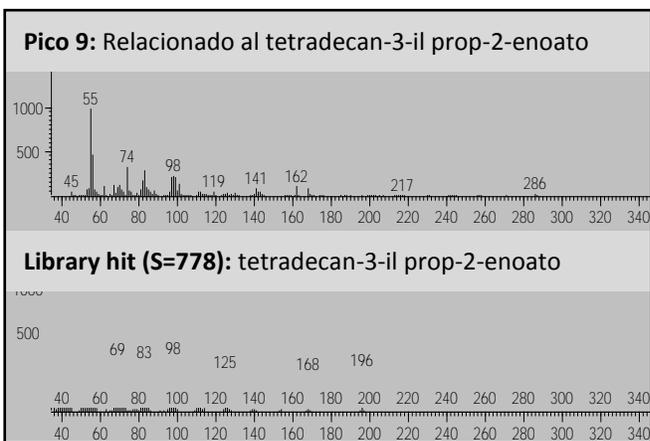
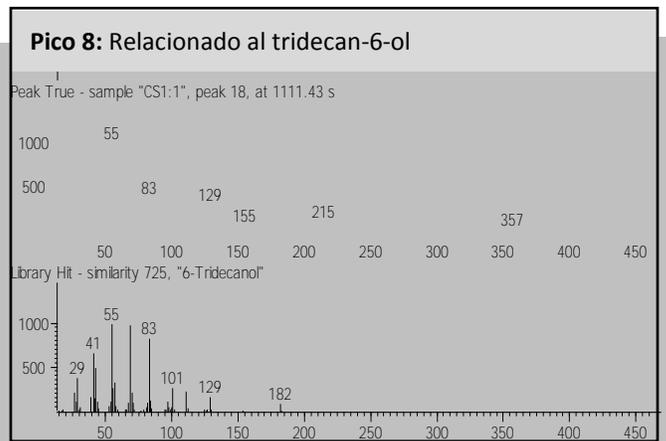
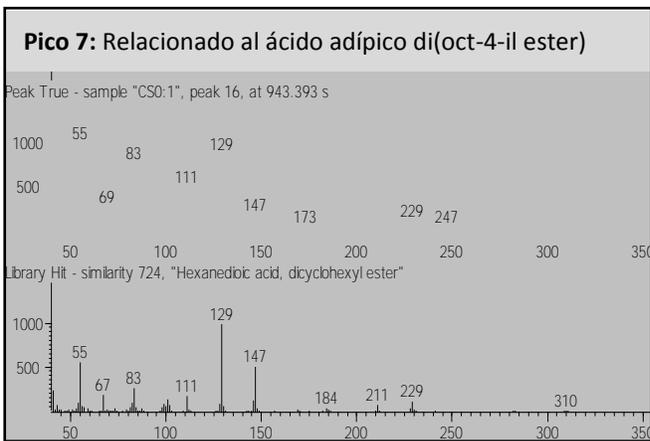
1. Pesar 9.05 mg de p-NPA en un tubo eppendorf.
2. Llevar a 500 μ L de acetonitrilo.
3. Mantener en hielo hasta ser utilizado.

Nota: este reactivo se debe preparar hasta que ya se vaya a utilizar ya que sufre hidrólisis espontánea y es poco estable, si la solución stock, presenta coloración amarilla, se debe desechar pues ya no sirve.



Anexo 2. Espectros de masas para la identificación de compuestos por CG-MS (s = similitud).





Anexo 3. Péptidos identificados por LC/MS/MS.

Cutinasa [*Aspergillus fumigatus* var. RP-2014]

gi|666431560, masa molecular: 22,468.7 Da.

Sombreado: 1 péptido exclusivo único 27/217 aminoácidos, 12% de cobertura, total de espectros: 6.

Secuencia de aminoácidos:

M	S	L	R	S	L	F	V	A	G	L	A	T	L	A	L	A	V	P	A	P	Q	I	Q	A	R	Q	G	M	S	S	N	E	L	E	S	G	P	C	R		
D	V	T	F	I	F	A	R	G	S	T	E	Q	G	N	M	G	L	I	V	G	P	G	V	C	S	S	L	K	K	D	L	G	S	D	K	V	A	C	Q		
G	V	G	G	A	Y	T	A	Q	L	A	P	N	F	L	S	Q	N	T	N	Q	A	S	I	N	A	A	T	D	M	F	D	L	A	N	T	K	C	P	N		
T	K	I	V	A	G	G	Y	S	Q	G	S	A	V	I	D	N	T	I	Q	A	L	G	S	D	L	K	A	K	V	K	G	V	V	L	F	G	F	T	R		
N	V	A	D	K	G	Q	I	P	G	Y	P	K	D	Q	T	K	V	Y	C	A	V	G	D	M	V	C	V	N	T	L	I	I	T	P	A	H	L	T	Y		
G	A	D	A	G	D	A	A	K	F	L	A	S	K	V	Q	E																									

Carbohidrato esterasa de la familia 5 [*Myceliophthora thermophila* ATCC 42464]

gi|367029345, masa molecular: 23,764.9 Da.

Sombreado: 1 péptido exclusivo único 9/231 aminoácidos, 4% de cobertura, total de espectros: 22.

Secuencia de aminoácidos:

M	K	F	L	S	L	L	T	A	A	G	V	A	A	A	L	P	T	S	P	A	E	V	S	S	A	G	E	I	E	A	R	Q	L	A	S	T	R	N	E	
L	E	N	G	D	S	A	N	C	P	K	A	I	F	I	F	A	R	A	S	T	E	P	G	N	M	G	I	S	A	G	P	N	V	A	S	V	L	E	A	
A	Y	G	D	N	I	W	V	Q	G	V	G	P	Y	R	A	G	L	A	D	N	A	L	P	A	G	T	T	R	A	A	I	D	E	A	K	R	L	F		
N	L	A	N	T	K	C	P	G	A	A	V	V	A	G	G	Y	S	Q	G	T	A	V	V	S	N	A	I	A	E	L	R	G	T	G	T	A	T	Q	E	
Q	I	R	G	V	V	L	F	G	Y	T	K	N	L	Q	N	G	G	R	V	P	D	Y	P	T	D	R	T	K	V	F	C	N	V	G	D	L	V	C	S	
G	T	L	I	V	A	P	A	H	F	L	Y	T	A	E	S	L	G	E	A	P	R	F	L	Q	S	K	I	D	A	T										

Cutinasa-2 [*Verticillium alfalfae* VaMs. 102]

gi|302412090, masa molecular: 23,386.5 Da.

Sombreado: 2 péptidos exclusivos únicos 8/224 aminoácidos, 4% de cobertura, total de espectros: 47.

Secuencia de aminoácidos:

M	K	Y	I	I	T	L	A	L	A	A	L	A	A	A	G	P	I	E	Q	R	Q	R	G	G	R	V	G	S	T	A	T	E	F	T	D	G	G	C	K		
P	I	I	M	L	F	A	R	G	S	T	E	T	G	N	M	G	T	V	C	G	P	P	T	A	N	G	V	K	A	N	F	G	A	D	Q	V	A	V	E		
G	I	E	Y	A	A	A	L	S	T	N	F	G	N	G	G	A	D	R	R	G	V	A	E	M	E	R	L	I	A	Q	A	N	T	D	C	P	D	S	M		
L	V	V	G	G	Y	S	Q	G	A	A	L	T	H	R	A	V	E	D	L	P	Q	A	Q	K	D	Q	I	V	A	A	F	T	F	G	D	T	Q	N	V		
Q	D	N	R	Q	I	P	N	F	P	P	E	K	T	N	I	I	C	N	A	G	D	A	V	C	A	G	T	L	T	I	L	P	A	H	L	A	Y	G	A		
R	A	D	E	Q	V	E	F	I	T	S	K	L	Q	A	A	G	A	K	L	R	K	R	D																		

Cutinasa 1 [*Aspergillus oryzae* RIB40]

gi|169765364, masa molecular: 22,263.6 Da.

Sombreado: 2 péptidos exclusivos únicos 8/213 aminoácidos, 4% cobertura, total de espectros: 5.

Secuencia de aminoácidos:

M	H	L	R	N	I	V	I	A	L	A	A	T	A	V	A	S	P	V	D	L	Q	D	R	Q	L	T	G	G	D	E	L	R	D	G	P	C	K	P	I		
T	F	I	F	A	R	A	S	T	E	P	G	L	L	G	I	S	T	G	P	A	V	C	N	R	L	K	L	A	R	S	G	D	V	A	C	Q	G	V	G		
P	R	Y	T	A	D	L	P	S	N	A	L	P	E	G	T	S	Q	A	A	I	A	E	A	Q	G	L	F	E	Q	A	V	S	K	C	P	D	T	Q	I		
V	A	G	G	Y	S	Q	G	T	A	V	M	N	G	A	I	K	R	L	S	A	D	V	Q	D	K	I	K	G	V	V	L	F	G	Y	T	R	N	A	Q		
E	R	G	Q	I	A	N	F	P	K	D	K	V	K	V	Y	C	A	V	G	D	L	V	C	L	G	T	L	I	V	A	P	P	H	F	S	Y	L	S	D		
T	G	D	A	S	D	F	L	L	S	Q	L	G																													



Biodegradative Activities of Selected Environmental Fungi on a Polyester Polyurethane Varnish and Polyether Polyurethane Foams

Joyce Álvarez-Barragán,^a Lilianha Domínguez-Malfavón,^a Martín Vargas-Suárez,^a Ricardo González-Hernández,^a Guillermo Aguilar-Osorio,^b Herminia Loza-Tavera^a

Departamento de Bioquímica^a and Departamento de Alimentos y Biotecnología,^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

ABSTRACT

Polyurethane (PU) is widely used in many aspects of modern life because of its versatility and resistance. However, PU waste disposal generates large problems, since it is slowly degraded, there are limited recycling processes, and its destruction may generate toxic compounds. In this work, we isolated fungal strains able to grow in mineral medium with a polyester PU (PS-PU; Impranil DLN) or a polyether PU (PE-PU; Poly Lack) varnish as the only carbon source. Of the eight best Impranil-degrading strains, the six best degraders belonged to the *Cladosporium cladosporioides* complex, including the species *C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. asperulatum*, and *C. montecillanum*, and the two others were identified as *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium chrysogenum*. The best Impranil degrader, *C. pseudocladosporioides* strain T1.PL.1, degraded up to 87% after 14 days of incubation. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis of Impranil degradation by this strain showed a loss of carbonyl groups ($1,729\text{ cm}^{-1}$) and N—H bonds ($1,540$ and $1,261\text{ cm}^{-1}$), and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis showed a decrease in ester compounds and increase in alcohols and hexane diisocyanate, indicating the hydrolysis of ester and urethane bonds. Extracellular esterase and low urease, but not protease activities were detected at 7 and 14 days of culture in Impranil. The best eight Impranil-degrading fungi were also able to degrade solid foams of the highly recalcitrant PE-PU type to different extents, with the highest levels generating up to 65% of dry-weight losses not previously reported. Scanning electron microscopy (SEM) analysis of fungus-treated foams showed melted and thinner cell wall structures than the non-fungus-treated ones, demonstrating fungal biodegradative action on PE-PU.

IMPORTANCE

Polyurethane waste disposal has become a serious problem. In this work, fungal strains able to efficiently degrade different types of polyurethanes are reported, and their biodegradative activity was studied by different experimental approaches. Varnish biodegradation analyses showed that fungi were able to break down the polymer in some of their precursors, offering the possibility that they may be recovered and used for new polyurethane synthesis. Also, the levels of degradation of solid polyether polyurethane foams reported in this work have never been observed previously. Isolation of efficient polyurethane-degrading microorganisms and delving into the mechanisms they used to degrade the polymer provide the basis for the development of biotechnological processes for polyurethane biodegradation and recycling.

Polyurethane (PU), one of the most versatile polymers invented by humans, is synthesized from a wide variety of precursors generating almost infinite types of materials, from elastomers and varnishes to highly resistant components, such as automotive parts, foams, semirigid plastics, and textile fibers. Due to their versatility, PUs are widely used in different human activities as a substitute for wood or metal and in other innovative products. However, the advantages provided by these polymers are correlated with the problem caused by its accumulation after the end of its useful life. In Europe alone, 59 million tonnes of plastics were produced in 2014, from which 4.4 million tonnes were PU; 25.8 million tonnes of postconsumer plastic waste ended up in the waste upstream, and from that, 30.8% went to landfill sites after its useful life (1). In Mexico in 2011, more than 4 million tonnes of plastic waste was sent to landfills (2). In addition, PUs are slowly degraded, and it has been estimated that it takes hundreds of years for PU molecules to return to the environment (3, 4). Also, no clean or effective systems for their disposal exist; incineration generates toxic fume emissions, and recycling has the inconvenience that after a few rounds, the material becomes useless, ending in dump sites (5).

PUs are synthesized from polyols and isocyanates, and depend-

ing on what type of polyols is used, PUs can be of the polyester (PS) type or polyether (PE) type. Biodegradation of PUs by bacteria and fungi has been studied since the 1980s, and although different enzymatic activities have been identified (4, 6–8), the underlying mechanisms of biodegradation are still unknown. Many of the PS-PU-degrading fungi have been collected from PS-PU coupons buried in soil under laboratory conditions or in compost systems (9–14), whereas others have been found growing

Received 4 May 2016 Accepted 10 June 2016

Accepted manuscript posted online 17 June 2016

Citation Álvarez-Barragán J, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, González-Hernández R, Aguilar-Osorio G, Loza-Tavera H. 2016. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Appl Environ Microbiol* 82:5225–5235. doi:10.1128/AEM.01344-16.

Editor: M. Kivisaar, University of Tartu

Address correspondence to Herminia Loza-Tavera, hlozat@unam.mx.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01344-16>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

in PU-contaminated sand (15) or have been isolated from plants (endophytic fungi) (16).

PE-PU foams are extensively used because of their resistance and low cost of production. The foam's protective and cushioning properties make it the ideal material for packaging applications, and its inherent comfort, support, and resilience make it the clear choice for construction, automotive appliances, and apparel, health care, medical, sports, and leisure products. This material, however, is more recalcitrant to fungal attack than PS-PU (17). Although several works have documented the degradation of solid PS-PU by fungi (9–14, 17), scarce research on solid PE-PU biodegradation has been carried out. Early work reported that PE-PU foams were unaffected by *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum* growth (18). Moreover, when incubated in compost piles (11, 19) or agricultural soils (19), where fungi play an important role in degradation, samples of PE-PU turned yellow and brownish but were not physically deteriorated. The only work reporting an effective microorganism, *Alternaria* sp. strain PURDK2, which is able to degrade ether-PU cubes as much as 27.5% after 10 weeks of exposure, was published in 2010. When incubated with substrates that contained urethane or urea bonds, this strain caused the release of some degradation products into the medium, probably by the action of urethane- and urea bond-degrading enzymes, which have been suggested as the activities that enabled the strain to degrade the ether-PU cubes (20).

Therefore, there is an urgent need to develop biotechnological processes for PU biodegradation, particularly for the highly recalcitrant PE-PU. For that, the first requirement is to isolate microorganisms with high capability to attack PU and to characterize their biological activity on the polymer. Here, we report eight novel fungal strains isolated from environmental samples, which are able to degrade Impranil (a PS-PU varnish) and Poly Lack (a PE-PU varnish) and to reduce the weight (up to 65%) of highly recalcitrant solid PE-PU foams. We also provide evidence by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), enzymatic activity analyses, and scanning electron microscopy (SEM) of the biological action displayed by the best PU-degrading fungi on the polymer. The identification of degradation products generated by fungal action, which may be recovered to be used as the substrates for new PU synthesis, would make the development of biotechnological processes for PU biodegradation and recycling more valuable.

MATERIALS AND METHODS

Culture media. For isolation and qualitative evaluation of PU degradation, fungi were grown in the mineral medium (MM) modified from that in reference 15: 19 mM NaH_2PO_4 , 33.5 mM K_2HPO_4 , 7.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 250 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 147 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 14 μM $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 12 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11 μM CuCl_2 , 12 μM MnCl_2 , 12 μM H_3BO_3 , and 1.8 mM HCl; this was supplemented with different PU substrates as the only source of carbon. The reagents used for medium preparation were American Chemical Society (ACS) grade from J.T. Baker Chemicals. Agar plates were made by adding 15 g/liter agar. Potato dextrose agar (PDA) and potato dextrose broth (PDB) media were used for growth and maintenance of filamentous fungi. Since fungal growth was similar between 25 and 30°C, these temperatures were used indiscriminately for incubation.

Isolation of fungi able to grow in PU. The different PU-related compounds used to isolate fungi able to degrade PU were as follows: Rymsapol 200/107 L-83 (Resinas y Materiales S.A. de C.V.) (diethylene-glycol poly-

dipate), a polyester polyol (PP) used as the substrate for PU synthesis; Impranil DLN (Bayer) (I), a PS-PU; Hydroform (PolyForm de México, S.A. de C.V.) (H), a PS-PU; and Poly Lack (Sayer Lack Mexicana, S.A. de C.V.) (PL), a PE-PU. Impranil, Hydroform, and Poly Lack are commercial PU varnishes formulated as colloidal water-based PU suspensions, whose exact compositions are unknown. Plates with solid MM and one of the PU-related compounds at 0.3% solids as carbon sources were inoculated with environmental samples collected from different sources: garden soil (T), decomposing PU foams collected at a municipal dump site (Bordo Poniente, Ciudad Nezahualcóyotl, Estado de México, México) (BP), natural airflow from laboratory indoors (A1) and outdoors (A2), and fungal colonies growing on the PU insulation of a cold room wall (A3). For the Bordo Poniente dump site samples, chloramphenicol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich) was added to solid medium to prevent bacterial growth. After cultivation on these media for 7 days at 25 to 30°C, all the morphologically different fungi were streaked on PDA medium for several rounds until their isolation. Conidia from each isolate were preserved by desiccation in silica gel. Fungal strains were named after their sampling source (T, BP, A1, A2, or A3) and substrate used for their isolation (PP, I, H, or PL).

Identification of fungi. Microcultures of the best PU-degrading fungi were made by inoculating PDA medium cubes (0.5 by 0.5 by 0.5 cm) with conidia on the four sides. Cubes were placed on slides and cover glasses and incubated in petri dishes containing a glass triangle as support and filter paper soaked with sterile water. Microcultures were incubated for 7 days at 25°C. Water was exchanged for formaldehyde to fix the reproductive structures to the slides and incubated for 1 h. PDA medium cubes were removed from the slides and stained with lactophenol cotton blue to observe the reproductive structures under the microscope. The genera of the fungi were determined based on the morphology and pigmentation of conidia and conidiophores, according to the Saccardo system of classification (21). For species identification, molecular techniques were used. All the reagents used in DNA techniques were molecular biology grade from Sigma-Aldrich. Fungi were grown in PDB for 1 week at 30°C. DNA was extracted according to the method in reference 22, with the following modifications: 0.2 g of filtered mycelium was pulverized with liquid nitrogen, resuspended in 600 μl of extraction buffer (2% cetyltrimethylammonium bromide [CTAB], 1.4 M NaCl, 200 mM EDTA, and 100 mM Tris-HCl [pH 8]), and incubated at 65°C for 30 min. The mixture was cooled at 25 to 30°C, and 250 μl of 5 M potassium acetate was added to complete cell lysis. Cell debris was removed by centrifugation (15,000 \times g) for 5 min in an Eppendorf centrifuge (model 5427C), and the supernatant was extracted twice with phenol-chloroform. DNA was precipitated overnight with absolute ethanol and resuspended in 100 μl of sterile deionized water. Genomic DNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis, and DNA purity was determined by A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratios. An aliquot (250 ng) of genomic DNA was used as a template for PCR amplification of part of the rRNA gene cluster (approximately 1,200 bp) spanning the internal transcribed spacer 1 (ITS1), the 5.8S rRNA gene, the internal transcribed spacer 2 (ITS2), and the 28S rRNA gene region D1-D2 (23), using the ITS1 forward primer (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (24) and the D2 reverse primer (5'-TTGGTCCGTGTTTCAA GACG-3') (25). For a precise identification of the strains belonging to the *Cladosporium cladosporioides* complex, partial sequences of actin (ACT) (approximately 230 bp) and translation elongation factor (TEF) 1 α (approximately 240 bp) genes were amplified (26) using the primers ACT-512F/ACT-783R and EF1-728F/EF1-986R, respectively (27). PCR was performed with Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions for genomic DNA amplification (10 μM each primer, 10 mM each deoxynucleoside triphosphate [dNTP], 1 \times Phusion buffer, and 1 U of Phusion DNA polymerase). The PCR program was one initial denaturation cycle at 98°C for 3 min; 30 cycles of denaturation at 98°C for 10 s, annealing at 64.4°C for 30 s for reactions with ITS-D2 primers, at 63°C for 15 s for reactions with ACT primers, or at 58°C for 15 s for reactions with TEF primers, and

extension at 72°C for 36 s; and a final extension cycle at 72°C for 7 min. PCR products were gel purified by using the GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific). Sequencing was performed at Macrogen, Inc. (Seoul, South Korea) with the same primers used for the PCR amplifications. Identification was made by comparison of the obtained sequences to the GenBank database using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (28).

Impranil degradation assay. Strains were inoculated on plates containing MM with Impranil and incubated at 25 to 30°C for 5 days. Fungal utilization of Impranil as a carbon source and hydrolysis, by clearing halo formation on Impranil plates, were qualitatively evaluated based on reference 14. For quantitative Impranil degradation assays, tubes containing 10 ml of MM with Impranil were inoculated with mycelium (80 mg [fresh weight] obtained from static cultures grown in PDB for 1 week at 30°C in darkness) from each selected fungus. The mycelial samples were washed prior to inoculation to remove any residual medium. After incubation without agitation for 14 days at 30°C in darkness, cultures were filtered through Whatman grade 41 paper and the filtrate measured turbidimetrically at $\lambda_{600\text{ nm}}$, using distilled water as a blank. Noninoculated tubes with 10 ml of MM with Impranil were set as controls. The concentration of residual Impranil was calculated according to values obtained from a standard curve done with different Impranil concentrations. The standard curve was linear ($r^2 = 1$) up to 1 mg/ml at $\lambda_{600\text{ nm}}$. Three biological replicates were quantified for each fungal strain.

FTIR spectroscopy analysis of Impranil degradation. The eight fungi with the highest capability to degrade Impranil were inoculated with 80 mg (fresh weight) of mycelium obtained from static cultures grown in PDB for 1 week at 30°C, in tubes containing 10 ml of MM with Impranil, and incubated without agitation for 14 days at 30°C in darkness. The cultures were thoroughly mixed, mycelium was eliminated by filtration through Whatman grade 41 filter paper, and 1 ml of each filtrate was analyzed by FTIR spectroscopy in a 1605 PerkinElmer spectrometer at 2,500 to 800 cm^{-1} . Three biological replicates were analyzed for each selected fungal strain. Spectral interpretation was performed according to references 29 and 30.

Identification of Impranil degradation products. Fungal mycelia (80 mg [fresh weight] of mycelium obtained from static cultures grown in PDB for 1 week at 30°C in darkness) were cultured in 125-ml flasks with 40 ml of MM with Impranil, without agitation at 25°C in darkness; noninoculated MM with Impranil flasks were used as controls. Analysis of inoculated and control media was carried out at 0, 7, and 14 days of incubation. For each analysis time, cultures were thoroughly mixed, and mycelium was eliminated from the media by filtering through Whatman grade 41 filter paper. The filtrates were centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min in a Sorvall RC-5C Plus with rotor type SS-34. Supernatants were then filtered through 0.45- μm -pore-size Millipore membranes to eliminate conidia and residual Impranil. The filtrates were extracted three times with 10 ml of dichloromethane. The three extracts were pooled and the solvent evaporated to dryness at 25 to 30°C. The dried samples were resuspended in 50 μl of methanol-chloroform (1:1 [vol/vol]), and 1 μl was injected (injector temperature, 300°C) with a split ratio of 1:50 in an Agilent 6890N gas chromatograph with a DB-5MS column (5% phenylmethyl silicone; length, 20 m; internal diameter, 0.18 mm). The oven program was initial temperature of 40°C (held for 3 min), which increased by 20°C/min up to 300°C (held for 15 min). All the solvents used were ACS grade from J.T. Baker Chemicals. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. Time of flight mass spectrometry (TOF-MS) analysis was performed in a Leco Pegasus 4D model apparatus. The electronic ionization energy was 70 eV, and the mass range scanned was 45 to 550 atomic mass units (amu). The delay time was 300 s. The scan rate was 20/s. Mass spectra of the compounds detected in the analyzed extracts were compared to the National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectrometry Data Center 2002 library. Compounds with mass spectrum similarity values of >850 were considered the same com-

pound as the library hit; below this similarity value, they were considered related compounds.

Enzymatic assays. For enzymatic analyses, 80 mg (fresh weight) of mycelium obtained from static cultures grown in PDB for 1 week at 30°C in darkness was cultured in 125-ml flasks with 40 ml of MM with Impranil, without agitation at 25°C in darkness. Cultures were harvested after 0, 7, and 14 days of incubation (3 replicates for each time) and filtered through four layers of cheesecloth. The filtrates were centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min in a Beckman J2-21 centrifuge with a JA-20 rotor. Cell-free supernatants, the source for extracellular enzymatic activity, were filtered through 0.45- μm -pore-size Millipore membranes and then concentrated to 3 ml in Amicon Ultra 10K devices. Next, three dialysis rounds were sequentially carried out against 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) for 2 h (in 1 liter of buffer), overnight (in 2 liter of buffer), and two more hours (in 1 liter of buffer). After that, samples were concentrated to 400 μl in an Amicon Ultra 10K, and protein levels were determined according to Bradford's method by using bovine serum albumin (BSA) as a standard. For 0 and 7 days of incubation, 1 μg of protein was used, whereas for 14 days of incubation, 4 μg of protein was used for the enzymatic assays. Esterase activity was determined spectrophotometrically by hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA) (catalog no. L00314; Alfa Aesar) at $\lambda_{405\text{ nm}}$, as previously reported (6). The reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate (pH 7.0), 100 μl of enzyme extract, and 5 mM *p*-NPA in a final volume of 1 ml. Lipase from *Pseudomonas fluorescens* (catalog no. 28602; Sigma-Aldrich) was used as a positive control. Protease activity was determined spectrophotometrically by casein hydrolysis at $\lambda_{280\text{ nm}}$, as previously reported (6), except that the reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate (pH 7.0), 50 μl of enzyme extract and 0.5% casein in a final volume of 1 ml, and it was incubated at 37°C overnight. Proteinase K (catalog no. EO0491; Thermo Scientific) was used as a positive control. Urease activity was determined spectrophotometrically by using a phenol hypochlorite assay, which measured ammonia release at $\lambda_{636\text{ nm}}$ (31). The reaction mixture contained 15 mM potassium phosphate (pH 7.0), 100 μl of enzyme extract, and 3.8 mM urea in a final volume of 1.3 ml. Jack bean urease (catalog no. U-1500; Sigma-Aldrich) was used as a positive control.

Degradation of PE-PU foams. Two types of PE-PU foams (A and B), used for commercial production of mattress cushioning (kindly provided by Espumas Industriales Monterrey, S.A. de C.V.), were tested for fungal degradation. Both foams were synthesized from Caradol SC56-22 (Schell Chemicals) (propylene oxide/ethylene oxide-based polyether polyol) and Caradol MD30-45 (Schell Chemicals) (propylene oxide/ethylene oxide-based polyether polyol grafted with a styrene-acrylonitrile copolymer for higher strength) used at different proportions and polymerized with Mondur TD 80 grade A (toluene diisocyanate) (Bayer). Foam A contained a halogenated flame retardant, CP2 LV [Tris-(1,3-dichloroisopropyl) phosphate (TDCPP)]. Preweighed pieces of foam (8 by 30 by 15 mm) were washed, dried, autoclaved, inoculated with 80 mg (fresh weight) of 1-week-old mycelium grown in PDB in static cultures at 30°C in darkness, and incubated for 21 days at 25 to 30°C in petri dishes containing 20 ml of 50% PDB. The PDB was refreshed every 5 days. Mycelium growing around the foam pieces was carefully eliminated with sterile bistoury and forceps at every medium change. After the completion of incubation time, weight was recorded to determine biodegradation level. For that, foam pieces were treated with 0.88% (wt/vol) sodium hypochlorite for 18 h to destroy the remaining mycelium, washed out four times with 30 ml of distilled water, and vacuum dried at 25 to 30°C until constant weight. Noninoculated control foam pieces were similarly treated.

Scanning electron microscopy analysis. Replicate samples of PU foam pieces used for quantifying biodegradation were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The mycelium-containing foams were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.3) overnight. Samples were washed three times with 0.05 M phosphate buffer and then dehydrated in ethanol at 30%, 50%, 70%, 90%, and 100% for 5 min each. After this treatment, foams were incubated in a vacuum oven at 25 to

30°C for 72 h. For the mycelium-free foams, superficial mycelium was carefully removed with a razor blade, and internal mycelium was eliminated by submerging the foam in 50 ml of 0.88% (wt/vol) sodium hypochlorite for 18 h. The foams were then washed six times with 20 ml of distilled water by shaking at 125 rpm for 2 min each time. Vacuum filtration over a Buchner funnel (each side of the foam for 1 min) and incubation in a vacuum oven (72 h at 25 to 30°C) were used to remove the remaining water until complete dryness. Foams with and without mycelium were coated with gold and analyzed under a high vacuum without microanalysis in a Jeol JSM-5900-LV electron microscope. In each sample, 5 fields were analyzed as representative data.

Statistical analyses. Impranil and PE-PU foam biodegradation were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA). Mean comparison was performed with Tukey's test for balanced experiments ($P < 0.05$).

Accession number(s). Sequences were deposited in GenBank (accession numbers for partial sequences of rRNA genes, KU605792, KU605788, KU605794, KU605789, KU605793, KU605790, KU605787, and KU605791; for partial sequences of the actin gene, KU605800, KU605796, KU605799, KU605797, KU605795, and KU605798; and for partial sequences of the translation elongation factor 1 α gene, KU605786, KU605782, KU605785, KU605783, KU605781, and KU605784). Table S1 in the supplemental material shows the percentage of the highest matches obtained and has the GenBank accession numbers for reference strains and the strains reported in this work.

RESULTS

Isolation of fungi. A variety of fungi isolated from samples of diverse environments grew on mineral media containing different PU-related compounds used as carbon sources. A total of 73 morphologically different colonies were isolated, with 42 filamentous fungi and 31 yeast-like strains. PU degradation qualitative assays were performed by inoculating all the strains on agar plates with the different PU substrates. None of the yeast-like and five of the filamentous fungi were able to grow in any of the tested media; therefore, no further analysis was made with these strains. From the remaining 37 tested strains, 31 filamentous fungi were able to grow and produce clearing halos on MM with Impranil and MM with Rymsapol, indicating the capability to hydrolyze a polyester PU and a polyester polyol, respectively. From these 31 halo-forming strains, 22 were also able to grow on MM with Poly Lack, a PE-PU varnish. Since Poly Lack does not clarify when degraded, it fails as an indicator for quantitative assays, although it provides a means to select possible PE-PU-degrading microorganisms. Therefore, because Impranil clarifies when microorganisms hydrolyze it, it is a visual and reliable method for quantitative analysis (7, 16, 32, 33), and so we chose this substrate for further quantitative degradation experiments.

Biodegradation of Impranil and identification of fungi. All the 31 fungi that grew and formed degradation halos on Impranil solid media were evaluated for quantitative turbidimetric analysis of Impranil degradation. The growth of representative strains in liquid MM with Impranil after 14 days of culture is depicted in Fig. 1a. All the fungal strains were able to degrade Impranil to different extents, with values that ranged from 6% to 99% (data not shown). An interesting correlation was that all nine fungi unable to grow on Poly Lack exhibited the lowest Impranil degradation values. Based on these results, a second quantitative Impranil degradation experiment with three replicates was performed, in which the 15 fungal isolates that exhibited the highest Impranil degradation levels were analyzed. This analysis showed degradation values from 40% to 87% (Fig. 1b). Isolates T1.PL.1, A2.PP.5, BP8.I.3, and A3.I.1 showed degradation levels above 80%, whereas

isolates BP3.I.2, A2.H.4, BP3.I.7, and A2.PL.1 displayed degradation levels between 74% and 78%. ANOVA showed statistically significant differences on Impranil degradation between strains. Tukey's test demonstrated that only the two most Impranil-degrading strains, T1.PL.1 and A2.PP.5 (>80% degradation) (group a), showed statistically significant differences compared to the four least Impranil-degrading strains, A2.H.5, T1.H.7, BP6.I.5, and T1.H.2 (39 to 55% degradation) (group a'). When the nine most Impranil-degrading strains (>70% degradation) were considered as a group (group b), they showed statistically significant differences only compared to the two least-degrading strains (39 to 41% degradation) (group b').

The eight best-degrading strains were identified by classical taxonomy and by molecular biology methods. Reproductive structure morphology and sequencing of amplicons obtained by PCR from part of the rRNA genes (ITS1-D2 region) allowed the precise identification of BP3.I.7 and A2.PL.1 as *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus fumigatus*, respectively. In the same way, it was determined that the six best PU-degrading strains belonged to the *Cladosporium cladosporioides* complex, with identities between 99 and 100% (24). Further BLAST analysis of the actin and translation elongation factor 1 α partial sequences from these six strains showed the highest matches with the following species: T1.PL.1 with *Cladosporium pseudocladosporioides*, A2.PP.5 and A3.I.1 with *Cladosporium tenuissimum*, BP8.I.3 and BP3.I.2 with *Cladosporium asperulatum*, and A2.H.4 with *Cladosporium montecillanum* (34).

Effect of fungal growth on Impranil degradation. To determine the effect that fungal growth generated on Impranil, the eight selected strains were grown on MM with Impranil, and FTIR analyses were performed in cell-free filtrates obtained from 14-day-old fungal cultures. All tested fungi generated similar changes on Impranil FTIR spectra. A representative FTIR spectrum of Impranil degradation by *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 revealed a decrease in the 1,729 cm^{-1} signal associated with the stretching of the carbonyl group (C=O) related to both the polyester fraction and the urethane bond. Decrements in the signals of bending (1,540 cm^{-1}) and stretching (1,261 cm^{-1}) of the C—N—H bond in the urethane group were also observed in the fungus-treated PU (Fig. 2).

To explore the way in which fungi degrade Impranil, time course analyses of the compounds present in the media at 0, 7, and 14 days of incubation with the most Impranil-degrading strain, *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL.1, were carried out by GC-MS. In controls, only small changes in some compounds were observed during the 14-day incubation period. However, important changes in the relative area of compounds related to PU degradation were observed in fungus-treated extracts (Table 1; see also Fig. S1 in the supplemental material). Five compounds, tentatively identified as cyclohexyl cyclohexanecarboxylate-related compound, adipic acid dicyclohexyl ester-related compound, tridecan-6-ol-related compound, tetradecan-3-yl prop-2-enoate-related compound, and cyclohexane (1-methylethyl)-related compound, disappeared in the fungus-inoculated media, most of them during the first week of incubation, whereas in the control, they remained with few changes during the 2 weeks of the experiment (Table 1 and Fig. S1, peaks 4, 6, 7, 8, and 9). Four compounds, tentatively identified as 2,2-dimethyl-1,3-propanediol, hexane-1,6-diol, hexane 1,6-diisocyanate, and adipic acid di(oct-4-yl ester)-related compound, which were present at almost con-

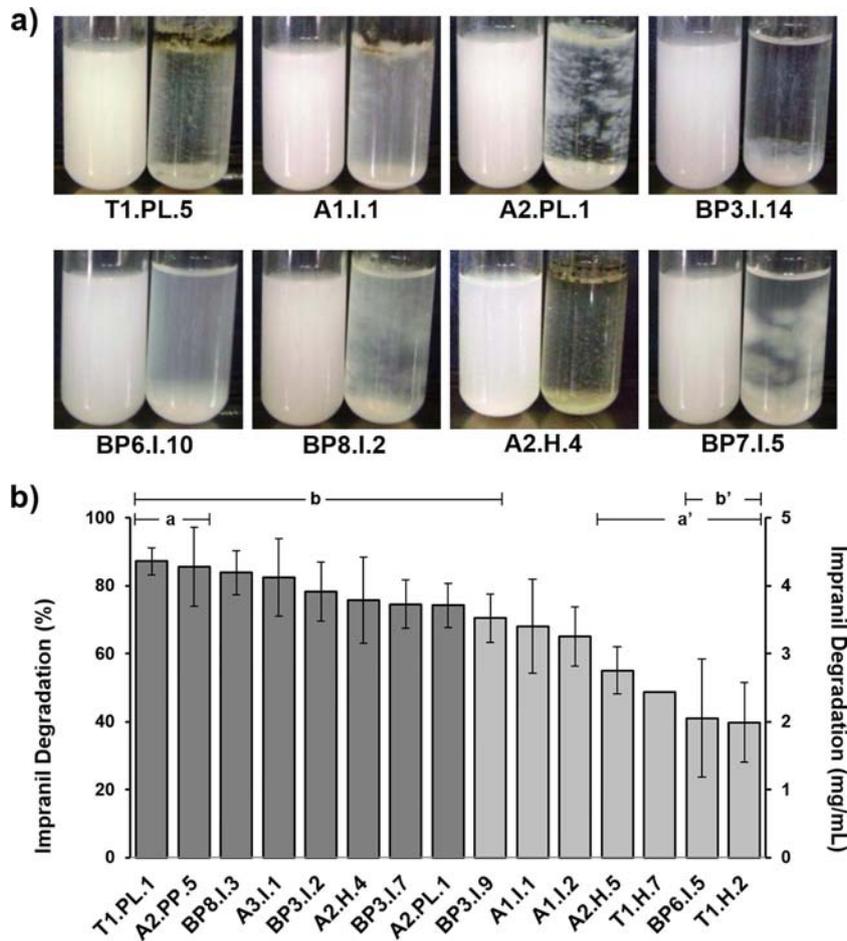


FIG 1 Growth and Impranil degradation by some of the selected fungal strains. (a) Growth of fungal strains showing different types of development in MM with Impranil. Left tube, control; right tube, fungus-inoculated medium. (b) Quantitative analysis of Impranil degradation by the 15 fungal isolates showing the highest degradation levels. All data were normalized to the negative control. The eight darker-shaded columns represent the strains that were selected for further analysis. $n = 3$. The error bars represent standard deviations. Statistically significant differences are indicated by a versus a' and b versus b'.

stant or slightly decreasing levels in the control, increased in the cultures inoculated with the fungus (Table 1 and Fig. S1, peaks 1, 2, 3, and 5). The mass spectra of the compounds identified in these analyses are presented in Fig. S2 in the supplemental material.

Based on these results, and on the fact that the selection of Impranil-degrading fungi was based on their capability to form degradation halos on Impranil solid media, we hypothesized that biodegradation of the compounds present in Impranil occurred by fungal extracellular enzymatic activities. To address this possibility, culture supernatants of the most Impranil-degrading strain, *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 grown in MM with Impranil, were analyzed for enzymes whose activities have been correlated with polyurethane biodegradation: esterase, protease, and urease. Esterase activity at the initial time was almost negligible ($0.057 \pm 0.002 \mu\text{mol } p\text{-NPA}/\text{min}/\text{mg}$ of protein), and it increased to $84.91 \pm 19.97 \mu\text{mol } p\text{-NPA}/\text{min}/\text{mg}$ of protein (1,500-fold) after 7 days of incubation and decreased 4-fold at day 14 ($20.73 \pm 1.41 \mu\text{mol } p\text{-NPA}/\text{min}/\text{mg}$ of protein). Protease activity was not detected at any time when analyzing aliquots of the same protein concentration as the ones used for esterase measurements. The protease-positive controls showed proper activity in the assays. Very low urease activity, at less than $3.13 \pm 0.13 \mu\text{m}$ of $\text{NH}_3/$

μg of protein, was determined at different times during the analysis.

PE-PU foam degradation. In order to explore whether the eight best Impranil-degrading strains could also be effective to degrade solid PE-PU foams, they were challenged to decompose two types of solid foams, which were similar in composition but different in density and in that foam A contained a flame retardant. Changes in the form and structure of the foam pieces were recorded, and weight losses were measured after incubation with the selected fungi. Analysis showed that the least PU-degrading strains grew only on the surface, but the best ones clearly developed their mycelia inside the foam, invading the whole piece (Fig. 3). Evidence of the capability of the best PU-degrading fungi to grow inside solid foam is shown in SEM micrographs, in which large numbers of hyphae invading the surface and the interior of foam cells can be seen (Fig. 4). After 21 days of incubation, foams inoculated with fungi changed their shape, size, and weight compared to the similarly treated but noninoculated pieces (Fig. 5a). The foam with flame retardant (foam A) was less degraded than the foam with no flame retardant (foam B), with weight losses from 6 to 25.9% and 10 to 65%, respectively (Fig. 5b). ANOVA and Tukey's test made it evident that *Cladosporium* strains dis-

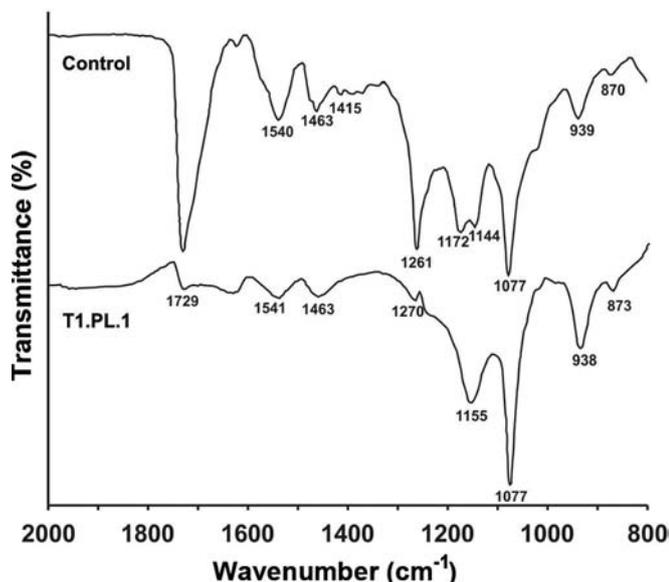


FIG 2 Representative FTIR spectroscopy analysis of Impranil degradation by fungi. Spectra of MM with Impranil noninoculated and inoculated with *Cladosporium pseudocladosporioides* strain T1.PL.1 after 14 days of incubation. All the eight best Impranil-degrading fungi presented similar results. Changes reflecting Impranil degradation are observed in the signals at 1,729 cm^{-1} (non-hydrogen-bonded urethane C=O stretch and ester from polyol fraction), 1,540 cm^{-1} , and 1,261 cm^{-1} (urethane C—N—H bending and stretch, respectively). Signal assignments are based on references 29 and 30.

played the largest foam degradation capability. *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5 was significantly the most degrading strain for both foam A (25.9%) and foam B (65.3%). *C. tenuissimum* A3.I.1, *C. asperulatum* BP3.I.2, and *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 followed in their ability to degrade foam B, at 49.3%, 47.1%, and 44.9%, respectively. Statistical analysis of foam B degradation indicates that *C. tenuissimum* A2.PP.5 showed significant differences with the three least-degrading strains (a'); *C. tenuissimum* A3.I.1 showed statistically significant differences compared to the two less-foam-degrading strains (b'), whereas *C. asperula-*

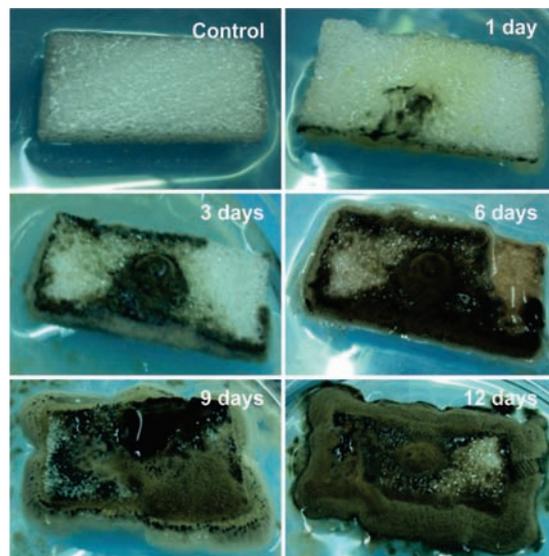


FIG 3 Fungal growth of *Cladosporium asperulatum* BP8.I.3 over and inside PE-PU foam. Representative progression of fungal growth is shown by one of the best Impranil-degrading strains, from initial colonization (1 day) on the surface of foams to extensive invasion (12 days) on the whole piece of foam. The growth on foam B (without flame retardant) is shown.

tum BP3.I.2 and *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 showed statistically significant differences only compared to the least PU-degrading strain, *A. fumigatus* A2.PL.1 (c') (Fig. 5b).

To further analyze PE-PU foam degradation, we also evaluated PU damage at a microscopic level. PU pieces of foam B incubated with the three best foam-degrading fungi (*C. tenuissimum* strains A2.PP.5 and A3.I.1 and *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1) were treated to remove fungal mycelium, and SEM micrographs were taken. At panoramic views (50 \times magnification), the disruption and loss of integrity of the foam reticulated-cell structure were observed in samples incubated with the fungi (Fig. 6). At a closer view (250 \times magnification), thinning, bending, and relaxation of the fibers were observed in the fungus-incubated foams, in con-

TABLE 1 Time course GC-MS analysis of Impranil degradation by the best Impranil-degrading fungal strain, *Cladosporium pseudocladosporioides* T1.PL1

Peak	Avg RT (s) ^a	Compound	% of relative area by treatment and day ^b					
			Control			Fungus treatment		
			T0	T7	T14	T0	T7	T14
1	390.53	2,2-Dimethyl-1,3-propanediol	9.8	9.4	13.0	11.7	25.9	30.5
2	503.39	Hexane-1,6-diol	19.6	18.5	18.1	24.7	40.0	39.9
3	580.10	Hexane 1,6-diisocyanate	3.2	1.7	1.0	5.6	7.1	9.8
4	731.53	Cyclohexyl cyclohexanecarboxylate related	14.9	14.4	13.5	13.6	3.6	ND
5	756.18	Adipic acid di(oct-4-yl ester) related	ND	3.3	1.7	3.1	10.6	5.3
6	946.74	Adipic acid dicyclohexyl ester related	11.3	9.5	13.5	8.9	ND	ND
7	1,110.59	Tridecan-6-ol related	2.2	2.4	2.4	2.1	ND	ND
8	1,184.68	Tetradecan-3-yl prop-2-enoate related	5.2	4.1	4.5	5.3	ND	ND
9	1,260.50	Cyclohexane (1-methylethyl) related	4.6	5.3	8.0	3.3	ND	ND

^a RT, retention time.

^b Samples from MM with Impranil culture media inoculated with *C. pseudocladosporioides* strain T1.PL.1 were harvested at 0 (T0), 7 (T7), and 14 (T14) days of incubation.

Noninoculated samples of MM with Impranil incubated for the same times were analyzed as controls. Compounds were tentatively identified by comparison to the NIST Mass Spectrometry Data Center (2002 library). Shaded cells indicate values that increased >50% from time 0 to 14 days of incubation. Underlined values decreased to undetectable levels during the analysis. ND, nondetected.

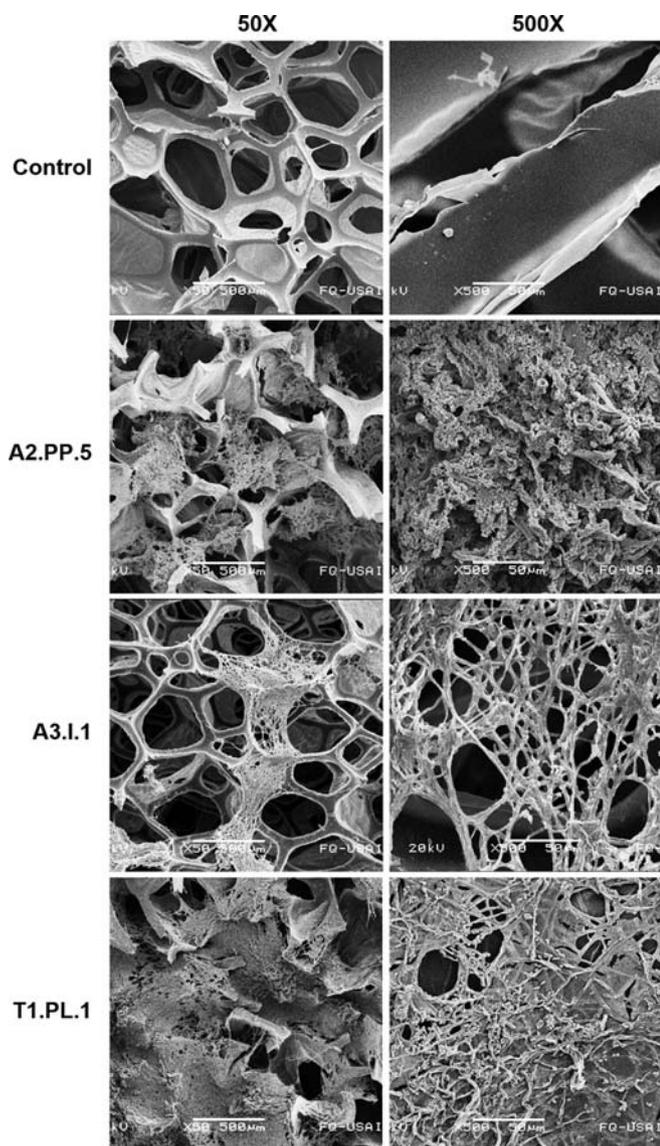


FIG 4 Scanning electron micrographs of fungal growth inside PE-PU foam. Hyphal networks are observed in samples of foam pieces incubated for 7 days with three of the best Impranil-degrading fungi: *Cladosporium tenuissimum* strains A2.PP.5 and A3.I.1 and *C. pseudocladosporioides* strain T1.PL.1.

trast to the non-fungus-treated control, in which PU cell structures remained straight and rigid. A finer detail of the fungal attack on PE-PU foam cells was observed at 500 \times magnification, in which pores, erosion, breaks, and bends of the reticulated-cell walls were detected in fungus-treated foams, whereas in the control, foam fibers remained smooth and rigid. Damage was more evident in PE-PU foams incubated with *C. tenuissimum* strain A3.I.1, in which fiber thickness diminished up to less than a half of the size of the noninoculated control (Fig. 6).

DISCUSSION

The first aim of this research was to selectively isolate fungal strains able to degrade PS-PU and PE-PU, using as strategy the selection of fungi able to grow in both types of PU varnishes: Impranil DLN, a PS-PU, and Poly Lack, a PE-PU. The best fila-

mentous fungus reached Impranil degradation levels (87%) slightly higher than those reported for some endophytic fungal strains (85%) after the same incubation time (16). However, although a diversity of fungal species isolated from different sources have been recognized to degrade PS-PU (9, 10, 12–18, 20, 35), very few have been reported to have the capability to degrade PE-PU (15, 17–20).

The six best PU-degrading strains we isolated were identified as members of the *Cladosporium cladosporioides* complex (26, 34). The four different identified species were collected from diverse environments: garden soil, outdoor air, a PU-insulated wall in a cold room, and a dump site. The fact that six out of the eight best PU-degrading fungal strains were isolated from different environmental sources and belong to the same genus strongly suggests that PU degradation capability might be based on the physiology, biochemistry, and genetics of the genus. Although *Cladosporium herbarum* (18) and *Cladosporium* sp. have been reported as PU degraders (35), the species described in this work and the level of PE-PU degradation they reached have not been previously reported. Even though more than 770 species have been classified as members of the genus *Cladosporium* (26), only the genome of *Cladosporium sphaerospermum* UM 843, an allergenic fungus isolated from a blood culture, has been sequenced (GenBank accession no. AIIA0000000.2, GI 666699852) (36). Genome sequencing of *Cladosporium* polyurethanolytic species would be of great relevance to assist in determining the mechanisms responsible for this capability and for biotechnological purposes.

Analysis of the chemical changes generated by PU-degrading fungi has been addressed only in very few papers (16, 18, 20). This type of analysis provides clues to envisage the mechanism fungi display to attack the polymer during biodegradation. The dramatic decrements in the carbonyl signal (1,729 cm^{-1}) observed in the FTIR spectra are related to the attack of ester bonds present in the polyol fraction, as well as to the attack of urethane groups. Actually, the decrements observed in the C—N—H bond signals (1,540 and 1,261 cm^{-1}) confirm that the urethane groups are affected (Fig. 2). In experiments performed under similar conditions, Impranil degradation by the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* was observed as a decrease in the carbonyl signal (C=O) and, although not mentioned by the authors, the spectrum also showed decreases in the signals at 1,540 and 1,260 cm^{-1} , which, as in our work, implies enzymatic attack on the urethane group (15). Attack on these functional groups, ester and urethane, has been suggested to be performed by bacterial hydrolytic enzymes, such as esterase, protease, and urease (4, 8). In our work, evidence of the activity of fungal enzymes on Impranil biodegradation was also detected by GC-MS analysis after the incubation of Impranil with the best PU-degrading fungus *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1, an approach not explored in any other previous work, to our knowledge. Even though no quantitative conclusions can be drawn from this type of analysis, the decrements in compounds with ester bonds (Table 1, peaks 4, 6, and 8) in the fungus-treated Impranil seem to correlate with increments in compounds with alcohol groups (Table 1, peaks 1 and 2), as expected in reactions where esterases hydrolyze ester bonds. Besides, in the fungus-treated media, the increments in adipic acid di(oct-4-yl ester)-related compound (Table 1, peak 5), which can only be the result of hydrolytic reactions over aliphatic chains containing ester bonds in the polyol segment, and in hexane 1,6-diisocyanate

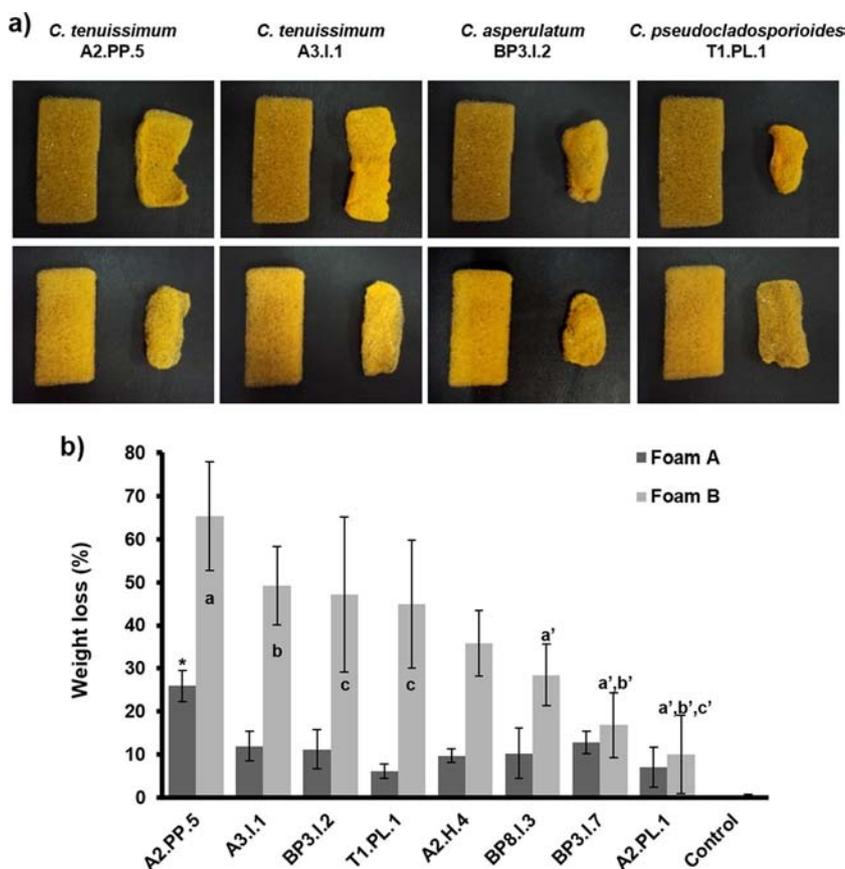


FIG 5 Biodegradation of PE-PU foams by the best Impranil-degrading fungi. (a) Effects on size and form of PU foams after fungal treatment. Foam A (upper row) and foam B (lower row) were incubated with the four best Impranil-degrading fungi for 21 days. Each pair of foam pieces presents the control foam (left) compared to the fungus-treated piece (right). (b) Quantitative analysis of PE-PU foam degradation (represented as weight loss) by the best Impranil-degrading-fungi. Each value was normalized by subtracting the weight loss of noninoculated controls. $n = 3$. The bars represent standard deviations. For foam A degradation, an asterisk denotes a statistically significant difference. For foam B degradation, statistically significant differences are indicated by a versus a', b versus b', and c versus c'.

(Table 1, peak 3) suggest that the recovery of PU precursors to be reutilized for the synthesis of new PU molecules might be feasible. It is known that the recovery of polyols from PU by chemically treating PU by glycolysis is possible (37); in addition, the recovery of polyester polyols from polyethylene terephthalate and the excess diisocyanate generated during PU synthesis to be used for the synthesis of new PUs have also been reported (38, 39). Nevertheless, in these processes, the use of chemicals and high thermal energy is required, generating significant expenses and pollution. Therefore, the use of fungal strains to degrade PU waste might be an ecological, economical, and sustainable system for recovering PU precursors for recycling. On the other hand, the aliphatic nature of tridecan-6-ol-related compound (Table 1, peak 7) and cyclohexane (1-methylethyl)-related compound (Table 1, peak 9), present in the untreated media but absent in the fungus-treated media, suggests that oxidative reactions must be involved in their degradation. Cyclohexane transformation to cyclohexanol, and subsequently to cyclohexanone by fungal peroxxygenases, has been reported elsewhere (40); therefore, it may be feasible that *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 has similar enzymatic activities.

When searching *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 cultures for extracellular enzymatic activities proposed to participate in

Impranil biodegradation, high esterase and low urease but not protease activities were detected. The high increment in esterase activity observed at 7 days of culture, and the fact that it still remains active after 14 days, suggest that it might be responsible for the attack on ester and urethane groups in the PU, as observed by FTIR and GC-MS analysis. Several fungi displaying esterase activity suggested to be responsible for PS-PU biodegradation were previously reported (12, 35). Although urease activity has been suggested to participate in Impranil biodegradation (15, 20), it seems not to have a relevant role in Impranil biodegradation.

The eight best Impranil-degrading fungi were also able to grow on the PE-PU varnish Poly Lack as the sole carbon source and to degrade solid PE-PU foams. *C. tenuissimum* A2.PP.5 was the most degrading strain of solid PE-PU foams, showing levels of degradation of 65.3% not previously reported for solid PE-PU foams. Foam A was much less degraded than foam B (Fig. 5), probably due to the presence of the flame retardant TDCPP in foam A. TDCPP has been implicated as a cause of toxicity in vertebrates, and it has been reported to affect the growth and reproduction of *Tetrahymena thermophila* by downregulating genes expressing ribosomal proteins, accompanied by decreased ribosome quantity and enlarged size, in rough endoplasmic reticulum and cytoplasm (41).

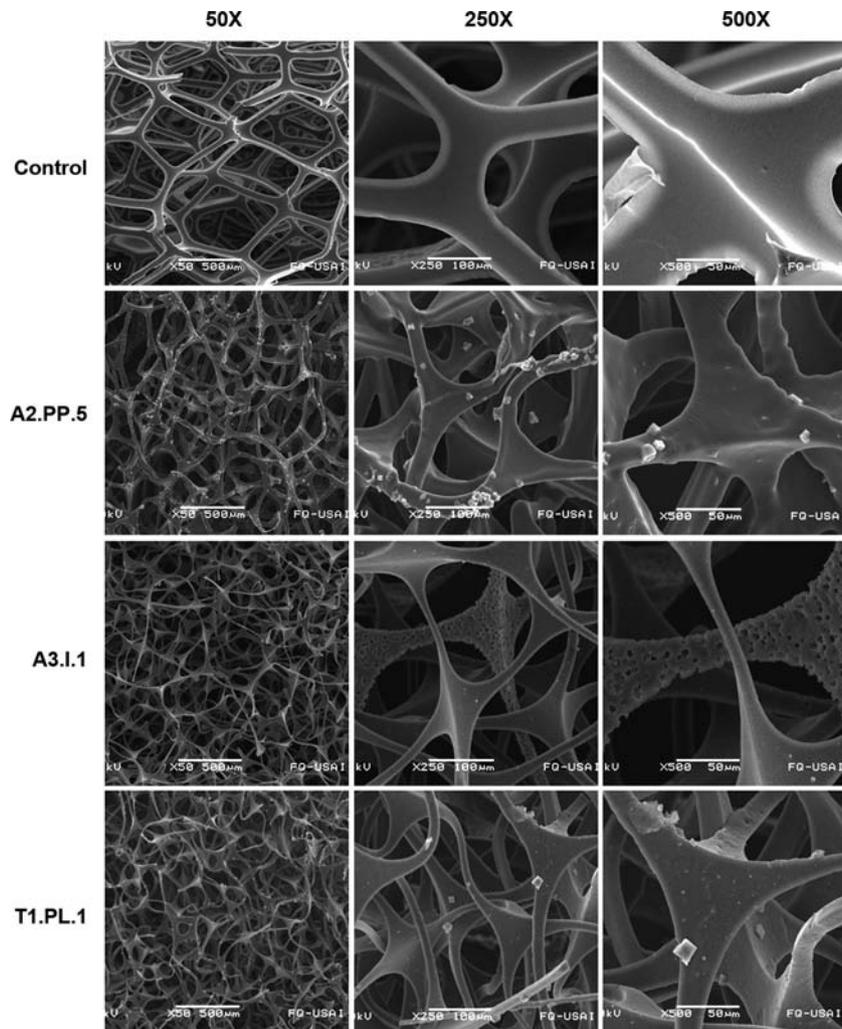


FIG 6 Scanning electron micrographs of PE-PU foam ultrastructure after fungal growth. Foam pieces were incubated during 21 days with three of the best Impranil-degrading fungal strains: *Cladosporium tenuissimum* A2.PP.5 and A3.I.1 and *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1; after that time, mycelia were destroyed to analyze their effect on PU structure.

Even though foam A presents this toxicity, *C. tenuissimum* A2.PP.5 was able to degrade it to some extent (25.9%), suggesting that this strain might have some resistance to the toxic effects of TDCPP. PE-PU has been consistently reported to be highly recalcitrant to biodegradation (11, 13, 14, 17–19). In our work, weight losses from 35 to 65% were reached when PE-PU foams were incubated in 50% PDB for 3 weeks with the six different *Cladosporium* strains. These values are much larger than the 27.5% reported for the degradation of PE-PU foams incubated in LB-50% glucose for 10 weeks with the *Alternaria* sp. strain PURDK2 (20). Cultures of *Cladosporium* strains in MM with PE-PU foams failed to grow (data not shown), indicating that an easily available carbon source is needed to sustain fungal growth and trigger PU biodegradation capability. On the other hand, our results suggest that the extent of hyphal penetration into the PU foam structure seems to be correlated with the biodegradation of solid foam, since mycelia of the *Cladosporium* strains, the most degrading species, extensively invaded the tested material (Fig. 3 and 4), whereas *A. fumigatus* A2.PL.1 and *P. chrysogenum* BP3.I.7, the least degrading strains, produced a limited amount of mycelia with scarce foam

penetration (data not shown). Moreover, the enzymes secreted by fungal hyphae must actively participate in biodegradation. Indirect evidence of these activities is observed in the microscopic structure of the PE-PU foams after fungal treatment; they not only looked to be broken by the physical action of mycelial growth, but they also looked thinner, rougher, and more porous than the non-fungus-treated foams (Fig. 6). Although Impranil (PS-PU) and foams (PE-PU) have different formulations, urethane and ester groups are common in all PUs; therefore, the extracellular esterase activities detected in the MM with Impranil cultures must also participate in the biodegradation of PE-PUs. However, other types of enzymes, such as amidases, oxidases, or peroxidases, must also be involved in the degradation of PE-PUs. Currently, efforts are being developed in our laboratory in order to identify the enzymatic activities involved in the biochemical processes these fungi display to biodegrade PU.

In conclusion, in this work, we report the isolation of several environmental filamentous fungi with the capability to degrade PS-PU and PE-PU varnishes, as well as PE-PU solid foams, with

the highest degradation values reported so far, to our knowledge. Several species belonging to the *Cladosporium cladosporioides* complex were the best PU degraders. FTIR spectroscopy and GC-MS analysis showed that ester and urethane groups were attacked through the activity of fungal enzymes. Considerable esterase and low urease but not protease activities were detected during Impranil fungal degradation. Our findings represent one step forward toward the development of new biotechnological processes for more efficient PU degradation.

ACKNOWLEDGMENTS

J.Á.-B. acknowledges the Facultad de Química, UNAM Programa 121, Formación Básica en Investigación. J.Á.-B. and R.G.-H. acknowledge CONACYT for graduate studies scholarships. SEM and GC-MS analyses were carried out at Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) at Facultad de Química, UNAM, by Iván Puente Lee and Georgina Duarte-Lisci. We thank Gabriel García Batarse, CEO of Espumas Industriales Monterrey, S.A. de C.V., for providing the PE-PU foams; Javier Cruz Gómez, who provided the polyester polyol; Néstor López Castillo for technical support for the FTIR analysis; and Hermilo Leal Lara for technical support on fungal culture.

This study was funded by UNAM-DGAPA-PAPIIT grants IN222811 and IN217114, Facultad de Química-PAIP grant 5000-9117, and CONACYT grant 252001. The funders had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of academic members of the Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, was funded by CONACYT (252001). This work, including the efforts of Herminia Loza-Tavera, was funded by Facultad de Química, UNAM (5000-9117). This work, including the efforts of Herminia Loza-Tavera, was funded by UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN222811). This work, including the efforts of Herminia Loza-Tavera, was funded by UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN217114). The funders had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

1. Plastics Europe. 2015. Plastics—the facts 2015. Plastics Europe, Frankfurt, Germany. <http://www.plasticseurope.es/Document/plastics-the-facts-2015.aspx?FolID=2>.
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2012. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 2011. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Aguascalientes, Mexico.
3. Gautam R, Bassi AS, Yanful EK. 2007. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Appl Biochem Biotechnol* 141:85–108. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-007-9212-6>.
4. Mahajan N, Gupta P. 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *RSC Adv* 5:41839–41854. <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA04589D>.
5. Ignatyev IA, Thielemans W, Vander Beke B. 2014. Recycling of polymers: a review. *ChemSusChem* 7:1579–1593. <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201300898>.
6. Ocegüera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños-Núñez S, Cruz-Gómez MJ, Wachter C, Loza-Tavera H. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and *N*-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol* 73:6214–6223. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01230-07>.
7. Howard GT. 2012. Polyurethane biodegradation, p 189–211. In Singh SN (ed), *Microbial degradation of xenobiotics*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
8. Loredó-Treviño A, Gutiérrez-Sánchez G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2012. Microbial enzymes involved in polyurethane biodegradation: a review. *J Polym Environ* 20:258–265. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-011-0390-5>.
9. Barratt SR, Ennos AR, Greenhalgh M, Robson GD, Handley PS. 2003. Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *J Appl Microbiol* 95:78–85. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01961.x>.
10. Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl Environ Microbiol* 73:5817–5824. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01083-07>.
11. Krasowska K, Janik H, Gradyś A, Rutkowska M. 2012. Degradation of polyurethanes in compost under natural conditions. *J Appl Polym Sci* 125:4252–4260. <http://dx.doi.org/10.1002/app.36597>.
12. Mathur G, Prasad R. 2012. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1595–1602. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9572-4>.
13. Zafar U, Houlden A, Robson GD. 2013. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *Appl Environ Microbiol* 79:7313–7324. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02536-13>.
14. Zafar U, Nzeram P, Langarica-Fuentes A, Houlden A, Heyworth A, Saiani A, Robson GD. 2014. Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting and analysis of associated fungal communities. *Bioresour Technol* 158:374–377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.077>.
15. Loredó-Treviño A, García G, Velasco-Téllez A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2011. Polyurethane as substrate for fungal strains. *Adv Biosci Biotechnol* 2:52–58. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2011.22009>.
16. Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzer KW, Hickman D, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Nunez SJ, Santiago M, Townes MA, Vishnevetsky M, Williams NE, Vargas MP, Boulanger LA, Bascom-Slack C, Strobel SA. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol* 77:6076–6084. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00521-11>.
17. Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl Microbiol* 16:900–905.
18. Filip Z. 1979. Polyurethane as the sole nutrient source for *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *Eur J Appl Microbiol* 7:277–280. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00498022>.
19. Martens R, Domsch KH. 1981. Microbial degradation of polyurethane foams and isocyanate based polyureas in different media. *Water Air Soil Poll* 15:503–509. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00279430>.
20. Matsumiya Y, Murata N, Tanabe E, Kubota K, Kubo M. 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *J Appl Microbiol* 108:1946–1953.
21. Barnett HL, Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
22. Doyle JTT, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 15:12–13.
23. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. 2005. Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 43:2092–2103. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.5.2092-2103.2005>.
24. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315–322. In Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ (ed), *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, New York, NY.
25. Jerome CA, Lynn DH. 1996. Identifying and distinguishing sibling species in the *Tetrahymena pyriformis* complex (Ciliophora, Oligohymenophorea) using PCR/RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA. *J Eukaryot Microbiol* 43:492–497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04509.x>.
26. Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willems M, Andersen B, Summerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U, Crous PW. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Stud Mycol* 67:1–94. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>.
27. Carbone I, Kohn LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556. <http://dx.doi.org/10.2307/3761358>.
28. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic

- Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
29. McCarthy SJ, Meijs GF, Mitchell N, Gunatillake PA, Heath G, Brandwood A, Schindhelm K. 1997. *In-vivo* degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. *Biomaterials* 18:1387–1409. [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00083-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00083-5).
 30. Pergal MV, Džunuzović JV, Poręba R, Micić D, Stefanov P, Pezo L, Špírková M. 2013. Surface and thermomechanical characterization of polyurethane networks based on poly(dimethylsiloxane) and hyperbranched polyester. *Express Polym Lett* 7:806–820. <http://dx.doi.org/10.3144/expresspolymlett.2013.78>.
 31. Witte CP, Medina-Escobar N. 2001. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenols reaction. *Anal Biochem* 290:102–107. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.2000.4933>.
 32. Nair S, Kumar P. 2007. Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* strain (NMSN-1d) utilizing colloidal water-dispersible polyurethane. *World J Microb Biotechnol* 23:1441–1449. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9388-5>.
 33. Rowe L, Howard GT. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeter Biodegr* 50:33–40. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00047-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00047-1).
 34. Bensch K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, de Jesús Yáñez-Morales M, Crous PW. 2015. Common but different: the expanding realm of *Cladosporium*. *Stud Mycol* 82:23–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.001>.
 35. Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Walz SL, Schultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeter Biodegr* 33:103–113. [http://dx.doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90030-2](http://dx.doi.org/10.1016/0964-8305(94)90030-2).
 36. Ng KP, Yew SM, Chan CL, Soo-Hoo TS, Na SL, Hassan H, Ngeow YF, Hoh CC, Lee KW, Yeeb WY. 2012. Sequencing of *Cladosporium sphaerospermum*, a dematiaceous fungus isolated from blood culture. *Eukaryot Cell* 11:705–706. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00081-12>.
 37. Braslaw J, Gerlock JL. 1984. Polyurethane waste recycling. 2. Polyol recovery and purification. *Ind Eng Chem Process Des Dev* 23:557–561. <http://dx.doi.org/10.1021/i200026a025>.
 38. Rossi P, Kosior E, Iovenitti P, Massod S, Sbarski I. 2003. Polyester polyols for polyurethane foams from recycled PET. *Prog Rubber Plast Recyc Technol* 19:51–59.
 39. Yong H, Zhang X, Zhang X, Huang H, Chang J, Chen H. 2013. A recycling model of excess toluene diisocyanate isomers in the preparation of polyurethane prepolymer. *J Appl Polym Sci* 127:2176–2183. <http://dx.doi.org/10.1002/app.37779>.
 40. Peter S, Karich A, Ullrich R, Gröbe G, Scheibner K, Hofrichter M. 2014. Enzymatic one-pot conversion of cyclohexane into cyclohexanone: comparison of four fungal peroxygenases. *J Mol Catal B Enzym* 103:47–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.016>.
 41. Li J, Giesy JP, Yu L, Li G, Liu C. 2015. Effects of Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) in *Tetrahymena thermophila*: targeting the ribosome. *Sci Rep* 5:10562. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10562>.