



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Carrera de Biología

“Caracterización de las actividades ureasa y uretanasa extracelulares en cultivos bioestimulados del hongo *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 durante la degradación de espumas de poliéter poliuretano”

Tesis

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta

Diana Díaz Durán



Ciudad de México, México. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente: Q. Martha Trinidad Julieta Oliveros
Vocal: Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera
Secretario: Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro
1er. Suplente: Dra. Hortensia Rosas Acevedo
2do. Suplente: Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández

Lugar donde se desarrolló el tema:

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. UNAM.

Asesor de la tesis:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera
Facultad de Química, UNAM.

Asesor interno de la tesis:

Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro
F.E.S. Zaragoza.

Supervisor técnico:

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez
Facultad de Química, UNAM.

Sustentante:

Diana Díaz Durán

Agradecimientos

A los apoyos brindados por Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM IN223317 y al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado-Facultad de Química-UNAM 5000-9117 otorgados a la Dra. Herminia Loza-Tavera.

Al subprograma 127 “Formación básica en investigación” de la Facultad de Química de la UNAM, por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en su laboratorio donde aprendí mucho, por tenerme una gran paciencia y por sus consejos que ayudaron a mi formación tanto académica como personal.

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

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM, principalmente al Dr. Víctor Zaldívar por su ayuda en la purificación y al Q. Iván Puente por el apoyo brindado en los análisis de microscopía electrónica de barrido.

A todos los profesores y técnicos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química (Conjunto E) por el asesoramiento y apoyo con el manejo de equipos y técnicas de análisis.

Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio del Departamento de Alimentos, de la Facultad de Química, UNAM por apoyarnos con el uso de su cama de flujo laminar para el manejo de todos los cultivos y a su alumna Michelle por su comprensión y consejos.

Al Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro, mi asesor interno, por su ayuda en la revisión de la tesis y sus consejos en el transcurso de la misma.

Dedicatoria

A mi familia por brindarme todo su cariño que me ayuda día a día y porque sé que siempre estarán conmigo.

A mi papá por su infinita paciencia y cariño, por tantas pláticas interminables y tener un buen consejo a la mano en cada ocasión, por creer siempre en mí y demostrarme el poder del amor por la familia. A mi mamá porque las anécdotas más felices y divertidas de mi infancia son por ti, por darme el ejemplo de lo que es una mujer trabajadora, que no se rinde y porque desde que tengo uso de razón hasta ahora sé que para ella nada es imposible. A mi hermano por estar siempre ahí apoyándome, a mi hermana que a lo largo de este proceso de la tesis se convirtió en más que una hermana, en mi mejor amiga y cómplice. A todos los amo muchísimo y les estaré siempre agradecida por todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí.

A mi chango, has visto lo mejor, lo peor, lo vergonzoso, lo loco, molesto y necio de mí, así como has escuchado mis peores chistes y aun así sigues dándome tu amistad y cariño incondicional. No sé que hubiera sido de mí si no te hubiera conocido, sabes que yo no creo en el destino y esas cosas pero, al ver nuestra amistad no puedo evitar pensarlo. Gracias por ser siempre tú y estar ahí para mí.

A mis amigos de la FES por todos esos momentos estresantes y divertidos, que compartimos. A mi hermano por su amistad y tantas risas, a Alex por su apoyo y consejo. A Tana por tener esa actitud contagiosa tan positiva y alegre pero sobre todo gracias por todas las ratitas de nuestro servicio social y por favor deja de contar la historia de la ratita que casi asfixié.

A mis amigos del 105 por su increíble ayuda en la realización de la tesis, su apoyo y terapias grupales. Los voy a extrañar.

A ti, por acompañarme en una etapa importante de mi vida, gracias por muchos momentos hermosos, siempre tendrás un lugar especial en mí.

Índice de contenido

Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Índice de figuras y tablas	viii
Abreviaturas	x
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	
3.1 Plásticos	4
3.2 Poliuretano	5
3.3 Desechos y biodegradación de PU	6
3.4 Biodegradación de PU por hongos	7
3.5 Antecedentes del proyecto	10
4. Hipótesis	12
5. Objetivos	
Objetivos generales	12
Objetivos particulares	12
6. Diseño experimental	15
7. Materiales y método	
7.1 Medios de cultivo y soluciones	16
7.2 Conservación de hongos filamentosos <i>Cladosporium tenuissimum</i> cepa A3.I.1 capaz de crecer en PU	16
7.3 Cultivos en bioestimulación	15
7.3.1 Obtención de conidias	15
7.3.2 Determinación de las condiciones para obtener la mayor degradación de espumas y mayor cantidad de proteína extracelular	16
7.4 Cuantificación de degradación de las espumas PE-PU	17
7.5 Obtención y obtención de proteínas extracelulares	18
7.5.1 Cuantificación de PolyLack y almidón	18

7.5.2 Obtención de las proteínas del SN	20
7.6 Cuantificación de la actividad ureasa y uretanasa	21
7.7 Análisis estadístico	22
7.8 Aproximaciones a la purificación de la proteína con las actividades ureasa y uretanasa	23
7.8.1 Determinación de pH y buffer óptimos	23
7.8.2 Determinación del comportamiento de la actividad ureasa con diferentes concentraciones de NaCl	23
7.8.3 Eliminación del pigmento	24
7.8.4 Cromatografía de intercambio iónico	25
7.8.5 Resolución de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)	26
7.8.6 Zimografía para actividad ureasa y uretanasa	27
8. Resultados y discusión	29
8.1 Determinación de las condiciones para la eliminación del PolyLack y del almidón del sobrenadante del medio de cultivo	30
8.1.1 Detección y cuantificación del PolyLack	30
8.1.2 Detección y cuantificación del almidón	31
8.1.3 Análisis de consumo de PolyLack y almidón como fuente de carbono	33
8.1.4 Eliminación del PolyLack por ultracentrifugación	34
8.1.5 Eliminación de almidón por SDS	35
8.2 Selección de las condiciones de cultivo de <i>C. tenuissimum</i>	
A3.I.1 para incrementar la degradación de espumas de PE-PU y las actividades enzimáticas ureasa y uretanasa	38
8.2.1 Cuantificación de la degradación de las espumas de PE-PU y de la cantidad de proteína extracelular	38
8.2.2 Correlación entre la actividad ureasa, uretanasa y la degradación de espumas de PU	41
8.2.3 Cuantificación curso-temporal de las actividades	46

ureasa y uretanasa de las tres condiciones de interés (1e/1m, 1e/3m, 3e/3m)	
8.2.4 Efecto de recambiar el medio de cultivo en la degradación de espumas de PE-PU y en las actividades enzimáticas ureasa y uretanasa en las tres condiciones de interés	49
8.2.5 Selección de la condición adecuada para la purificación de las proteínas de interés	52
8.3 Análisis de degradación de espumas de PE-PU	53
8.4 Caracterización de las actividades ureasa y uretanasa	55
8.4.1 Identificación del pH óptimo para la medición de las actividades ureasa y uretanasa	55
8.4.2 Identificación del buffer óptimo para el incremento de las actividades ureasa y uretanasa	56
8.4.3 Efecto del NaCl sobre la actividad ureasa	57
8.5 Purificación de las proteínas con actividad ureasa y uretanasa	59
8.5.1 Resolución de las proteínas del extracto semipurificado	62
9. Conclusiones	67
10. Perspectivas	69
Literatura citada	70
Anexo 1. Preparación de medios y reactivos	74
Anexo 2. Análisis estadístico	80

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Reacción general para la síntesis de poliuretanos y fórmulas de poliéter poliuretano y del poliéster poliuretano

Figura 2. Curva estándar de PolyLack

Figura 3. Barrido espectral del complejo almidón-lugol

Figura 4. Curva estándar del complejo almidón-lugol cuantificado a 580 nm

Figura 5. PolyLack y almidón remanentes en el sobrenadante de cultivos de *C. tenuissimum* A3.I.1 en medio PBPL

Figura 6. Eliminación de PolyLack de SN de cultivos de 21 días de *C. tenuissimum* en PBPL.

Figura 7. Almidón remanente después del tratamiento con diferentes concentraciones de SDS y centrifugación en frío

Figura 8. Actividades enzimáticas ureasa y uretanasa después de eliminar el PL y el almidón de cultivos de *C. tenuissimum* A3.I.1 en PBPL

Figura 9. Degradación de espumas de PE-PU (barras) y cantidad de proteína extracelular (cuadros) en cultivos de *C. tenuissimum* A3.I.1, en las diferentes condiciones analizadas

Figura 10. Efecto de *C. tenuissimum* A3.I.1 sobre las espumas de PE-PU, después del tratamiento con diferentes inóculos y espumas de PE-PU

Figura 11. Actividades ureasa (barras blancas) y uretanasa (barras negras) de las distintas condiciones de cultivo probadas y su nivel de degradación de espumas (triángulos).

Figura 12. Cuantificación de las actividades ureasa (barras blancas) y uretanasa (barras negras) y degradación de la espuma de PE-PU (triángulos) de las tres condiciones seleccionadas

Figura 13. Cuantificación de las actividades ureasa y uretanasa de los cultivos con recambios

Figura 14. Microfotografías de espumas de PE-PU tratadas con el hongo *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1

Figura 15. Efecto del pH en las actividades ureasa y uretanasa extracelulares de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1

Figura 16. Efecto de diferentes buffers en la cuantificación de las actividades ureasa y uretanasa extracelulares

Figura 17. Efecto del NaCl sobre la actividad ureasa extracelular de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1

Figura 18. Cromatograma de la columna de intercambio iónico cargada con proteínas extracelulares de *C. tenuissimum* A3.I.1

Figura 19. Actividades ureasa y uretanasa cuantificadas espectrofotométricamente en las fracciones de la columna de intercambio aniónico

Figura 20. Análisis por PAGE-SDS y zimograma de la purificación de la activada ureasa

Figura 21. Cromatograma de columna de intercambio iónico con actividades ureasa y uretanasa cuantificadas espectrofotométricamente y actividad ureasa analizada por zimografías

Tabla 1. Hongos con capacidad de degradar PU y las posibles actividades enzimáticas involucradas

Tabla 2. Tabla de correlación entre las variables de las 9 condiciones probadas

Tabla 3. Resultados observados en las pruebas de recambio realizadas para la condición 1e/3m.

Abreviaturas

DTT	Ditiotreitol
NBT	Nitroazul de tetrazolio
PDB	Caldo de papa dextrosa
PB	Caldo de papa
PBPL	Caldo de papa PolyLack
PDA	Papa dextrosa agar
PE-PU	Poliéter poliuretano
PU	Poliuretano
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SN	Sobrenadante
SLH	Solución lava hongos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TA	Temperatura ambiente
TDI	Diisocianato de tolueno
#e/#m	Espumas inoculadas/millones de conidias

1. Resumen

El 60% del poliuretano (PU) que se produce son espumas y su acumulación en basureros genera un grave problema ambiental, una alternativa a este problema es la biodegradación. Se han reportado hongos capaces de degradar PU y se proponen como posibles responsables a enzimas extracelulares de tipo hidrolasas, entre ellas las ureasas. En trabajos previos, se ha visto que la bioestimulación incrementa la actividad degradativa de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 sobre espumas de PE-PU a un 70%. Este incremento estuvo acompañado de la inducción de una actividad ureasa extracelular, y dado que la urea tiene una estructura similar al uretano, es posible que también presente una actividad uretanasa. En este trabajo se establecieron las condiciones de cultivo para producir la mayor degradación de espumas de PE-PU y de actividad ureasa y uretanasa extracelulares de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. bioestimulado con PolyLack (PL), se realizó la caracterización bioquímica de estas actividades para su purificación y una prueba para su purificación por cromatografía de intercambio iónico. Debido a que el PL y el almidón presente en el medio de cultivo interferían con la determinación de las actividades enzimáticas de interés se desarrollaron protocolos para eliminarlos del medio. La eliminación del almidón se logró con SDS al 0.25% y la del PL con una ultracentrifugación a 160,669 x *g*. Con estas modificaciones se redujo el tiempo empleado en la concentración de proteínas extracelulares de 5 a 2 días. Con el propósito de incrementar la degradación de las espumas y la actividad ureasa se probó utilizar diferente número de espumas (1e-3e) y cantidad de inóculo (1m-3m=millones de conidias) a 21 días de cultivo (dos semanas en agitación y una en estático). De estas primeras pruebas se eligieron las condiciones 1e/1m, 1e/3m y 3e/3m para realizar estudios curso-temporales sin y con recambios de medio, buscando favorecer la degradación y aumentar las actividades enzimáticas. Se eligió la condición 1e/3m, sin recambio de medio y a 14 días en agitación, pues con ella se incrementaron las actividades ureasa y uretanasa y se mantuvo una alta

degradación de la espuma. Se determinaron el buffer (fosfatos 50 mM) y pH óptimos para las actividades ureasa (pH 8) y uretanasa (pH 7), así como su resistencia a diferentes concentraciones de NaCl (1 M disminuye su actividad un 75%) La actividad ureasa y la degradación presentaron una alta correlación ($r=0.85$), lo que sugiere que esta actividad es importante en la degradación. La diferencia entre los pH óptimos de las actividades ureasa y uretanasa, además de una correlación negativa entre ellas ($r=-4$), sugieren que son dos proteínas distintas. Las fracciones analizadas después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico (Sephadex Q) mostraron dos grupos de fracciones con actividad ureasa, una de ellas también presentó actividad uretanasa. En el análisis por zimografía para actividad ureasa de estas fracciones se observaron dos bandas, una de 100 kDa que presentó solo actividad ureasa y otra de 150 kDa, tanto con actividad ureasa como con actividad uretanasa, lo cual es evidencia de que son dos distintas proteínas con actividad ureasa que podrían estar involucradas en la degradación del PU.

2. Introducción

La producción global de plástico en el 2016 fue de cerca de 300 millones de ton de los cuales, el 91% no fue reciclado y se estima que para el 2025 habrán 12 mil millones de ton de plástico en los continentes (Parker, 2017). La mayoría de los productos plásticos se manejan como “no reciclables” debido principalmente a los costos y a la falta de métodos efectivos para manejar estos desechos, por lo que se acumulan en basureros o vertederos (Yang *et al.*, 2012).

El poliuretano (PU) es un polímero sintético inventado en 1937 por Otto Bayer, pero que no se empezó a utilizar comercialmente sino hasta 1957. Debido a su variada estructura química, tiene una amplia gama de aplicaciones utilizándose en diversos ámbitos, como en la fabricación de fibras, barnices, piel sintética, adhesivos, materiales de construcción, suelas de zapatos, aislantes y hule espumas, por mencionar algunos (Howard, 2002). El PU ocupa el sexto lugar de los plásticos más utilizados con una producción mundial en el 2010 de aproximadamente de 3.65 millones de ton llegando en el 2016 a los 17.94 millones de ton (UTECH las Américas, 2017). La producción de PU en Latinoamérica corresponde al 6% de la producción mundial y México produce el 28% de esta cifra. Según datos del principal productor de plástico a nivel mundial, China, el PU es uno de los productos plásticos que ha ido en aumento en los últimos años (Yang *et al.*, 2012) siendo las espumas de PU uno de los productos con mayor demanda, observándose además un incremento en la demanda de espumas rígidas de PU para construcción en Europa, principalmente en Alemania y Rusia (Plastics Europe, 2016).

El incremento en la producción de PU ha llevado a la búsqueda de mejores métodos para el manejo y control de sus residuos. Debido a que el PU es una estructura compleja, ya que no está constituido por moléculas idénticas, el reciclaje de sus residuos es prácticamente imposible (Cregut *et al.*, 2013). Existen algunos métodos

físicos y químicos para el manejo de sus desechos, sin embargo, estos métodos son costosos, generan contaminantes y son poco eficientes. Debido a esta problemática, actualmente se buscan nuevas alternativas basadas en la biodegradación de PU por microorganismos.

Se ha reportado que algunos tipos de PU son susceptibles al ataque por hongos filamentosos. La gran diversidad de este grupo taxonómico, les permite sobrevivir en diversos medios utilizando una amplia gama de sustratos como fuente de carbono. Llevan a cabo una digestión externa, por lo que liberan enzimas hidrolíticas al ambiente para que extraigan los nutrientes de la materia orgánica disponible y posteriormente éstos son absorbidos por el organismo (Kavanagh, 2005), por lo que las enzimas extracelulares de estos organismos deben ser resistentes y capaces de atacar diversos sustratos complejos, incluso de polímeros naturales como la lignina. En el laboratorio de la Dra. Loza-Tavera se han identificado hongos capaces de degradar espumas de poliéter-poliuretano, altamente recalcitrantes (Álvarez-Barragan *et al.*, 2016). Asimismo, en estudios de degradación de estas espumas, en medios bioestimulados, se observó la inducción de una actividad ureasa, la cual podría estar relacionada con el ataque a los grupos uretano del PU (González-Hernández, 2017). Los objetivos de este trabajo fueron establecer las condiciones de cultivo para producir la mayor degradación de espumas de PE-PU y de actividad ureasa y uretanasa extracelulares de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. bioestimulado con PolyLack y realizar una caracterización bioquímica de estas actividades para su purificación.

3. Antecedentes

3.1 Plásticos

Los plásticos son materiales orgánicos que se sintetizan de manera artificial y tienen diversas características de dureza, flexibilidad, moldeabilidad y resistencia, que los hacen muy importantes en la vida moderna ya que pueden tener prácticamente cualquier uso, por lo que se producen en gran cantidad. Sin embargo, la mayoría de ellos no son biodegradables y tampoco se reciclan por lo que las moléculas que los constituyen no son devueltas a los ciclos biogeoquímicos del planeta, generando con esto graves problemas de contaminación.

3.2 Poliuretano

El PU es un polímero sintetizado a partir de la condensación de diisocianatos y polioles que están unidos por enlaces de tipo uretano o carbamato (Fig. 1). Debido a que existe una amplia variedad de polioles y diisocianatos, es posible manufacturar gran variedad de PUs con diferentes capacidades. El número de carbonos, así como los sustituyentes en las cadenas, brindan características diferentes a cada polímero. Los polioles de mayor peso molecular se pueden utilizar para generar espumas, selladores, pinturas, empaques, condones, entre otros, mientras que los de menor peso molecular son utilizados para la fabricación de partes automotrices o paneles para aislamiento térmico (Howard, 2002), por lo que su potencial en diversas industrias es amplio en comparación con otros polímeros. Debido a su resistencia, capacidad de retención del calor y baja susceptibilidad al deterioro, las espumas de PU son utilizadas como aislantes térmicos en la industria de la construcción, lo que lo convierte en el quinto plástico con mayor producción en Europa (Plastics Europe, 2016).

Los PUs que más se utilizan en la industria son los poliéter (PE-PU) y poliéster poliuretanos (PS-PU), que tienen como precursores a polioles con enlaces tipo éter o

tipo éster, respectivamente (Cregut *et al.*, 2013). El PU es resistente al deterioro principalmente por su enlace tipo uretano, el cual es difícil de romper, pero además, los enlaces éter, presentes en los PE-PU son también difíciles de atacar por lo que este tipo de PU es de los más recalcitrantes (Fig. 1).

De acuerdo a la Asociación Industrial de Plástico en China, el incremento en la producción de PU ha sido rápido ya que, de producir 1 millón de ton anuales en el 2000, pasaron a 3.5 millones de ton en 2007, alcanzando 7.5 millones de ton en 2011. De esto, las espumas corresponden al 60% de la producción, 4.5 millones de ton, de los cuales el 15% (675,000 ton) se convierte en desechos de la manufactura del producto final (Yang *et al.*, 2012).

3.3 Desechos y biodegradación de PU

Existen algunos métodos químicos y físicos para el tratamiento de los desechos de PU entre los que se encuentran la reutilización del material (espumas recicladas), molienda, e incineración. La reutilización y la molienda son poco empleados debido a la complejidad en el manejo de los residuos y a que el PU va perdiendo sus propiedades a cada ciclo de reciclado (Yang *et al.*, 2012). Los métodos químicos no son rentables debido a que es más caro extraer el PU de los desechos que hacer nuevos materiales, el método más efectivo hasta el momento es la incineración, ya que además es posible utilizar cierto porcentaje de residuos de PU para incrementar la combustión y la liberación de energía calorífica. Sin embargo, la gran desventaja de este método es la producción de sustancias tóxicas que son dañinas al ambiente y a la salud (Yang *et al.*, 2012). Debido a que los tratamientos son costosos, además de dañinos al ambiente (Cregut *et al.*, 2013), los desechos de PU se depositan mayoritariamente en rellenos sanitarios o en basureros a cielo abierto por lo que, se acumulan, generando un grave impacto ambiental.

En la búsqueda de mejores métodos para manejar estos desechos destaca la biodegradación, que consiste en la descomposición de compuestos o materiales por acción de agentes biológicos, principalmente hongos y bacterias. Estos microorganismos son los principales agentes biodegradadores de compuestos orgánicos, constituyen una amplia diversidad y se encuentran en múltiples hábitats (Cosgrove *et al.*, 2007). Debido a que son capaces de utilizar diversos compuestos como fuente de carbono, se han estudiado algunos procesos degradativos en los que participan, con la finalidad de analizar y utilizar sus capacidades metabólicas. Este potencial biodegradativo ha llevado a que se utilicen en diversos procesos biotecnológicos, como los relacionados con la biodegradación de xenobióticos o de polímeros sintéticos.

3.4 Biodegradación de PU por hongos

Los hongos son organismos muy activos metabólicamente, lo que les permite proliferar en diversos ambientes, aun en condiciones extremas. Esta capacidad les ha permitido utilizar polímeros como la celulosa, transformándola a moléculas de menor tamaño para posteriormente absorberla, un proceso que se desarrolla principalmente por acción de hidrolasas y oxidasas (Gautam *et al.*, 2006). Se ha observado que diversas especies de hongos atacan distintos tipos de PU, y se han detectado algunas actividades enzimáticas que podrían estar involucradas con su degradación (Tabla 1). Se han propuesto a las hidrolasas, estererasas, lipasas, proteasas y ureasas como posibles responsables de la degradación del PU. Entre ellas las que más se han reportado involucradas son las estererasas (Filip, 1979; Pathirana y Seal, 1983; Crabbe *et al.*, 1994; Loredó-Treviño *et al.*, 2011; Álvarez-Barragán *et al.*, 2016). Sin embargo en la mayoría de estos trabajos se utilizan espumas de PS-PU, por lo que estas enzimas actúan sobre el enlace éster y no sobre el enlace uretano que es el enlace más recalcitrante de la molécula. Además, el PE-PU tiene dos enlaces recalcitrantes en su molécula, el uretano

y el éter. Debido a la complejidad de este material desde 1968 a la fecha solo se han publicado 3 artículos de hongos capaces de degradar espumas de PE-PU (Filip, 1979; Matsumiya *et al.*, 2010; Álvarez-Barragán *et al.*, 2016), en dos de estos artículos se propusieron a las ureasas como las posibles responsables de esta degradación, siendo de los pocos reportes en este tema, que involucran a las ureasas en estos procesos de degradación de PU. La acción de las ureasas y de las uretanasas, debe ser relevante por su posible actividad sobre el enlace uretano. Ya que el grupo uretano tiene relación con la estructura de la urea, es posible que la ureasa pueda actuar sobre él. La identificación de enzimas capaces de romper el enlace uretano, uno de los enlaces más recalcitrantes de la molécula, sería un aporte relevante en el estudio de la degradación de estos polímeros.

La biodegradación de PU consiste en romper los enlaces que lo conforman para liberar moléculas más pequeñas que el organismo puede internalizar para metabolizarlos y obtener carbono, nitrógeno y energía. La bioestimulación es una estrategia que se utiliza para mejorar los procesos biodegradativos de algunos microorganismos. Consiste modificar el ambiente en el que se encuentra el microorganismo para estimularlo con el propósito de incrementar los niveles de degradación de xenobióticos. Se ha comprobado que por medio de la adición de nutrientes limitantes o compuestos donadores de electrones se pueden inducir actividades enzimáticas específicas (Adams *et al.*, 2015). Esta estrategia se ha probado en la degradación de láminas de PU en suelos por hongos, en donde se adicionó extracto de levadura solo o con un barniz de PU, logrando incrementar hasta en un 45% la degradación del PU sólido (Crosgrave *et al.*, 2010).

Tabla 1. Hongos con capacidad de degradar PU y posibles actividades enzimáticas involucradas
(Modificada de Álvarez Barragán, 2016). PS-PU: poliéster. PE-PU: poliéter. ES: espumas

Hongo	Tipo de PU	Actividad enzimática	Referencia
<i>Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Trichoderma</i> sp.	PS-PU y PE-PU	No reportadas	Darby, Kaplan, 1968
<i>Aspergillus niger, Cladosporium herbarum</i>	(ES) PE-PU	Esterasa	Filip, 1979
<i>Aspergillus fumigatus, Gliocladium roseum, Penicillium citrium.</i>	(ES) No reportado	Esterasa, proteasa y ureasa	Pathirana, Seal, 1983
<i>Chaetomium globosum, Aspergillus terreus</i>	PS-PU	Esterasa y proteasa	Boubendir, 1993
<i>Curvularia senegalensis, Fusarium solani, Aureobasidium pullulans, Cladosporium</i> sp.	PS-PU	Esterasa	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Esophialajean selmei</i>	PE-PU	No reportadas	Owen <i>et al.</i> , 1996
<i>Nectriaglio cladioides, Penicillium ochrochloron, Geomyces pannorum</i>	PS-PU	No reportadas	Barratt <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus niger</i>	(ES) PU	No reportadas	Ghazali <i>et al.</i> , 2005
<i>Geomyces pannorum, Penicillium inflatum, Alternaria</i> sp., <i>Neonectriara mulariae, Penicillium viridocatum</i>	PS-PU	No reportadas	Crosgrove <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus niger</i>	PE-PU	No reportadas	Hincapié-Llanos <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria</i> sp.	(ES) PE-PU	Ureasa	Matsumiya <i>et al.</i> , 2010
<i>Nectria haematococca, Penicillium viridicatum, Penicillium ochrochloron, Mucormycotina</i> sp.	PS-PU	No reportadas	Cosgrove <i>et al.</i> , 2010
<i>Alternariasolani</i>	No reportado	Proteasa	Ibrahim <i>et al.</i> , 2011
<i>Pestalotiopsis microspora, Alternaria</i> sp., <i>Plectosphaerela</i> sp., <i>Bionectria</i> sp., <i>Nectria</i> sp., <i>Phaeosphaeria</i> sp.	PS-PU	Proteasa	Russel <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	No reportadas	Proteasa, ureasa, esterasa y lacasa	Loredo-Treviño <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus flavus</i>	No reportado	No reportadas	Mathur, Prasad, 2012
<i>Aspergillus niger</i>	(ES) PU	No reportadas	Amaral <i>et al.</i> , 2012
<i>Volutella ciliata, Fusarium solani, Aspergillus fumigatus, Fusarium oxysporum, Trichosporon moniforme, Penicillium mandriti, Bionectria ochroleuca, Penicillium roseopurpureum, Alternaria</i> sp., <i>Geomyces pannorum, Thermomyces lanuginosus</i>	PS-PU	No reportadas	Zafar, Houlden, 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
<i>Cladosporium pseudocladosporioides, Cladosporium tenuissimum, Cladosporium asperulatum, Cladosporium montecillanum, Aspergillus fumigatus, Penicillium chrysogenum</i>	(ES) PE-PU y PS-PU	Esterasas y ureasas	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
<i>Aspergillus tubingensis</i>	PS-PU	No reportadas	Khan <i>et al.</i> , 2017
<i>Cladosporium cladosporioides, Xepiculopsis graminea, Penicillium griseofulvum</i>	(ES) PU	No reportadas	Brunner <i>et al.</i> , 2018

3.5 Antecedentes del proyecto

En el laboratorio de la Dra. Herminia Loza se colectaron y aislaron cepas de hongos a partir de cuatro ambientes distintos (tierra, aire, zonas recubiertas con PU y el basurero “Bordo Poniente”). La selección de los hongos se llevó a cabo con base en su capacidad de crecer en un medio mineral con distintos barnices de PU como única fuente de carbono. Los barnices a base de agua que se utilizaron, fueron Impranil® DLN (PS-PU) y PolyLack® (PE-PU). Se obtuvieron 31 cepas capaces de crecer en Impranil y 22 en PolyLack, todas las cepas que crecieron en PolyLack crecieron también en Impranil. Se cuantificó la degradación de Impranil por acción de los hongos filamentosos, empleando turbidimetría y se determinó la acción de los hongos en el polímero por espectroscopía de infrarrojo (FTIR). Como resultado de dicho estudio se seleccionaron las ocho cepas más degradadoras (entre 20 y 70%) de Impranil y se identificaron por técnicas moleculares. Empleando medios diferenciales, se determinó si los ocho hongos seleccionados presentaban actividades de tipo esterasa, proteasa y ureasa. Seis cepas presentaron actividad de las tres enzimas, la cepa BP3.IC.2 presentó únicamente actividad proteasa y ureasa y la cepa A2.PL.1 mostró actividad esterasas y proteasa. Asimismo, se demostró que estas cepas también eran capaces de reducir el peso de espumas sólidas de PE-PU, entre un 50 y 60%, en 21 días en un sistema de laboratorio que requería de una manipulación compleja (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016). Estos porcentajes de degradación son muy relevantes dado que el mayor porcentaje de degradación de espumas de PE-PU, reportado previamente era de 27% después de permanecer 10 semanas en cultivo con *Alternaria* sp. (Matsumiya *et al.*, 2009).

Posteriormente, en nuestro grupo se estudió el efecto de la bioestimulación sobre la actividad de algunos de los mejores hongos degradadores de espumas de PE-PU, así como la implementación de condiciones de cultivo que pudieran facilitar el manejo del

proceso a nivel biotecnológico (González-Hernández, 2016). Los resultados mostraron que cuando se inoculaba al hongo *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 sobre una espuma PE-PU inoculado con un millón de conidias en un medio de caldo de papa con PolyLack 0.25% como bioestimulante, se lograba un ligero incremento en la degradación de las espumas (10%) pero con menor manipulación del cultivo, facilitando el proceso. Asimismo, el incremento en la degradación se vio acompañado por el aumento en actividad ureasa extracelular en comparación con cultivos sin bioestimulante. Con base en estos resultados es posible suponer que el tratamiento bioestimulante favorece la producción de enzimas de tipo ureasa que podrían jugar un papel importante en la degradación de espumas de PE-PU.

4. Hipótesis

Cuando el hongo *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 es bioestimulado con el barniz PolyLack produce una alta degradación de espumas de PE-PU a la vez que se induce una actividad ureasa extracelular. Dado que las espumas contienen enlaces uretano los cuales son similares a la urea, la ureasa extracelular podría tener actividad uretanasa y ser responsable de la degradación de la espuma.

5. Objetivos

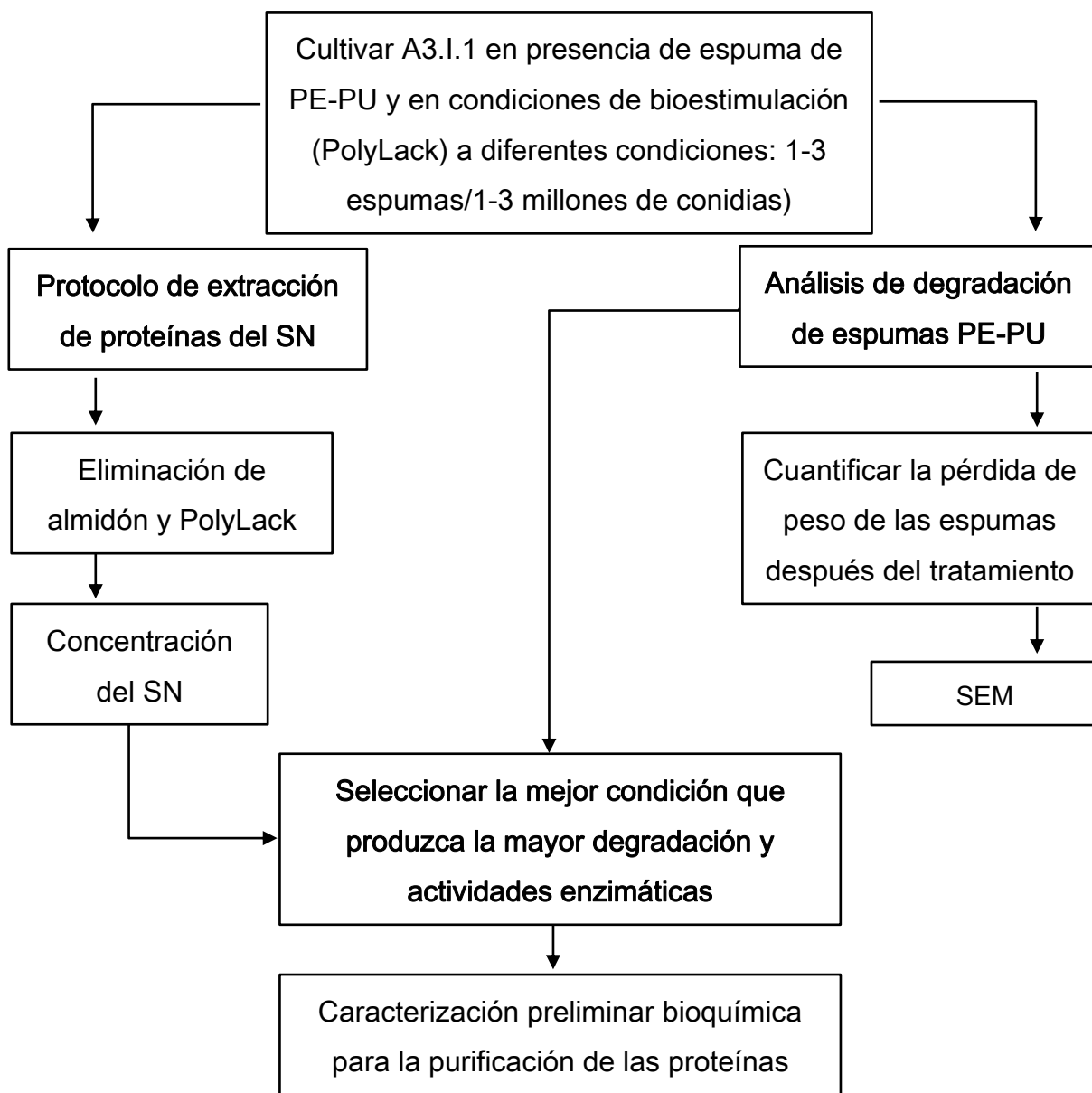
Objetivo general

Establecer las condiciones de cultivo para producir la mayor degradación de espumas de PE-PU y de actividad ureasa y uretanasa extracelulares de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. bioestimulado con PolyLack y realizar una caracterización bioquímica de estas actividades para su purificación.

Objetivos particulares

- I. Montar un protocolo para la obtención de proteínas del sobrenadante de cultivos de *C. tenuissimum* A3.I.1. bioestimulado con PolyLack para la degradación de espumas de PE-PU
- II. Determinar las condiciones de cultivo donde se genere una mayor degradación de espumas de PE-PU
- III. Cuantificar las actividades ureasa y uretanasa en los diversos tratamientos y correlacionarlas con la degradación de las espumas
- IV. Realizar una caracterización bioquímica preliminar para purificar la(s) enzima(s) con actividad ureasa y uretanasa

6. Diseño experimental



7. Materiales y métodos

7.1 Medios de cultivo y soluciones

La preparación de todos los medios de cultivo y soluciones empleados en los experimentos de este trabajo, se describen en el anexo 1.

7.2 Conservación del hongo filamentoso *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1 capaz de crecer en PU

Dada la importancia que tiene esta cepa, al ser una de las que genera los mayores índices de degradación de espumas y barnices de PE-PU, es necesario conservarla en condiciones adecuadas para que mantenga su viabilidad, evitar variaciones genéticas y que el organismo crezca de manera homogénea, para trabajar con la misma cepa en cada experimento. Para la cepa A3.I.1 se puede utilizar tanto conidias como biomasa, ya que con ambos tejidos puede almacenarse en glicerol sin que se vea comprometida su viabilidad (González Hernández, 2016).

Almacenamiento de conidias

1. Llenar $\frac{3}{4}$ partes de una caja Petri con medio PDA líquido y permitir que solidifique (en condiciones asépticas).
2. De glicerol previamente almacenados (biomasa o conidias) tomar un chip de hielo e inocular por estría masiva en la caja de Petri con PDA, incubar a 30 °C en obscuridad hasta conidiación abundante (10 días aproximadamente)
3. En condiciones de esterilidad añadir 6 mL de buffer fosfatos 50 mM pH 6.5 glicerol 30% glicerol a la caja con PDA y raspar suavemente con asa Digrafsky hasta que la solución se enturbie (evitar tomar restos de micelio o agar).
4. Tomar 1 mL de la solución de la caja Petri y verter en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles, cerrar y rotular.
5. Congelar los tubos Eppendorf con nitrógeno líquido y almacenar a -70 °C.

Almacenamiento de micelio y conidias

1. Tomar 50 mg de micelio de los gliceroles almacenados e inocularlo en un matraz de 125 mL con 25 mL de medio PDB. Incubar a 30 °C en oscuridad y sin agitación.
2. Permitir que la cepa crezca hasta cubrir la superficie del medio de cultivo y conidie abundantemente (10 días aproximadamente).
3. En condiciones asépticas con una varilla de vidrio estéril, sin decantar el medio macerar la biomasa contra la pared del matraz.
4. En tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles adicionar 1 mL del aproximadamente de fragmentos pequeños de micelio y agregar 500 µL de buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 con glicerol al 30% en cada tubo, todo en condiciones de esterilidad.
5. Congelar los tubos Eppendorf con nitrógeno líquido y almacenar a -70 °C.

NOTA: El manejo de los cultivos se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar tipo 2A.

7.3 Cultivos en bioestimulación

Los hongos filamentosos son capaces de reproducirse de manera sexual y asexual. Para la reproducción asexual las estructuras especializadas son los conidióforos, en los que se producen y almacenan las conidias, las cuales tienen una elevada capacidad germinativa (rápida y resistente) que les permite tener una mayor y mejor diseminación. Estudios previos indican que el mejor inóculo para obtener la mayor degradación de espumas PE-PU de la cepa A3.I.1 es con conidias (González Hernández, 2016).

7.3.1 Obtención de conidias

1. De gliceroles almacenados de la cepa, tomar un chip de hielo e inocular por estría masiva en una caja de Petri con PDA, incubar a 30 °C en oscuridad hasta conidiación abundante.

2. En condiciones de esterilidad añadir 6 mL de solución SLH (anexo 1) a la caja con PDA y raspar suavemente con asa Digrafsky hasta que la solución se enturbie (evitar tomar restos de micelio o agar).
3. Recuperar la suspensión con conidias en un tubo Falcon de 15 mL y centrifugar a $1,600 \times g$ por 5 min.
4. Decantar el SN, re-suspender el pellet en 10 mL de SLH
5. Repetir los pasos 3 y 4 dos veces más (3 lavados).
6. Re-suspender el pellet en 10 mL de SLH, tomar 2 alícuotas de 20 μL en dos tubos Eppendorf de 0.6 mL y almacenar el resto a 4 °C.
7. Con las alícuotas realizar el conteo de conidias en cámara de Neubauer observando en un microscopio a 40X, para obtener el número de conidias por mL de suspensión.
8. Calcular el volumen necesario de la suspensión donde se tenga 1, 2 y 3 millones de conidias, dependiendo el tratamiento que se va probar y llevarlo a 400 μL con SLH en tubo Eppendorf de 1.5 mL.

7.3.2 Determinación de las condiciones para obtener la mayor degradación de espumas y mayor cantidad de proteína extracelular

Con la finalidad de incrementar la degradación de espumas, así como la producción de proteína en el cultivo, se buscó la mejor combinación entre la cantidad de inóculo y de sustrato, para ello se probaron tres diferentes cantidades de conidias (1, 2 y 3 millones) y de espumas (1, 2 y 3 piezas).

1. Recortar las espumas de PE-PU con las siguientes medidas: 1.5 cm (ancho) x 2.5 cm (largo) x 0.7 cm (grosor), con un peso aproximado de 50 mg.
2. Lavar cada espuma con 20 mL de agua destilada y dejar secar en una estufa al vacío a 40 °C por 24 h.

3. Colocar cada espuma previamente pesada dentro de tubos con tapa (evitar que la espuma esté apretada o doblada) esterilizar en autoclave a 120 °C, 15 psi de presión durante 20 min.
4. En un matraz de 125 mL adicionar 25 mL de medio PBPL, colocar las espumas dentro del matraz y mover circularmente hasta empaparlas por completo.
5. Inocular las espumas con 1, 2 o 3 millones de conidias, repartir el inóculo en partes iguales entre el número de espumas que se estén probando (1, 2 o 3).
6. Incubar a 30 °C durante 14 días en agitación (200 rpm) y 7 días estático.

7.4 Cuantificación de la degradación de las espumas PE-PU

En todos los experimentos se utilizaron espumas elaboradas con TDI (Mondur® TD 80® Grado A) y poliéter polioles de óxido de propileno y etileno (Caradol MD30-45® y Caradol SC56-22®) como precursores.

Un método para el análisis de la degradación de espumas por ataque de los hongos es cuantificar su pérdida de peso, por lo que es necesario retirar el micelio que crece sobre y dentro de la espuma con un agente capaz de penetrar la estructura y destruir el micelio del hongo y que cause un daño mínimo a la espuma. Previamente se determinaron condiciones para eliminar el micelio de las espumas con hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración de 0.88% m/v durante 24 h (González Hernández, 2016)

1. Después de su exposición al hongo recortar el micelio que sobresale de la espuma evitando dañar la estructura de la misma. Para este tratamiento no se requiere esterilidad.
2. Colocar cada espuma en un matraz de 125 mL y adicionar 50 mL de solución de NaClO (0.88% m/v).

3. Presionar la espuma con una espátula para sumergirla en la solución de hipoclorito hasta quitar las burbujas de aire, 3 h después repetir el procedimiento (realizarlo 2 veces).
4. Mantener durante 24 h a TA, sin agitación y en oscuridad.
5. Decantar el hipoclorito y enjuagar con 20 mL de agua destilada agregándola sobre la espuma y agitar vigorosamente en forma circular por 1 minuto, para retirar el exceso de hipoclorito. Decantar.
6. Enjuagar con 20 mL de agua destilada, agitando a 125 rpm a TA durante 24 h.
7. Decantar el agua, filtrar la espuma por vacío durante 5 min (acoplar un matraz Kitasato a un embudo Büchner en el cual se coloca un papel filtro).
8. Colocar la espuma sobre una caja Petri cuadrículada y rotulada. Dejar secar en una estufa al vacío a 40 °C durante 48 h.
9. Pesar la espuma en una balanza analítica
10. Almacenar las espumas en tubos Eppendorf rotulados para posteriores análisis.

7.5 Obtención y concentración de proteínas extracelulares

El medio contiene PolyLack y almidón para el cultivo del hongo, estos interfieren con el proceso de concentración por lo que se montaron protocolos para cuantificarlos y eliminarlos.

7.5.1 Cuantificación de PolyLack y almidón

El PolyLack es un barniz base agua que además de poliéter poliuretano contiene aditivos (N-metilpirrolidona, isopropanol, 2-butoxietanol y dipropilen glicoles), al ser un líquido blanquecino turbio en el laboratorio de la Dra. Herminia Loza se logró montar un ensayo para la cuantificación de este barniz. Por medio de un barrido espectral se observó que es posible cuantificar el PolyLack a una longitud de onda de 400 nm (Itzel Gaytán, 2018 no publicado) (datos no mostrados).

1. Preparar alícuotas con un volumen final de 200 μL que contengan concentraciones conocidas de PolyLack (0 a 0.25%), utilizar dH_2O para llegar a ese volumen y se ponen en pozos de microplaca.
2. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL verter 20 μL de medio PB diluido al 50% y 180 μL de dH_2O (Blanco).
3. Para la muestra problema tomar del concentrado entre 15 y 20 μL y en un tubo Eppendorf de 0.6 mL aforar a 200 μL con dH_2O
4. Las muestras se leen a 400 nm colocando la microplaca en el espectrofotómetro para micro placas EPOCH, BioTeck®.

Para calcular el porcentaje de PolyLack remanente tomar como máxima concentración la muestra obtenida del medio PBPL sin inocular.

Almidón

El almidón proveniente del medio base utilizado que es caldo de papa (PB). En este caldo que resulta de hervir la papa se encuentra laxo el almidón por interacciones con proteínas, estando parcialmente disuelto. Es posible cuantificarlo por espectrofotometría con ayuda de reactivo Lugol, que es una solución de yoduro de potasio y yodo molecular, el cual forma cadenas de poliyoduro con la amilosa, que es un componente de cadena lineal del almidón, dispuesto en forma de hélice. Ahí se juntan las moléculas de yodo que cambian la capacidad de absorción lumínica del almidón, dando como resultado un color azul-negruzco, a esta unión se le denomina compuesto de inclusión.

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL verter 20 μL de Lugol y 180 μL de dH_2O (Blanco).
2. Para la muestra problema en tubo Eppendorf de 0.6 mL adicionar 20 μL de Lugol, 165 μL de dH_2O y 15 μL de muestra problema, como referencia del porcentaje inicial de almidón utilizar medio PBPL sin inocular.
3. Leer a 580 nm en el espectrofotómetro para micro placas EPOCH, BioTeck®.
4. Calcular el porcentaje de remanente con respecto al medio sin inocular

7.5.2 Obtención de las proteínas del SN

Para poder trabajar con las proteínas del SN es necesario concentrar lo más posible las muestras para poder realizar diversas pruebas. Por lo que fue necesario eliminar el PolyLack y el almidón que además como ya se mencionó interfieren con la cuantificación de las actividades enzimáticas.

PolyLack

Este barniz de poliuretano-acrílico líquido contiene 30% de sólidos, tomando esto en cuenta para la extracción del barniz, se realizó un protocolo en nuestro grupo de trabajo (Gaytán, 2018, no publicado), en el cual por ultracentrifugación los componentes sólidos del barniz (las moléculas insolubles y de mayor peso) precipitan, permitiendo su extracción sin afectar la actividad enzimática.

Almidón

El SDS (detergente tensoactivo aniónico) es capaz de romper los enlaces covalentes de las proteínas, liberando a las moléculas de almidón, provocando su precipitación. El SDS en solución tiene un punto de congelación entre 3 y 4 °C, por lo que al someter la muestra a estas temperaturas el reactivo precipita junto con el almidón. Sin embargo, debido a que el SDS desnaturaliza a todas las proteínas presentes en el SN es necesario re-naturalizarlas después del tratamiento con SDS, esto se puede llevar a cabo por medio de diálisis o con equipos de ultrafiltración.

1. Colectar el SN, aproximadamente 23 mL, incluyendo lo que se obtiene de exprimir la espuma, manteniendo el SN en hielo en todo momento a partir de su colecta. Centrifugarlo a 16,000 x *g* durante 12 minutos a 4 °C para eliminar conidias y restos de micelio presentes en el medio.
2. Ultracentrifugar el SN a 160,669 x *g* durante 1 h a 4 °C, descartar el pellet (PolyLack).

3. Verter la muestra en tubos Falcon de 50 mL y adicionar SDS (10%) para lograr una concentración final de 0.25%, almacenar en frío durante 9 h.
4. Centrifugar a 2,000 rpm en una centrífuga GS-GR-Beckman, rotor GH 3.7, durante 10 min a 4 °C. Descartar el pellet.
5. Concentrar por ultra filtración (Amicon) en dispositivos con membrana de corte de 20 kDa, realizando 3 lavados con buffer de fosfatos 50 mM pH 8, adicionando el doble de volumen del SN concentrado en cada lavado, hasta llegar a un volumen final entre 100 y 50 mL.
6. Concentrar el SN en centricones con un corte de 10 kDa hasta llegar a un volumen de alrededor de 5-2 mL.

Una vez concentradas las proteínas del SN se cuantificaba su concentración utilizando el método de Bradford.

1. Realizar una curva patrón para la cuantificación de proteína por el método de Bradford utilizando concentraciones conocidas de proteína, (se puede utilizar albúmina) desde 0.5 a 1.4 mg/mL.
2. En tubo Eppendorf de 1.5 mL adicionar 5 μ L de la muestra y llevar a 800 μ L con dH₂O.
3. Adicionar 200 μ L de reactivo de Bradford, agitar y dejar reposar a TA por 2 minutos.
4. Leer en espectrofotómetro a 595 nm.

Nota: Si la absorbancia es mayor a 0.8 hacer diluciones de la muestra y volver a cuantificar.

7.6 Cuantificación de la actividad ureasa y uretanasa

Para analizar la actividad enzimática es necesario cuantificar o la cantidad de producto formado o la cantidad de sustrato utilizado. La hidrólisis de la urea o el uretano da como resultado amonio y dióxido de carbono, por lo que es posible medir la actividad

enzimática cuantificando su producto de reacción, el amonio, en un tiempo determinado. El amonio en una solución básica en presencia de fenol y con la adición de nitroprusiato, forma indofenol, el cual es un cromóforo azul muy estable (Witte y Medina-Escobar, 2001). El método para medir la actividad uretanasa se adaptó y estandarizo en nuestro grupo de trabajo a partir del método para medir actividad ureasa (Fuentes, 2017, no publicado).

1. En tubo Eppendorf de 0.6 mL adicionar entre 10 y 20 μg de proteína (en máximo 199 μL , en caso de tener menos de 199 μL adicionar buffer fosfatos 50 mM pH 8 hasta el volumen requerido). Adicionar 1 μL de urea o etilcarbamato 5 M, dependiendo de la reacción a cuantificar, e incubar a 30 °C (Fase 1).
2. Tomar una alícuota de 66 μL a los 3 min de incubación, verterla en un tubo Eppendorf de 0.6 mL y adicionar 264 μL de agua desionizada.
3. Adicionar 33 μL de una solución de fenol/nitroprusiato (anexo 1) y posteriormente 66 μL de una solución de NaOH/hipoclorito (anexo 1) e inmediatamente cerrar. Posteriormente agitar en vortex 5 s y dejar en incubación por 30 min (Fase 2).
4. Tomar alícuotas de la reacción a los 6 y 9 minutos de incubación y procesar de acuerdo a los pasos 2 a 3.
5. Leer las muestras a 636 nm.

7.7 Análisis estadístico

Para analizar el efecto de las diferentes condiciones de cultivo probadas (1-3 espumas y 1-3 millones de conidias) sobre la degradación de las espumas y las actividades ureasa y uretanasa con miras de seleccionar la mejor, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de Tukey con una significancia de $p = <0.05$. En cuanto al índice de correlación fue calculado utilizando un scatter plot de “Case Wase Deletion of Missing Data” y el coeficiente de correlación de Pearson. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa “STATISTICA 10.

7.8 Aproximaciones a la purificación de las proteínas con las actividades ureasa y uretanasa

7.8.1 Determinación de pH y buffer óptimos

1. Para cada una de las reacciones se colocaron 10 μg de proteína
2. Como sustrato se utilizaron 0.1 M de urea (o uretano para cuantificar la actividad uretanasa).
3. Se utilizaron diferentes pHs para realizar los ensayos enzimáticos. Para ajustar el pH, se utilizó buffer McIlvaine, el cual es una mezcla de ácido cítrico y fosfato monobásico de sodio, la proporción de cada uno depende de el pH que se quiera utilizar, este buffer amortigua en un intervalo de pH entre 2.2 y 8.
4. Se siguió el protocolo descrito para la cuantificación de las actividades ureasa y uretanasa, sin embargo el buffer que se utilizó fue McIlvaine.
5. Se seleccionaron diversos buffers para realizar los ensayos enzimáticos. Se siguió el protocolo descrito para la cuantificación de las actividades ureasa y uretanasa, sin embargo en la fase 1 se cambió el buffer fosfatos por los buffers seleccionados (ligados del pH óptimo).

7.8.2 Determinación del comportamiento de la actividad ureasa con diferentes concentraciones de NaCl

1. Para cada una de las reacciones se colocaron 10 μg de proteína
2. Como sustrato se utilizaron 0.1 M de urea (o uretano para cuantificar la actividad uretanasa).
3. Se siguió el protocolo descrito para la cuantificación de las actividades ureasa y uretanasa, en la fase 1 del protocolo se utilizaron diferentes concentraciones de NaCl (0.1-1M) diluidas en el buffer fosfatos.

7.8.3 Eliminación del pigmento

Debido a que el SN contenía un pigmento secretado por el hongo, el cual produce interferencia con la purificación, fue necesario eliminarlo. Para ello se empleó una columna HiTrap Cpto Q de 1 mL, ya que se observó que el pigmento tiene una gran afinidad por las resinas tipo Cpto Q. Esto permitió posteriormente pasar la muestra por una columna de intercambio iónico para su purificación. La columna fue corrida en un equipo de cromatografía líquida Äkta Avant and UNICORN 6.1 (GE Healthcare Life Sciences, No. 28-981761AA) disponible en la USAII de la Facultad de Química-UNAM.

Preparación de la columna HiTrap

1. Preparar la jeringa con el adaptador “connector male fingertight 1/16 inch”.
2. Quitar la tapa de la columna y dejar caer unas gotas de agua sobre el orificio de entrada formando un menisco convexo.
3. Introducir lentamente la punta del conector por el centro del menisco, para sacar el aire que quedo bajo el menisco.

Lavado

4. Pasar dos volúmenes de columna (VC) de H₂O grado milli Q, filtrada.
5. Pasar un VC de NaCl 1 M.
6. Pasar cinco VC de H₂O grado milli Q, filtrada.

Elución de la muestra

7. Pasar diez VC de buffer fosfatos 50 mM pH 8 (para equilibrar).
8. Cargar la muestra (entre 5 y 10 mL). En caso de que la muestra tenga partículas suspendidas, se debe filtrar.
9. Pasar de 5 a 10 VC de buffer inicial.
10. Eluir con NaCl a 2 concentraciones: 250 y 450 mM.

Lavado

11. Pasar 10 VC de NaCl 2 M.
12. Pasar 10 VC de H₂O grado milli Q.

13. Colectar la muestra después de salir de la columna en Falcon de 50 mL, mantener la muestra en frío.

Almacenamiento de la columna

14. Pasar 5 VC de etanol al 20% (filtrado y con agua milli Q).

15. Dejarla con etanol y guardar en frío (no congelar).

16. Para desconectar el adaptador de la columna presionar ligeramente el embolo de la jeringa mientras se desatornilla el adaptador para que expulse un poco de agua y evitar que entre aire a la columna.

7.8.4 Cromatografía de intercambio iónico

La técnica de cromatografía de intercambio iónico permite separar una muestra dependiendo de su carga iónica. Se lleva a cabo en una columna que contiene una resina cargada de manera negativa o positiva (aniónica o catiónica). El proceso tiene dos fases, la fase estacionaria en la cual las moléculas de la muestra se adhieren a la resina y se retienen formando interacciones reversibles dependiendo de sus cargas, que pueden ser débiles o fuertes, y la fase móvil, en la que las moléculas se separan de la columna dependiendo de su carga. Generalmente se utiliza un gradiente de sales, en este caso de NaCl, debido a que las sales forman interacciones con los sitios de unión de las proteínas a la columna. Dependiendo si las interacciones entre las proteínas y la resina son fuertes, las primeras se desprenderán con una mayor concentración de NaCl, en caso de que las interacciones sean débiles, éstas eluirán con concentraciones bajas de NaCl. Se seleccionó una columna de intercambio aniónico 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 mmol Cl^- /mL medio. La columna fue corrida en un equipo de cromatografía líquida Äkta Avant and UNICORN 6.1 (GE Healthcare Life Sciences, No. 28-981761AA) disponible en la USAII de la Facultad de Química-UNAM.

1. Lavar la columna con agua desionizada y posteriormente activarla con el amortiguador de elución (buffer fosfatos 50 mM pH 8) con 10 veces el VC.
2. Cargar la muestra y lavar con el amortiguador de elución, adicionando 1 VC para que las proteínas que no interaccionen con la resina salgan de la columna.
3. Comenzar a pasar el gradiente de NaCl con una mezcla de las soluciones NaCl 1 M y el buffer de fosfatos 50 mM pH 8.
4. Colectar las fracciones y cuantificar la cantidad de proteína en intervalos de 5 fracciones y calcular la proteína para las fracciones contiguas tomando en cuenta la concentración de proteína de las fracciones cuantificadas cercanas.
5. Realizar geles SDS-PAGE al 10% y teñirlos con Coomassie para ver el patrón de proteínas y cuantificar la actividad ureasa en medio líquido.
6. Juntar y concentrar las fracciones que mostraron la actividad de interés.

7.8.5 Resolución de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

La electroforesis desnaturalizante (PAGE) es un método analítico semi-preparativo donde las moléculas cargadas migran bajo la influencia de un campo eléctrico. La migración depende de su carga, peso molecular y estructura. El SDS es un detergente aniónico que, cuando se utiliza en la electroforesis (SDS-PAGE), tiene la función de romper las interacciones no covalentes, confiriéndole a las proteínas una carga negativa, lo cual ayuda a que se dirijan al polo positivo y a que se separen de acuerdo a su tamaño (Laemmli, 1970).

1. Preparar el gel SDS-PAGE al 10% (anexo 1)
2. Cargar el primer pozo con 4 μ L de marcador molecular Precisión Plus Protein standards, Dual Color BIO-RAD.
3. Cargar 15 μ g de proteína con 5 μ L de amortiguador de carga y correr el gel en cámara de electroforesis con buffer de corrida (anexo 1) a 120 V.

4. Al término de la corrida, aproximadamente 2 h, fijar las proteínas y teñirlas con solución de Coomassie (anexo 1) por 12 h.
5. Desteñir el gel con solución de destinción (anexo 1) por 2 h para observar las bandas.

7.8.6 Zimografía para actividad ureasa y uretanasa

La zimografía es un método acoplado al SDS-PAGE que permite observar la presencia de diversas actividades enzimáticas *in situ* dependiendo del sustrato que se utilice. Lo que se observa puede ser la aparición de un producto o la desaparición del sustrato (Laemmli, 1970). Durante el proceso de purificación de una proteína, es necesario saber en dónde se encuentra la proteína con la actividad deseada, con esta técnica se puede identificar la ubicación de las proteínas que tengan la actividad de interés (ureasa y uretanasa) separándolas de las demás proteínas que se encuentren cerca. Para observar la actividad ureasa y uretanasa se utiliza la reacción del nitroazul de tetrazolio, el cual al reducirse genera formazán que tiene una coloración negra azulada, esta reducción se produce por una acidificación, debido a la ruptura del enlace urea o uretano que forma amoníaco (Mora *et al.*, 2005). El incremento de pH provoca la reducción del nitroazul de tetrazolio, por lo que en los sitios donde se hidroliza la urea, se observarán bandas negro-azuladas, producto de la liberación de H⁺. Para observar la actividad “uretanasa” se utiliza el mismo principio descrito anteriormente, sólo que, empleando al etilcarbamato como sustrato, dado que su ruptura también produce amonio.

1. Después de terminar la corrida en el PAGE, lavar el gel con agua desionizada, durante 10 min. Posteriormente incubar con Tritón X-100 al 25% por 40 min, realizando un cambio a los 20 min, con el propósito de renaturalizar las proteínas *in situ*.

2. Incubar por 1 h en amortiguador de acetatos 5 mM pH 6.5 frío con el objetivo de proporcionar las condiciones óptimas para permitir la actividad enzimática.
3. Revelar el zimograma agregando una solución con urea 0.1 M (sustrato), nitroazul de tetrazolio (indicador) 0.08% y DTT 0.5 mM (catalizador).

8. Resultados y discusión

Previo a la medición de las actividades enzimáticas de interés fue necesario desarrollar un protocolo para la obtención de las proteínas extracelulares a partir del sobrenadante del medio donde se cultivaba *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 en condiciones de bioestimulación, debido a que el medio de cultivo contenía barniz de PE-PU-A PolyLack (como bioestimulante) y almidón para sostener el crecimiento del hongo, lo que hacía muy complejo y tardado concentrar las proteínas. Inicialmente involucraba de 4 a 5 días de trabajo para eliminar el polímero y el almidón, los cuales formaban películas viscosas que tapaban los sistemas de ultrafiltración que se empleaban en el proceso. Consecuentemente, este largo período empleado en la concentración de las proteínas, afectaba negativamente la vida activa de las enzimas que se proponía medir. Por lo que fue necesario buscar métodos para eliminar el polímero y el almidón de una manera más rápida. Para determinar que los métodos de eliminación de PolyLack y almidón eran efectivos primeramente fue necesario establecer métodos para su cuantificación.

8.1 Determinación de las condiciones para la eliminación del PolyLack y del almidón del sobrenadante del medio de cultivo

8.1.1 Detección y cuantificación del PolyLack

Para determinar el consumo del barniz de PE-PU-A PolyLack utilizado como bioestimulante en el medio PB durante el cultivo del hongo, el SN se analizó espectrofotométricamente a 400 nm. La curva estándar se estableció utilizando diferentes concentraciones de PolyLack hasta un máximo de 0.25%, ya que esto es lo que se utiliza en el medio de cultivo, mostrando una tendencia lineal con una máxima absorbancia de 0.7 (Fig. 2).

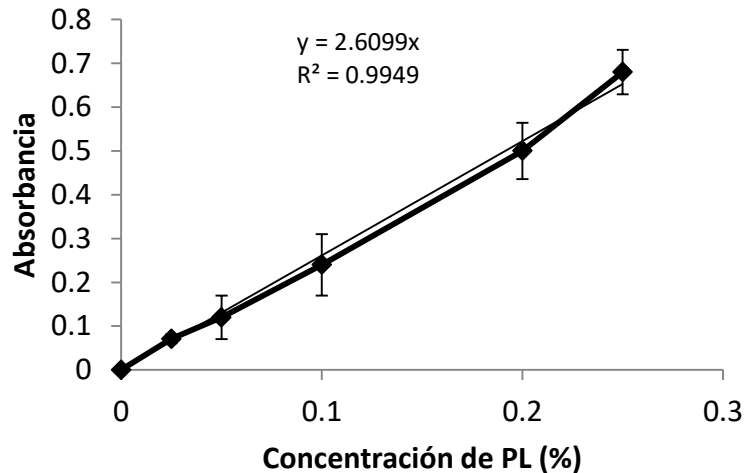


Figura 2. Curva estándar de PolyLack. La cuantificación de PL se realizó en medio PBPL con diferentes concentraciones del barniz. Las lecturas fueron realizadas a 400 nm. n=3

8.1.2 Detección y cuantificación del almidón

El almidón forma un complejo con el Lugol el cual puede ser detectado a longitudes de onda entre 550 y 590 nm, dependiendo de la concentración del lugol y de posibles interferencias presentes en el medio (Rodríguez-Sandoval *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2015), por lo que se decidió primero identificar la longitud de onda a la cual se observara la mayor absorción de luz del complejo almidón-lugol, en las condiciones de cultivo empleadas. La longitud de onda más adecuada se determina al comparar la lectura del compuesto en un intervalo amplio de longitudes de onda seleccionando aquella en la que se obtenga la mayor absorción (Acosta *et al.*, 2016). En las tres concentraciones de medio de cultivo probadas, la mayor absorción se detectó a 580 nm (Fig. 3).

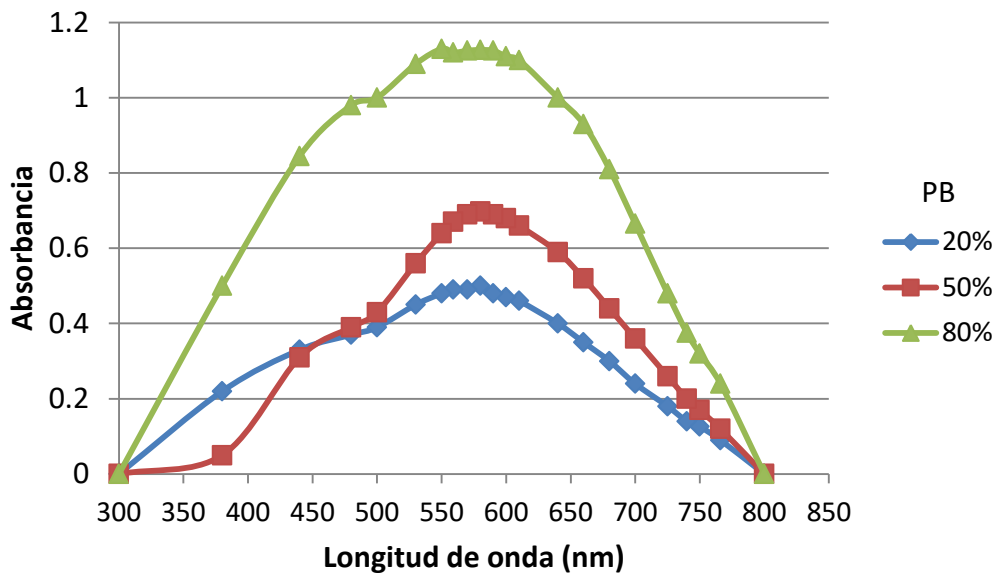


Figura 3. Barrido espectral del complejo almidón- lugol. Se emplearon tres diferentes concentraciones de medio PB. El máximo de absorbancia se observó a 580 nm. n=3.

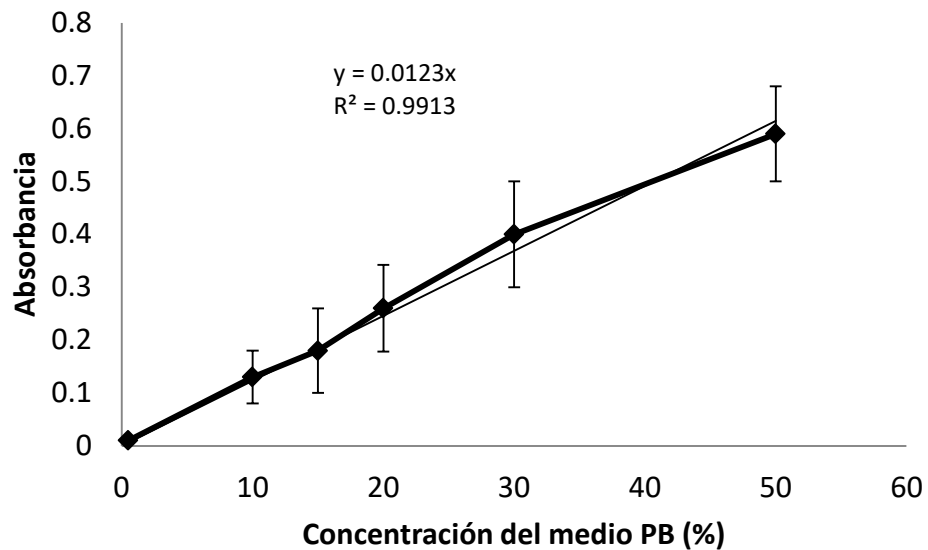


Figura 4. Curva estándar del complejo almidón-lugol cuantificado a 580 nm. n=3

Para cuantificar el complejo almidón-lugol se realizó una curva estándar con una dilución hasta 50% de medio PB ya que a mayores porcentajes se formaban precipitados que dificultaban la lectura espectrofotométrica de la muestra (Fig. 4). Esta curva de calibración no se realizó con almidón puro como estándar ya que en este trabajo se requiere conocer el porcentaje remanente de almidón en el medio, después de haber sido cultivado el hongo, por lo que se compara con el medio inicial sin haber sido inoculado obteniendo así el porcentaje de almidón remanente.

8.1.3 Análisis de consumo de PolyLack y almidón como fuente de carbono

Se cuantificó el PL y el almidón semanalmente durante los 21 días de cultivo, para determinar si el hongo utiliza ambos componentes y en qué porcentaje. La mayoría de los hongos presentan de dos a tres fases de desarrollo, la primera es el crecimiento inicial y se da en los primeros días donde se observa un crecimiento exponencial del micelio (Robinson, 1969). En la primera semana de cultivo de *C. tenuissimum* A3.I.1 en PBPL mostró una disminución del 80% de PL y de almidón (Fig. 5). Lo que indica que el hongo utiliza ambos componentes en la etapa de crecimiento exponencial. El consumo de PL y de almidón disminuyó un 10% más en la segunda semana de cultivo y se mantuvo sin cambios en la tercera semana.

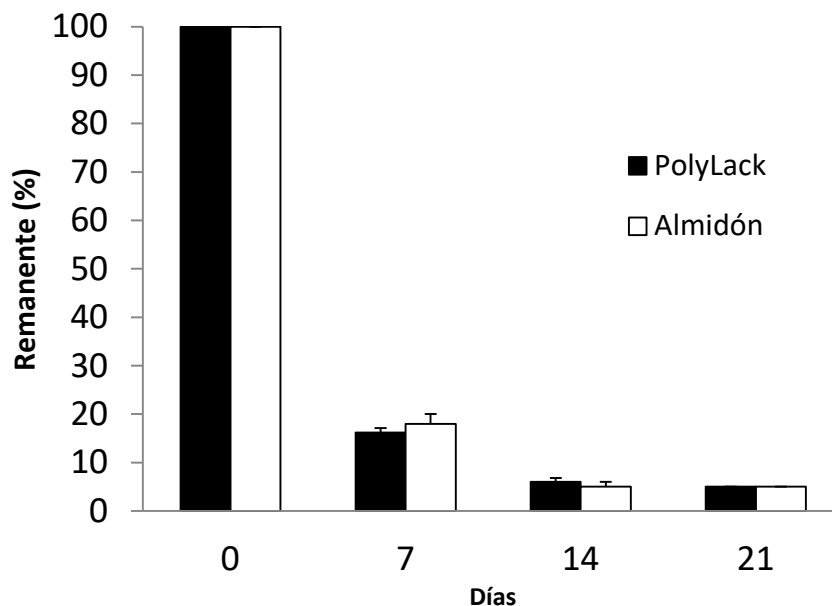


Figura 5. PolyLack y almidón remanentes en el sobrenadante de cultivos de *C. tenuissimum* A3.I.1 en medio PBPL. Cultivos inoculados con 1 millón de conidias en 1 espuma a 30 °C, incubados 14 días en agitación (200 rpm) y 7 días en estático. n=3

8.1.4 Eliminación de PolyLack por ultra centrifugación

El protocolo de ultracentrifugación para eliminación del PL fue probado con el SN del medio después de 21 días en cultivo con *C. tenuissimum* A3.I.1. Al término de los 21 días el sobrenadante contenía 5.0% de PL remanente y con el protocolo de eliminación se logró reducir en un 75% (Fig. 6). Otro factor importante de este método fue que la actividad enzimática no se vio afectada (datos no mostrados), logrando eliminarse un gran porcentaje de PL remanente en menor tiempo y sin afectar la actividad enzimática de interés.

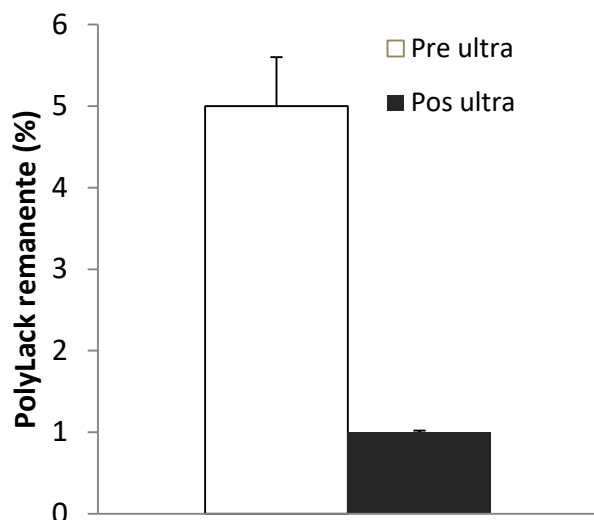


Figura 6. Eliminación de PolyLack de SN de cultivos de 21 días de *C. tenuissimum* en PBPL. Porcentaje de PolyLack remanente del SN, antes (pre ultra) y después (pos ultra) de ultracentrifugar a 160,669 x *g*. Se utilizaron cultivos de 21 días, incubados 14 en agitación (200 rpm) y 7 días en estático, con una espuma inoculada con 1 millón de conidias en medio PBPL. n=3

8.1.5 Eliminación del almidón por SDS

Para la eliminación del almidón se buscó un protocolo que fuera de utilización fácil, que eliminara la mayor cantidad de almidón en el menor tiempo posible y que no afectara la actividad enzimática. Se ha reportado eliminación de almidón de disoluciones con un 90% de eficiencia utilizando SDS al 1.0% (Wang *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2017). Sin embargo, en los casos reportados no se realizaron pruebas para medir actividades enzimáticas en las muestras. Debido a que el SDS es un detergente aniónico capaz de desnaturalizar a las proteínas es importante comprobar si las proteínas de interés son capaces de re-naturalizarse después del tratamiento con SDS y en qué porcentaje fueron afectadas. Por lo que se utilizaron concentraciones menores a 1.0% para buscar la concentración mínima requerida para eliminar el mayor porcentaje de almidón sin que afectara la actividad de las enzimas que se desea cuantificar. Este tratamiento se realizó después de eliminar el PL por ultracentrifugación como se describió anteriormente.

Al adicionar 1.0% de SDS en 25 mL de medio PBPL se observó una eliminación del 74% de almidón en comparación al medio sin SDS (Fig. 7). Al utilizar 0.1, 0.25 y 0.5% de SDS, el almidón fue eliminado en un 50%. Esta menor eliminación de almidón a menor concentración de SDS indica que se requiere más detergente para romper los enlaces que se forman entre las proteínas y el almidón, lo cual hace soluble al almidón (Debet y Gildey, 2006).

Para eliminar el complejo almidón-SDS la muestra se dejó reposar a 4 °C durante 9 horas para precipitarlo. Posteriormente fue eliminado por centrifugación y el SN se pasó por un sistema de ultrafiltración para eliminar todo el SDS, permitiendo la re-naturalización de las proteínas desnaturalizadas por el SDS con el fin de cuantificar las actividades ureasa y uretenasa.

Aunque al utilizar 1.0% de SDS se eliminó una importante cantidad de almidón (74%), las actividades ureasa y uretanasa se afectaron significativamente. La actividad ureasa disminuyó 33% y la actividad uretanasa 75% en comparación a la muestra que no fue tratada con SDS. Esto se puede deber a que al usar esta concentración de SDS, aún podría quedar detergente en la muestra después del tratamiento de renaturalización, por lo que quizá se requeriría más tiempo o más cambios de buffer para que las proteínas pudieran re-naturalizarse (Fig. 8). Con 0.5% de SDS la actividad ureasa disminuyó un 13%, y la actividad uretanasa un 50%. Con 0.1 y 0.25% de SDS la actividad ureasa se vio afectada solo un 6.0% y la actividad uretanasa en un 25%. Por lo tanto, se decidió utilizar 0.25% de SDS para llevar a cabo la eliminación de almidón.

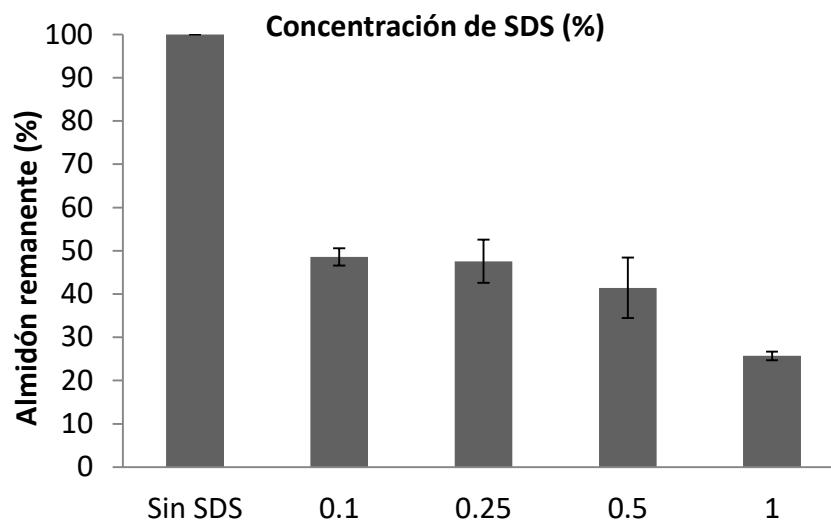


Figura 7. Almidón remanente después del tratamiento con diferentes concentraciones de SDS y centrifugación en frío. Se utilizó SN de cultivos de 21 días, incubados 14 días en agitación (200 rpm) y 7 días en estático, con una espuma inoculada con 1 millón de conidias en medio PBPL. Las muestras fueron previamente ultracentrifugadas para eliminar el PL. n=3

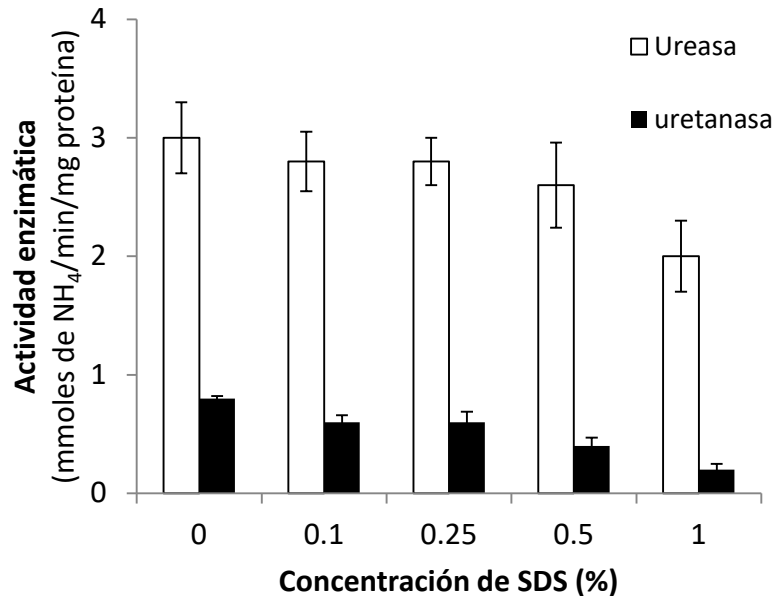


Figura 8. Actividades enzimáticas ureasa y uretanasa después de eliminar el PL y el almidón de cultivos de *C. tenuissimum* A3.I.1 en PBPL. Se utilizaron SN de cultivos de 21 días, incubados 14 días en agitación (200 rpm) y 7 días en estático, con una espuma inoculada con 1 millón de conidias. Las muestras fueron ultracentrifugadas para eliminar el PL y después tratadas con SDS posteriormente se eliminó el SDS y las actividades enzimáticas fueron medidas. n=3

8.2 Selección de las condiciones de cultivo de *C. tenuissimum* A3.I.1 para incrementar la degradación de espumas de PE-PU y las actividades enzimáticas ureasa y uretanasa

Con el propósito de encontrar las condiciones de cultivo de *C. tenuissimum* A3.I.1 en las que se pudiera incrementar la degradación de las espumas de PE-PU, la producción de proteína extracelular y las actividades enzimáticas ureasa y uretanasa, se probaron nueve condiciones de cultivo basadas en la condición determinada por González Hernández (2016) como la mejor en su análisis, y que consistía en cultivar al hongo en

25 mL de medio caldo de papa con PolyLack al 0.25% como bioestimulante (PBPL) y sometiendo una espuma, de un tamaño definido, a un inóculo de 1 millón de conidias y cultivando por 14 días en agitación y 7 días en estático. Las dos variables que se probaron en este estudio fueron el número de espumas, de 1 a 3, y la cantidad de inóculo, de 1 a 3 millones de conidias, por matraz de cultivo, las otras condiciones permanecieron constantes. El criterio para definir la cantidad de espumas a probar fue que estuvieran bien distribuidas en la superficie del medio de cultivo, ya que flotan, y que se mantuviera un espacio entre ellas para el movimiento durante el cultivo en agitación. La cantidad máxima de conidias inoculadas fue de tres millones en una espuma. Las conidias se repartían equitativamente inoculándose sobre las diferentes espumas en cada tratamiento. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

8.2.1 Cuantificación de la degradación de las espumas de PE-PU y de la cantidad de proteína extracelular.

En las condiciones con una espuma se observó la mayor degradación (63-67%), en las condiciones con 2 espumas se observó una degradación intermedia (46-52%), mientras que en las condiciones con 3 espumas se presentaron los niveles más bajos de degradación (15-20%), independientemente del número de conidias empleadas como inóculo (Fig. 9). El análisis de varianza de Tukey mostró diferencias significativas en función del número de espumas pero no en función de la cantidad de inóculo probado sobre una misma cantidad de espumas (Tabla 2), lo cual sugiere que la cantidad de

conidias inoculadas no es el factor determinante en la degradación de las espumas. Los bajos porcentajes de degradación en las condiciones con 3 espumas se vieron acompañados de un menor crecimiento del micelio sobre las espumas (Fig. 10), lo que podría indicar una limitación en el crecimiento del hongo dependiente de la cantidad de espumas en el medio.

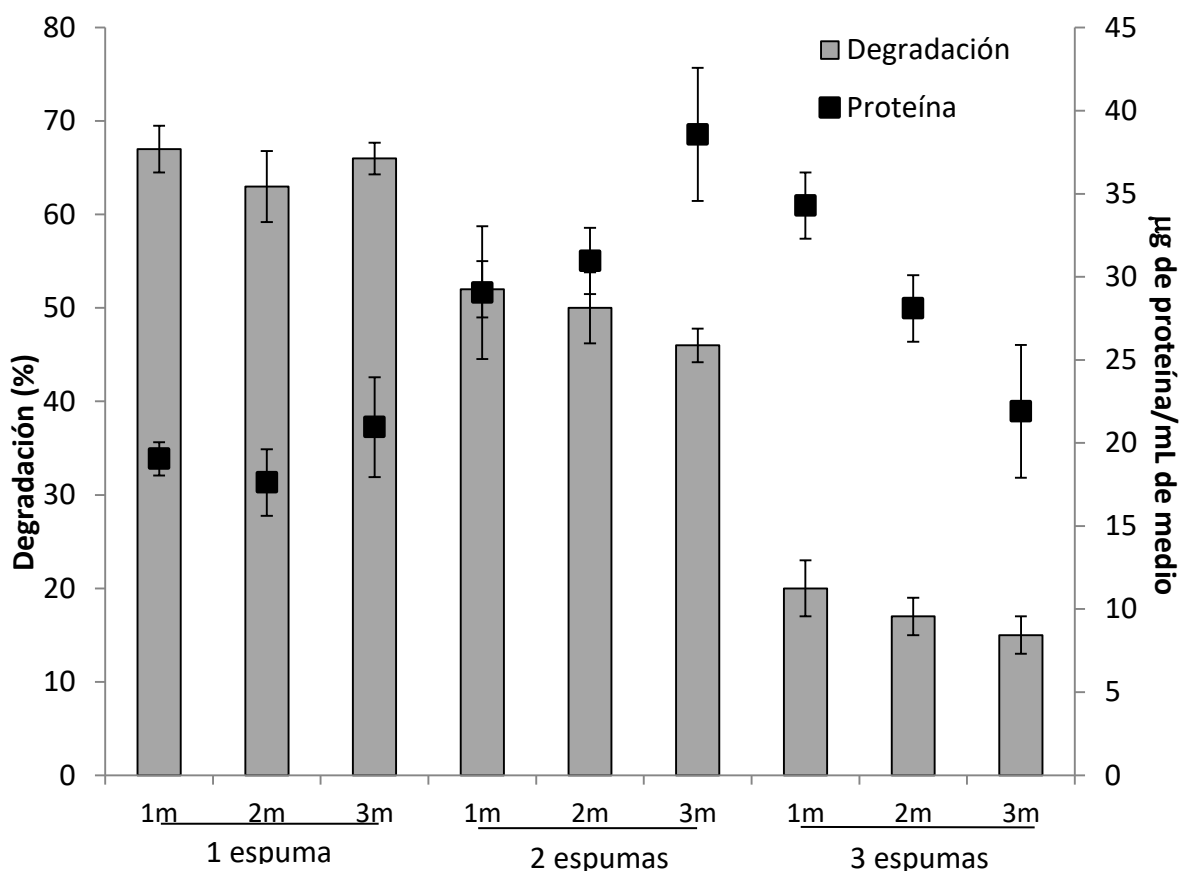


Figura 9. Degradación de espumas de PE-PU (barras) y cantidad de proteína extracelular (cuadros) en cultivos de *C. tenuissimum* A3.1.1, en las diferentes condiciones analizadas. Cultivos de 25 mL de medio PBPL por matraz conteniendo 1, 2 o 3 espumas e inoculados con 1 (1m), 2 (2m) o 3 (3m) millones de conidias fueron incubados por 14 días en agitación y 7 días en estático. n=3

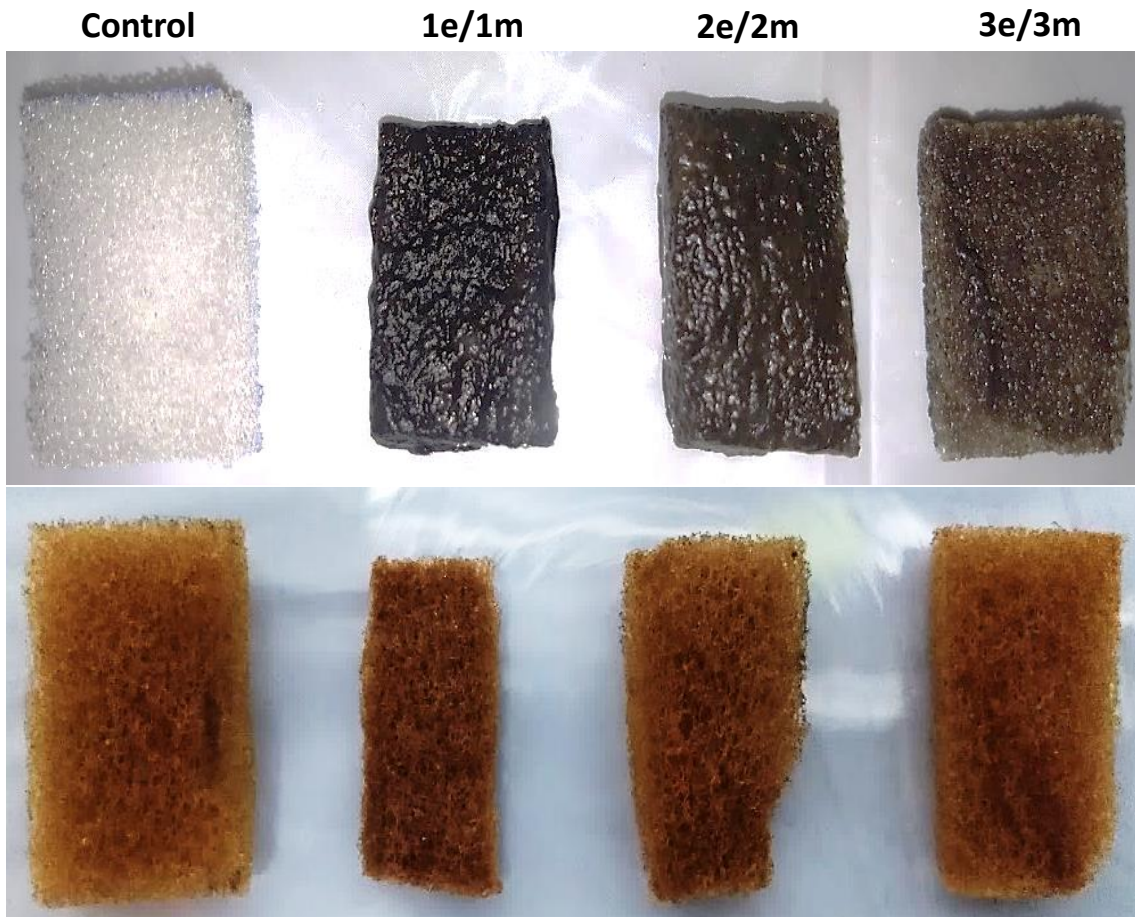


Figura 10. Efecto de *C. tenuissimum* A3.1.1 sobre las espumas de PE-PU, después del tratamiento con diferentes inóculos y espumas de PE-PU. Imágenes representativas de espumas de PE-PU cosechadas al término del cultivo (día 21) en medio PBPL, representando a tres de los nueve tratamientos probados, antes (imagen de arriba) y después (imagen de abajo) de la eliminación del micelio para cuantificar la degradación. 1e/1m: una espuma con un millón de conidias. 2e/2m: dos espumas con dos millones de conidias. 3e/3m: tres espumas con tres millones

Se han sugerido tres factores principales que influyen en la limitación de crecimiento de un organismo: 1) limitación en el espacio donde el organismo se desarrolla 2) liberación de metabolitos auto-inhbitorios o sustancias tóxicas al medio y 3) falta de nutrientes en el sistema (Gottlieb, 1971). Aunque en estos experimentos no se cuantificó el crecimiento del micelio en cada condición, el hecho de que en la condición con una

espuma y 3 millones de conidias el hongo degrade a la espuma de PE-PU tan bien como en la condición con una espuma y un millón de conidias, sugiere que el espacio no es el factor limitante para su desarrollo. En cuanto a la limitante por falta de alimento, este mismo ejemplo puede ser considerado como una prueba de que ésta no es la causa de la restricción. Sin embargo, la presencia de metabolitos auto-inhbitorios o sustancias tóxicas generadas por el metabolismo del hongo sobre las espumas de PE-PU si pudiera ser la razón del escaso desarrollo del micelio y por lo tanto de la escasa degradación observada en todos los tratamientos conteniendo 3 espumas.

Una observación que podría estar relacionada con este resultado fue que a mayor cantidad de espumas en el medio, se detectó una mayor cantidad de un pigmento color café amarillento/ámbar en el SN. Se ha reportado que el género *Cladosporium* produce melanina, pigmento que se produce en respuesta a estrés oxidativo o en respuesta a cambios en el ambiente y se ha sugerido que la presencia de melanina en la pared celular del hongo podría limitar la incorporación de los nutrientes o generar la formación de compuestos tóxicos durante su síntesis (Dadachova *et al.*, 2007). Por lo que, la disminución en la degradación de las espumas podría deberse a la presencia de sustancias tóxicas en el SN generadas en respuesta a la presencia de las espumas de PE-PU. La cuantificación de proteína extracelular presente en el SN del medio de cultivo en los distintos tratamientos mostró que en las condiciones con 1 espuma se presentaron los niveles más bajos de proteína extracelular (19 - 20 μg de proteína/mL), mientras que en las condiciones con 2 espumas se presentaron los mayores valores de proteína (29 - 38.5 μg de proteína/mL) y en las condiciones con 3 espumas las concentraciones de proteína en el SN disminuyeron conforme a la mayor cantidad de conidias en el inóculo (34 - 21.9 μg de proteína/mL de medio) (Fig. 9). La cantidad de proteína observada en los diferentes tratamientos no presenta una relación con la degradación de las espumas, como se supondría considerando que las proteínas del SN podrían tener capacidad degradativa sobre las espumas.

La mayor cantidad de proteína cuantificada en la condición con 2 espumas, podría estar relacionada con una mayor producción de pigmento observada en estas condiciones (dato no cuantificado, solo registro visual). La melanina absorbe entre 600-700 nm (Narea *et al.*, 2010), por lo que su presencia en el concentrado proteico obtenido del SN podría estar interfiriendo con la cuantificación de la proteína por el ensayo de Bradford a 595 nm. Mientras que la disminución en la condición con 3 espumas podría estar relacionada con el bajo crecimiento del hongo, donde se podría estar produciendo una menor cantidad de pigmento y/o proteínas.

De este análisis se concluye que las mejores condiciones para la degradación de las espumas de PE-PU por *C. tenuissimum* A3.I.1 fueron los cultivos en los que solo se incubó 1 espuma independientemente de la cantidad de conidias empleadas en el inóculo, además de que fue la condición que tuvo menor cantidad de pigmento.

8.2.2 Correlación entre la actividad ureasa, uretanasa y la degradación de espumas de PU

El criterio principal que se utilizó para la selección de la mejor condición de cultivo fue la degradación de las espumas y el segundo criterio fueron las actividades ureasa y uretanasa desplegadas durante el tiempo de cultivo ya que se proponen a estas enzimas como responsables en la degradación de las espumas. Por lo que se cuantificaron estas actividades enzimáticas en las diferentes condiciones de cultivo probadas.

Los niveles más altos de degradación de las espumas y de ureasa se presentaron en las condiciones 1e/1m y 1e/2m (3.6 y 3 U/mg de proteína respectivamente). En las condiciones con dos espumas tanto la degradación como la actividad ureasa fueron menores (2.4 U/mg de proteína y 50% de degradación). Mientras que los cultivos con 3 espumas presentaron la menor actividad degradativa y los niveles más bajos de actividad ureasa (entre 0.87 y 1.1 U/mg de proteína), con excepción de la condición

3e/3m en donde se observó una baja degradación, pero alta actividad ureasa (3 U/mg de proteína) (Fig. 11).

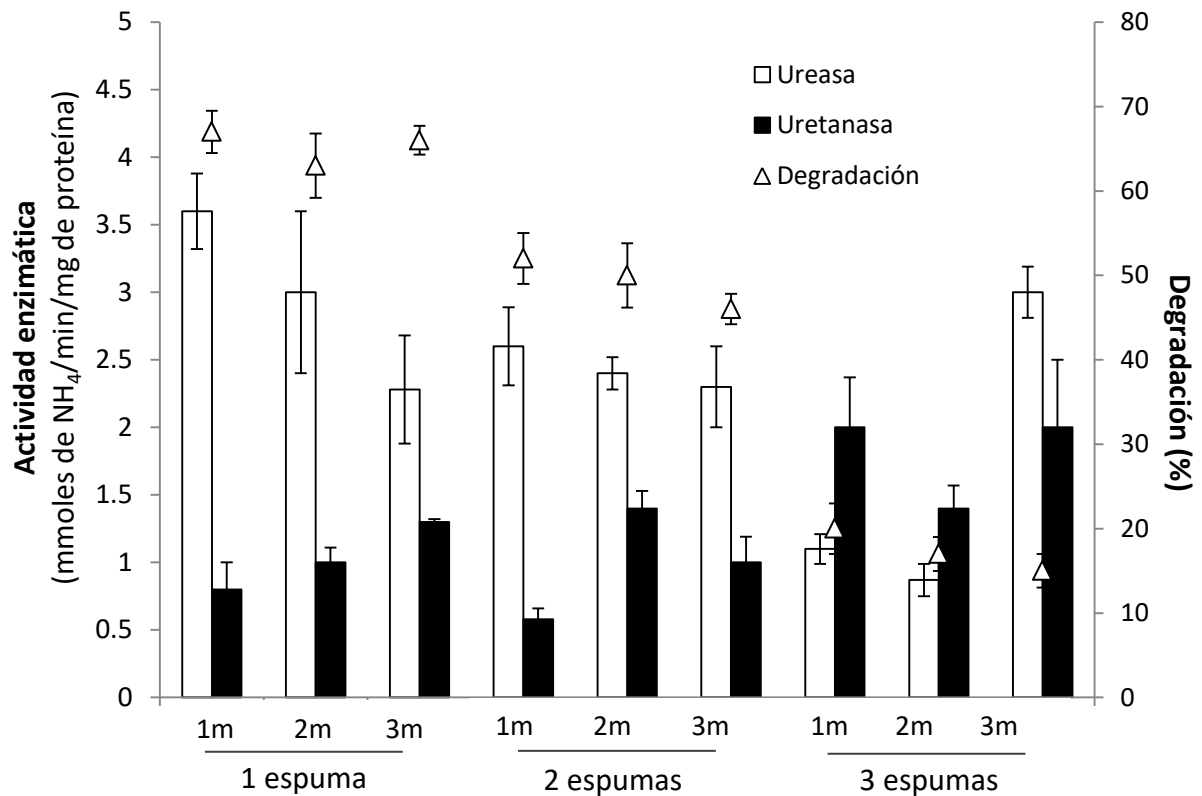


Figura 11. Actividades ureasa (barras blancas) y uretanasa (barras negras) de las distintas condiciones de cultivo probadas y su nivel de degradación de espumas (triángulos). Cultivos en medio PBPL incubados durante 21 días (14 en agitación y 7 en estático) a 30 °C, inoculados con 1, 2 y 3 millones de conidias y en los que se evaluaba la degradación de 1, 2 y 3 espumas de PE-PU. m= millones de conidias. n=3

Entre las condiciones con el mismo número de espumas no se observaron diferencias significativas entre la actividad ureasa o la degradación, de lo que se deduce que la cantidad de conidias empleada como inóculo no tuvo un efecto en la mayor degradación (Anexo 2).

La actividad uretanasa presenta una tendencia a ser inversamente proporcional a la actividad ureasa y también a la degradación, observándose que en las condiciones con 3 espumas se presentó una actividad uretanasa de 1.4 y 2 U/mg de proteína, casi el doble de la actividad observada en las condiciones con 1 espuma (0.84 - 1 U/mg de proteína). En las condiciones con 2 espumas tanto la actividad ureasa y uretanasa (2.3 - 2.6 y 0.6 - 1 U/mg de proteína respectivamente) como la degradación presentaron valores intermedios a los observados en las condiciones 1 y 3 espumas (46 - 50% de degradación) (Fig. 11).

Al analizar la correlación entre la degradación y las actividades ureasa y uretanasa, se encontró una $r=0.8$ entre la degradación y la actividad ureasa, mientras que entre la actividad uretanasa y la degradación se encontró una $r=-4$ (Tabla 2). Estos resultados sugieren que la actividad ureasa podría jugar un papel importante en la degradación de las espumas, quizá debido a su capacidad para romper enlaces urea que podrían estar presentes en la espuma o también porque algunas ureasas son capaces de romper el enlace uretano (Nan-di *et al.*, 2013). La actividad uretanasa no parece estar relacionada con la degradación de la espuma dado que presentó un coeficiente de correlación negativo. Asimismo, las actividades ureasa y uretanasa también presentaron una correlación negativa ($r=-0.4$) lo que sugiere que estas actividades corresponden a dos proteínas distintas.

Tabla 2. Correlación entre las variables de las nueve condiciones probadas

Índice de correlación (Casewise MD deletion)				
N= 27 p < 0.05				
Variable	Degradación	Ureasa	Uretanasa	
Degradación	1	0.79	-0.43	
Ureasa	0.79	1	-0.41	
Índice de correlación (Spearman Rank Order Correlations)				
N= 27 p < 0.05				
Variable	Degradación	Ureasa	Uretanasa	
Degradación	1	0.69	-0.49	
Ureasa	0.69	1	-0.4	
INTERPRETACIÓN				
	Positiva perfecta	Positiva	Negativa	Negativa perfecta
Correlación (r)	1	$0 > r < 1$	$-1 > r < 0$	-1

De todas las condiciones probadas, solo en dos de ellas se observó que la actividad ureasa no tuvo el comportamiento que se presentó en la mayoría de las otras condiciones, en donde a mayor actividad ureasa mayor degradación, estas condiciones fueron 1e/3m y 3e/3m. En la condición de 1e/3m se observó una elevada degradación de la espuma (66%) con un bajo nivel de actividad ureasa (2.28 U/mg de proteína), mientras que en las otras dos condiciones con 1 espuma se observaron valores de ureasa de 3 y 3.6 U/mg de proteína, con porcentajes de degradación semejantes.

Debido a que la única diferencia entre el tratamiento 1e/3m y los tratamientos 1e/1m y 1e/2m es la cantidad de conidias inoculadas, esto podría ser la razón de la diferencia. En el caso de la condición con 3e/3m, contrario a lo observado en la condición 1e/3m, se observó una alta actividad ureasa y uretanasa (3 y 2 U/mg de proteína respectivamente), que en las condiciones 3e/1m y 3e/2m, pero en todos los casos se presentaron niveles bajos de degradación de las espumas (15-20%). Se ha descrito que, en condiciones de falta de alimento o estrés, los hongos pueden llevar a cabo una producción excesiva de enzimas extracelulares buscando regular las sustancias nocivas en el medio para obtener la mayor cantidad de nutrientes posibles o pueden inducir autólisis generando disminución del peso micelial total, movilizando el nitrógeno de hifas viejas para el mantenimiento de hifas jóvenes y liberando el material citosólico al medio de cultivo (Cochrane, 1958). Estas dos condiciones junto con la condición 1e/1m, que fue la originalmente reportada por González (2016), fueron seleccionadas para realizar un análisis curso-temporal, midiendo semanalmente las actividades ureasa y uretanasa y evaluando la degradación de las espumas.

8.2.3 Cuantificación curso-temporal de las actividades ureasa y uretanasa de las tres condiciones de interés (1e/1m, 1e/3m, 3e/3m)

En la condición de 1e/1m, la mayor producción de ureasas y uretanosas se presentó a los 21 días de cultivo con 3.5 y 0.8 U/mg de proteína respectivamente (Fig. 12a) y una degradación de la espuma cuantificada a los 21 días, de 68% de pérdida de peso. La condición 1e/3m presentó los mayores niveles de actividad ureasa (4.3 U/mg de proteína) a los 14 días de cultivo (Fig. 12b), siendo un 32% mayor que la observada a los 21 días (3 U/mg de proteína) y la degradación de la espuma a los 21 días fue de 63% de pérdida de peso. Este comportamiento parece estar relacionado con la cantidad de tejido que se genera cuando se inocula con mayor número de conidias. En estas dos condiciones la actividad uretanasa fue incrementando paulatinamente hasta los 21 días

de cultivo (1.5 U/mg de proteína máximo en la condición 1e/3m), pero siempre fue menor que la actividad ureasa. En la condición de 3e/3m se observó la máxima actividad ureasa a los 14 días de cultivo (3 U/mg de proteína), un 20% mayor que la observada a los 21 días. Sin embargo, en esta condición la actividad uretanasa (2.9 U/mg de proteína) fue casi el doble de la observada en las condiciones anteriores (Fig. 12c), sugiriendo la existencia de algún factor que estimula la producción de esta enzima, posiblemente en respuesta al estrés del hongo. Sin embargo, la degradación de la espuma fue muy baja (12%).

De este experimento se pudo concluir que el incremento en la cantidad de inóculo acelera el crecimiento del hongo sobre la espuma en comparación a los cultivos con menos conidias por lo que fue posible observar una mayor actividad enzimática a menores tiempos de cultivo cuando se usa más inóculo, siempre que no exista limitación del crecimiento del hongo por factores externos.

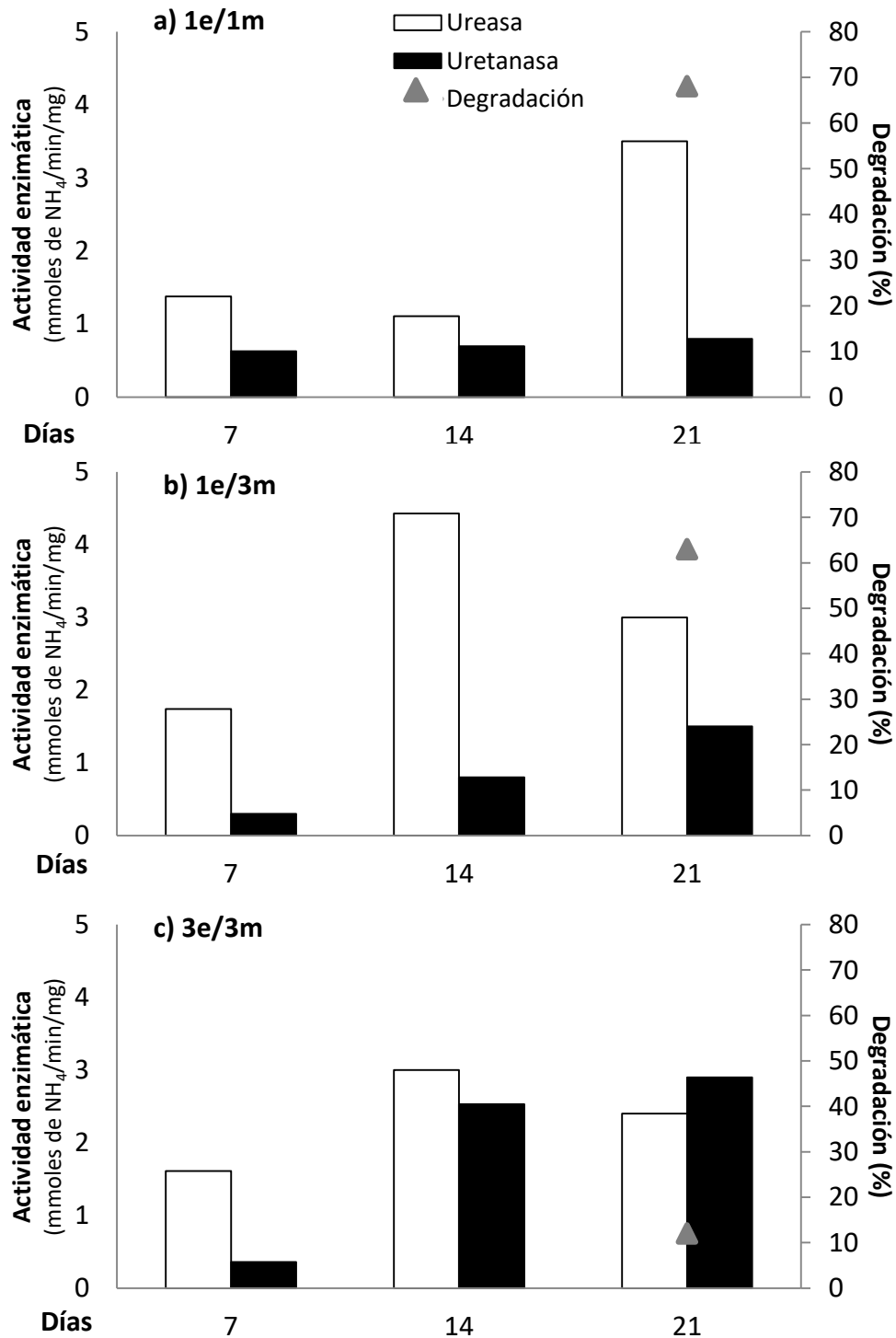


Figura 12. Cuantificación de las actividades ureasa (barras blancas) y uretanasa (barras negras) y degradación de la espuma de PE-PU (triángulos) de las tres condiciones seleccionadas. Se utilizó medio PBPL en cultivos incubados durante 21 días (14 en agitación y 7 en estático) a 30 °C. n=2

8.2.4 Efecto de recambiar el medio de cultivo en la degradación de espumas de PE-PU y en las actividades enzimáticas ureasa y uretanasa en las tres condiciones de interés.

A partir de los primeros resultados obtenidos (Fig. 11) se observó que a mayor cantidad de espumas el crecimiento del hongo y la degradación de la espuma eran menores, independientemente de la cantidad de conidias empleadas como inóculo. Así, en las condiciones con dos y tres espumas la degradación disminuyó un 10 y 30% respectivamente, en comparación con la condición en donde se empleó solo una espuma, sugiriendo la presencia de alguna limitante que afecte la actividad degradativa. Con base en esta posibilidad, se decidió explorar si al recambiar el medio de cultivo durante el tiempo de incubación (7 y/o 14 días), se podría lograr aumentar la degradación en las condiciones con mayor número de espumas. Para ello, se realizaron experimentos en las tres condiciones previamente seleccionadas, 1e/1m, 1e/3m y 3e/3m, manteniendo las mismas condiciones de cultivo previamente descritas, dos semanas en agitación y la última semana en cultivo estático.

En la condición inicialmente probada por González-Hernández (1e/1m), la degradación disminuyó ligeramente en un 6.0% al realizar un recambio a los 14 días y un 11.7% al realizar dos recambios de medio, mientras que la actividad ureasa disminuyó un 31% con un recambio a los 14 días de cultivo y 73% con dos recambios. La actividad uretanasa no fue afectada por el recambio a los 14 días, incluso aumentó, mientras que dos recambios generaron una disminución de un 30% (Fig. 13a). En la condición 1e/3m al realizar uno o dos recambios la degradación bajo un 4.5%. Con un recambio a los 14 días la actividad ureasa no disminuyó, incluso aumentó ligeramente, pero con dos recambios disminuyó un 74%. La actividad uretanasa no fue afectada por un recambio de medio a los 14 días, mientras que con dos recambios se produjo una disminución de un 29% (Fig. 13b). En la condición 3e/3m no fue posible evaluar el efecto de un recambio a los 14 días de cultivo debido a contaminación, pero con dos recambios de

medio, la degradación de las espumas alcanzó un 60% de pérdida de peso, semejante a los otros tratamientos, siendo cinco veces mayor que la degradación obtenida en cultivos sin recambios (12%). A pesar de estos altos niveles de degradación y del crecimiento del micelio sobre la espuma, la actividad ureasa fue 30% menor en comparación con los dos recambios de medio de cultivo. De manera interesante la actividad uretanasa fue la más alta observada a los 14 días con un recambio (1.9 U/mg de proteína) y a los 21 días con dos recambios (0.75 U/mg de proteína) comparada con las otras condiciones (Fig. 13c). A pesar de que la actividad ureasa fue baja en la condición 3e/3m, a los 21 días de cultivo se observó una degradación semejante a las otras condiciones, lo que sugiere que además de las actividades enzimáticas extracelulares ureasa y uretanasa, otros factores, como el crecimiento del micelio podrían estar involucrados en el daño a la espuma. El incremento en la degradación y el crecimiento del hongo sobre la espuma en la condición 3e/3m con dos recambios, sugiere que la presencia de alguna sustancia tóxica o inhibitoria en el medio está interfiriendo con el crecimiento del hongo y al eliminarla deja de ser la limitante del crecimiento. Sin embargo, debido a que las distintas pruebas realizando recambios en esta condición no incrementaron la actividad ureasa, se descartaron como condiciones óptimas para la purificación de las proteínas de interés del SN. De manera general, la disminución de las actividades enzimáticas observada en las condiciones con recambio comparadas con la condición sin recambio podría explicarse por la eliminación de las enzimas presentes en el SN debido al recambio del medio en la primera, segunda o en las dos semanas.

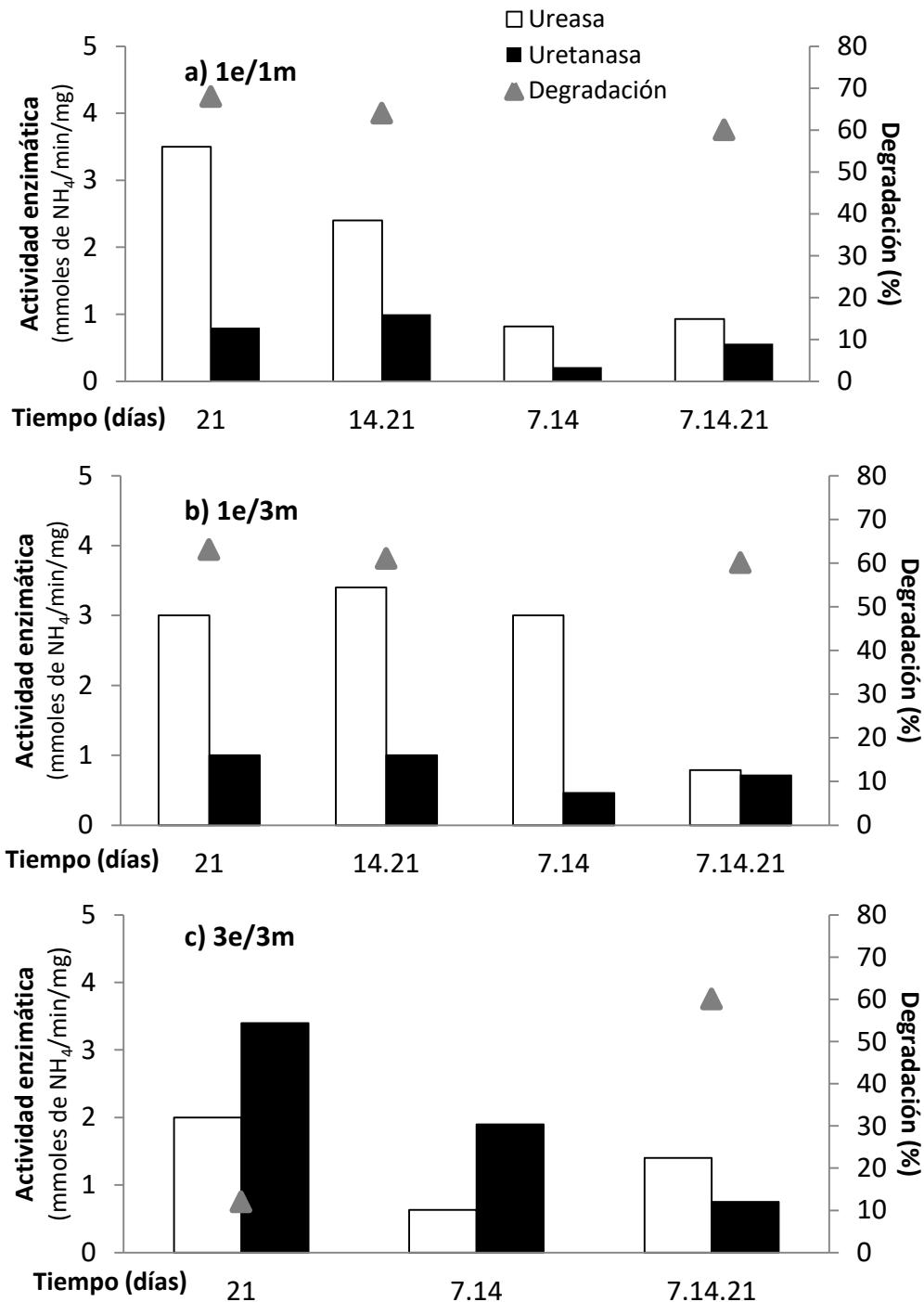


Figura 13. Cuantificación de las actividades ureasa y ureanasa de los cultivos con recambios. Medición de las actividades ureasa (barras blancas) y ureanasa (barras negras) de las 3 condiciones seleccionadas y su degradación (triángulos). Cultivos en medio PBPL, incubados durante 21 días (14 en agitación y 7 en estático) a 30 °C. Realizando recambios por completo al medio (al día 14; 14.21; al día 7; 7.14; al día 7 y 14; 7.14.21; y sin recambios; 21). n=2

8.2.5 Selección de la condición adecuada para la purificación de las proteínas de interés

De los resultados obtenidos en todos los experimentos anteriormente descritos se observa que las condiciones con 2 y 3 espumas presentaron porcentajes de degradación de espuma menores al 60% y bajas actividades ureasa y uretanasa en el SN (3.5 y 0.8 U/mg de proteína respectivamente) por lo que fueron descartadas como condiciones adecuadas para la purificación de estas enzimas. Sin embargo, en la condición de 1e/3m de algunos de los tratamientos probados produjeron alta degradación de las espumas e incrementaron las actividades enzimáticas de interés, por lo que la mejor condición se seleccionó a partir de esos tratamientos (Tabla 4). En estos tratamientos se observó que al realizar dos recambios de medio de cultivo disminuye la degradación de la espuma y las actividades de interés en comparación con la condición inicial, además de que requiere de una mayor manipulación del cultivo. Por otro lado, en las condiciones con un recambio, aunque no se obtuvieron datos de pérdida de peso de la espuma, se observaron ligeros incrementos en la actividad ureasa y de la actividad uretanasa con respecto a la condición inicial. Por otro lado, cuando se analizó la condición a 14 días de cultivo sin recambio de medio, se observó una ligera disminución de 1.7% de pérdida de peso de la espuma en comparación con los cultivos de 21 días, pero la actividad ureasa fue más alta (4.4 U/mg de proteína) siendo la mayor actividad registrada de todas las pruebas realizadas, aunque la actividad uretanasa fue menor en 0.2 U/mg de proteína que la condición inicial. Esta condición fue la que se seleccionó para continuar con la caracterización de las actividades enzimáticas de interés, pues además se obtienen los resultados deseados en un tiempo de incubación de dos semanas en vez de tres.

Tabla 3. Resultados observados en las pruebas de recambio realizadas para la condición 1e/3m.

Pruebas	14	21	14.21	7.14	7.14.21
Degradación (%)	62	63.7	-	-	55.8
Proteína (µg/mL de medio)	19	21	18	14	12.4
Actividad ureasa (U/mg)	4.4	3	3.4	3	0.7
Actividad uretanasa (U/mg)	0.8	1	1	1	0.7

8.3 Análisis de degradación de espumas de PE-PU

Se compararon las estructuras de las espumas por microscopía electrónica de barrido de la condición seleccionada, 1e/3m 14 días de cultivo sin recambio de medio, con la condición inicial, 1e/1m, 21 días de cultivo sin recambio de medio, establecida previamente por González-Hernández (2016). En la condición de 1e/1m se observó un adelgazamiento de las fibras, además de la apertura de surcos entre las microfibras (Fig. 14). A los catorce días de cultivo con la condición de 1e/3m se observaron los mismos daños a las fibras de la espuma que la condición con un millón de conidias en tres semanas de cultivo. La presencia de rupturas en la red de fibras, el adelgazamiento de las fibras y la apariencia de que la estructura está derretida son algunos daños reportados para espumas de PE-PU tratadas con hongos (Matsumiya *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2012); aunque en ese trabajo solo se logró una pérdida del 27% de peso de la espuma en 10 semanas.

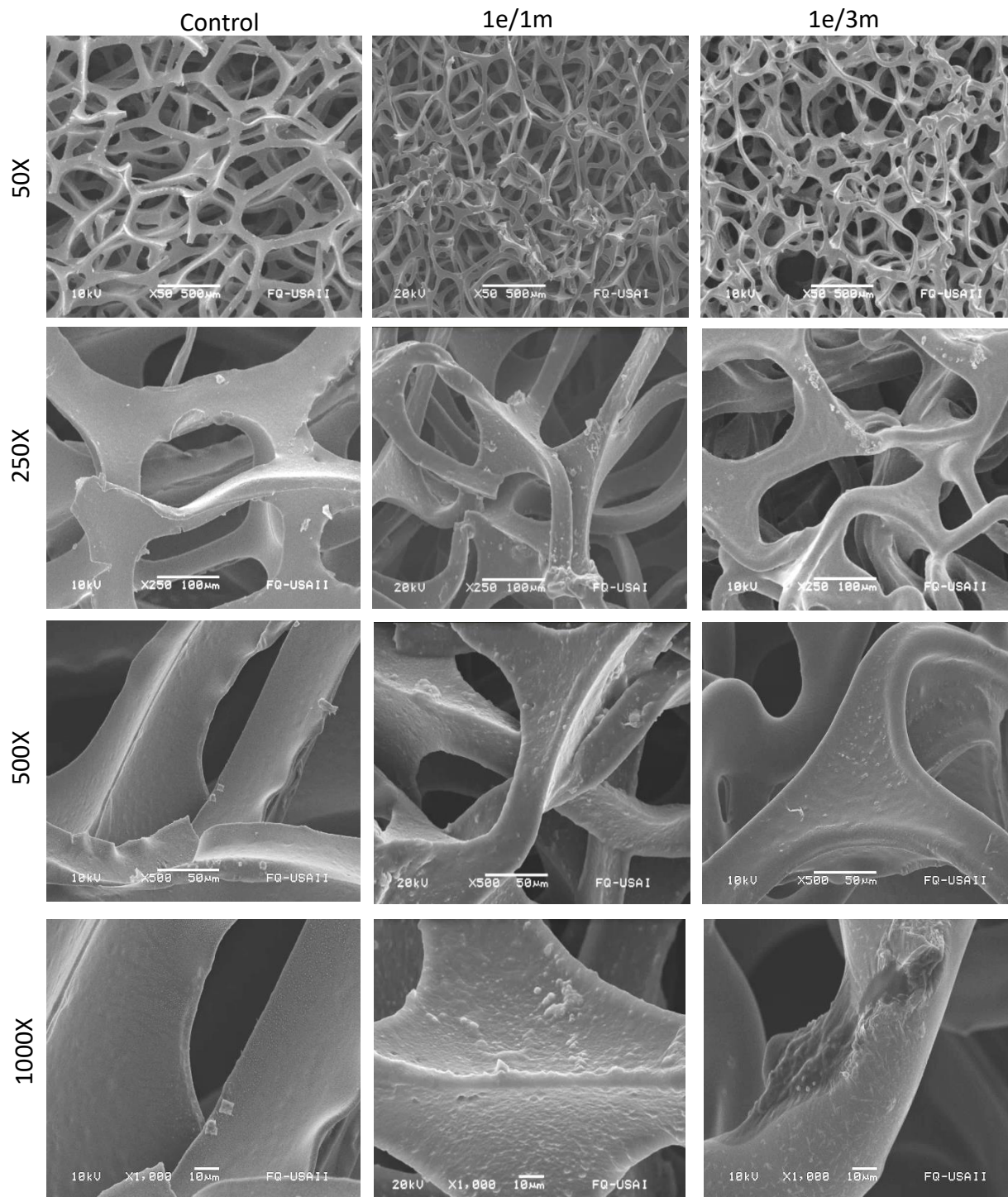


Figura 14. Microfotografías de espumas de PE-PU tratadas con el hongo *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. Espumas de PE-PU en cultivos en medio PBPL. Control, espumas sin inocular incubadas 21 días (14 en agitación y 7 en estático) a 30 °C, 1e/1m, espumas inoculadas con 1 millón de conidias incubada 21 días (14 en agitación y 7 en estático) a 30 °C (González-Hernández, 2016), 1e/3m, espumas inoculadas con 3 millones de conidias incubada 14 días en agitación a 30 °C. n=2.

8.4 Caracterización de las actividades ureasa y uretanasa

Una vez seleccionada la mejor condición de cultivo de acuerdo a los criterios establecidos, se realizó una caracterización preliminar de la actividad ureasa y uretanasa, buscando las condiciones óptimas a las que estas enzimas trabajan, para sentar las bases para su posterior purificación.

8.4.1 Identificación del pH óptimo para la medición de las actividades ureasa y uretanasa

El pH tiene una gran influencia sobre la acción de las enzimas, debido a que la actividad catalítica está relacionada con el estado iónico del sitio activo por lo que las variaciones del pH pueden provocar cambios en la estructura de la enzima llegando en algunos casos a desnaturalizarla. Para identificar el pH óptimo al que trabajan las enzimas con actividades ureasa y uretanasa se realizó un barrido de pH utilizando buffer McIlvaine debido a su amplio espectro.

Las ureasa presentaron la mayor actividad entre pH 7.0 y 9.0, siendo a pH 8.0 donde se observó el óptimo con 2.93 U/mg de proteína (Fig. 15). Para ureasas de plantas (*Canivalio ensiformis* y *Glycine max*) y de bacterias (*Helicobacter pylori*, *Klebsiella aerogenes*) se han reportado pHs óptimos entre 7.0 y 7.5 (Reyes *et al.*, 2016), y para hongos (*Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger*, *Coccidioides immitis*) los pHs óptimos están entre 7.5 y 8.5 (Mobley *et al.*, 1988; Smith *et al.* 1993; Mirbod *et al.*, 2002). Para uretanasa el intervalo de mayor actividad fue entre 6.0 y 8.0 con el óptimo a pH 7.0, el cual se encuentra en el rango de pH reportado para uretanasa identificadas en algunas bacterias (*Rhodococcus equi*) y hongos (*Penicillium variable*) siendo entre 5.5 y 7.0 (Akutsu-Shigeno *et al.*, 2006; Nan-di *et al.*, 2013)

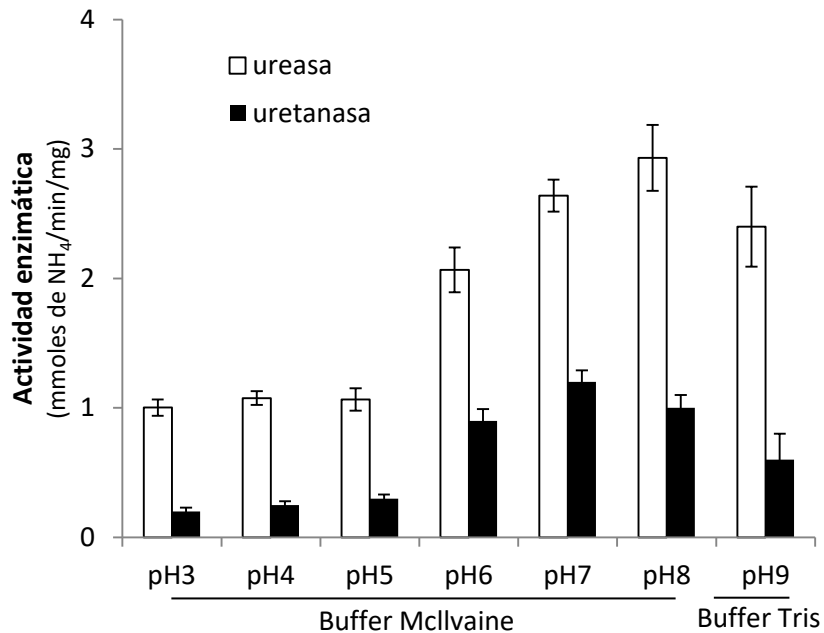


Figura 15. Efecto del pH en las actividades ureasa y uretanasa extracelulares de *Cladosporium tenuissimum* A3.1.1. Para las pruebas de pH 3.0 a 8.0 se utilizó buffer Mcllvaine 50 mM, para pH 9.0 se utilizó buffer Tris 50 mM. Cultivos en medio PBPL incubados durante 14 días en agitación a 30 °C. n=3.

8.4.2 Identificación del buffer óptimo para el incremento de las actividades ureasa y uretanasa.

Otro criterio importante en la caracterización de las actividades enzimáticas es el tipo de buffer que se emplea en el ensayo, debido a que ciertos compuestos pueden interferir con la carga de la proteína o de sus sitios activos. Esta prueba se realizó al pH óptimo de cada enzima (ureasa, pH 8.0; uretanasa, pH 7.0). La mayor actividad para ureasa se observó con el buffer de fosfatos pH 8.0. Con el buffer Mcllvaine y el buffer Tris se observó un 40% menos actividad ureasa, mientras que con el buffer Hepes se observó un 85% menos que en la condición óptima. La actividad uretanasa también fue óptima

en el buffer de fosfatos a pH 7.0, observándose un 58% menos actividad en buffer Macllvaine a pH 7.0. En Tris y en Hepes a pH 8 la actividad no fue detectada (Fig. 16).

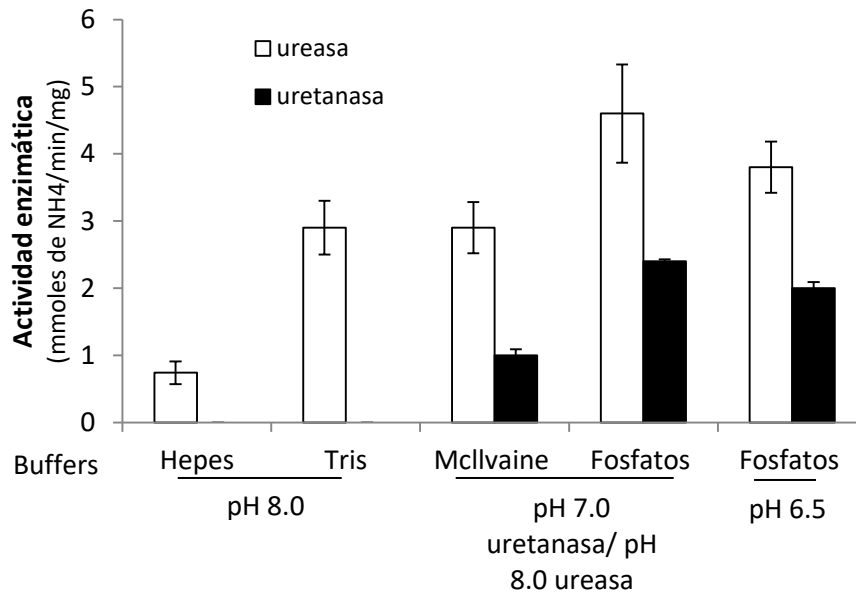


Figura 16. Efecto de diferentes buffers en la cuantificación de las actividades ureasa y uretanasa extracelulares. Para la actividad ureasa (barras blancas) los buffers se ajustaron a pH 8.0 y para la actividad uretanasa (barras oscuras) se utilizó buffer Tris y Hepes a pH 8 y los buffer fosfatos y Mcllvaine a pH 7.0. Todos los buffers se utilizaron a una concentración 50 mM. Cultivos en medio PBPL incubados durante 14 días en agitación a 30 °C. n=3

8.4.3 Efecto del NaCl sobre la actividad ureasa

Debido a que para la purificación de las actividades ureasa y uretanasa se empleará la cromatografía de intercambio iónico, en la cual las proteínas deben ser eluidas por la adición gradual de NaCl, se decidió probar si las actividades de interés podrían ser afectadas por diferentes concentraciones de este compuesto. Desafortunadamente, por contratiempos experimentales solo fue posible analizar el efecto del NaCl sobre la

actividad ureasa. Las sales de iones monovalentes tienen un efecto negativo sobre ciertas proteínas ya que incrementan las interacciones hidrofóbicas, lo que deriva en la insolubilización de la proteína provocando que no sea capaz de reconocer a su sustrato (Shiau y Chen, 1996). La actividad ureasa disminuyó un 15% en NaCl 0.1 M y 0.2 M, a partir de 0.4 M la actividad enzimática disminuyó un 40% llegando a disminuir hasta 75% a NaCl 1 M (Fig. 17). Sin embargo incluso con 1.0 M de NaCl, la actividad no se abatió por completo, por lo que se puede utilizar esta sal en la purificación de la muestra sin perder totalmente la actividad ureasa.

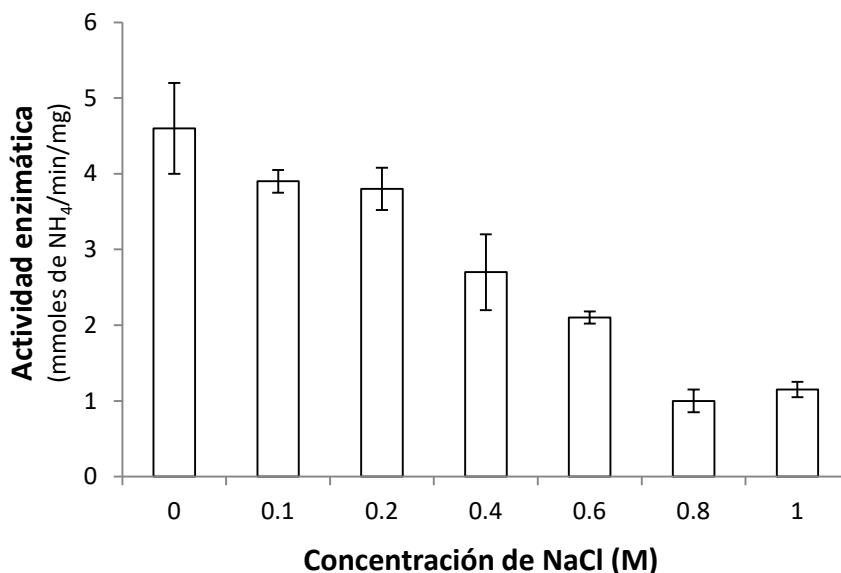


Figura 17. Efecto del NaCl sobre la actividad ureasa extracelular de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1. La medición de la actividad se llevó a cabo en buffer de fosfatos, 50 mM, pH 8.0, con las concentraciones de NaCl indicadas en la figura. Cultivos en medio PBPL incubados durante 14 días en agitación a 30 °C. n=3

8.5 Purificación de las proteínas con actividades ureasa y uretanasa

Se realizaron algunos ensayos preliminares para la purificación de las proteínas de interés por cromatografía de intercambio iónico. Se inyectó el concentrado proteico del sobrenadante en una columna de intercambio aniónico donde se fraccionó la muestra dependiendo de la concentración de sal a la que las proteínas eluían. Después de esto, se identificaron las fracciones con actividad ureasa y uretanasa, para posteriormente analizar su grado de purificación por electroforesis en geles de poliacrilamida y zimografías para ureasa.

Como se había mencionado previamente, estos hongos producen melanina y posiblemente compuestos fenólicos, los cuales generan una pigmentación ámbar en el SN. Para poder pasar la muestra por la columna es necesario concentrar el SN de 600 mL a menos de 10 mL, lo que consecuentemente genera que el pigmento se concentre dándole a la muestra una coloración café oscura. Después de pasar el SN por la columna, se observó que la mayor cantidad de pigmento quedó adherido a la resina y permaneció unido a pesar de inyectarle NaCl 2.0 M. El pigmento que no se adhirió a la columna eluyó a partir de 600 mM. En las fracciones donde se encontró el pigmento se obtuvieron las mayores absorbancias a 280 nm, lo que sugirió que esos altos valores quizá no fuera debidos a proteínas sino a que el pigmento podría estar absorbiendo a esa longitud de onda (Fig. 18). La cuantificación de proteínas por el método de Bradford, confirmó esta sospecha ya que en esas fracciones la cantidad de proteína era muy baja, además de que no se encontró actividad ureasa ni uretanasa en ellas (Fig. 19). Gracias a este comportamiento del pigmento durante la cromatografía, fue posible eliminarlo de las fracciones que si presentaron actividad uretanasa y/o ureasa.

Una vez inyectada toda la muestra a la columna y antes de iniciar el gradiente de NaCl, se realizó un lavado en el que eluyen las proteínas que no se unieron a la resina, las

cuales constituyen las fracciones no unidas (FNU). En estas fracciones y hasta las que eluyeron con 300 mM de NaCl (FNUs a 1E12), se detectó actividad ureasa, mientras que la actividad uretanasa se presentó únicamente en las fracciones que eluyeron entre 30 y 300 mM de NaCl (Fr. 1B12 a 1D5). La distribución de las actividades ureasa y uretanasa en la purificación confirman la presencia de dos diferentes proteínas responsables, donde la que presenta actividad ureasa no se une a la columna, mientras que la uretanasa tiene una unión débil. Las fracciones de FNU1 a 1B5 presentaron la mayor actividad ureasa (2.7-2.8 U/mg de proteína). Por otro lado, en las fracciones donde se detectó actividad uretanasa, también se observó actividad ureasa, aunque menor que en las fracciones anteriormente mencionadas, lo cual sugiere que la proteína con actividad uretanasa, también podría tener actividad ureasa (Fig. 18, 19).

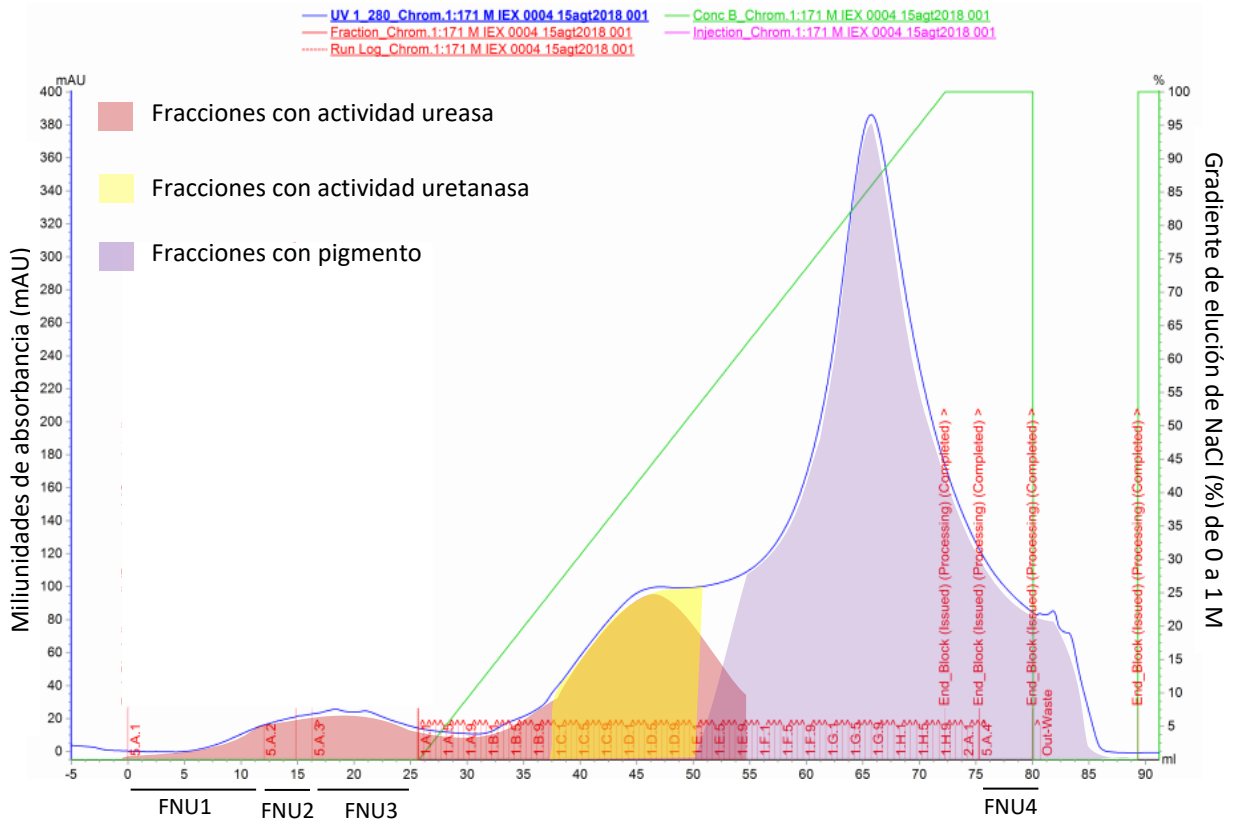


Figura 18. Cromatograma de la columna de intercambio iónico cargada con proteínas extracelulares de *C. tenuissimum* A3.I.1. Se utilizó una columna de intercambio aniónico Sephadex Q, se inyectaron 40.0 mg de proteína, se utilizó un gradiente de NaCl (0.0 – 1.0 M) para la elución. Fracciones no unidas a la columna o fracciones de lavado, FNU1-FNU4. Fracciones de elución 1A1-2A4. En el eje de las Y de lado izquierdo se encuentran las miliunidades de absorbancia (mAU) y del lado derecho el gradiente de elución de NaCl (en verde). Cultivos de la condición 1e/3m en medio PBPL incubados durante 14 días en agitación a 30 °C. n=2

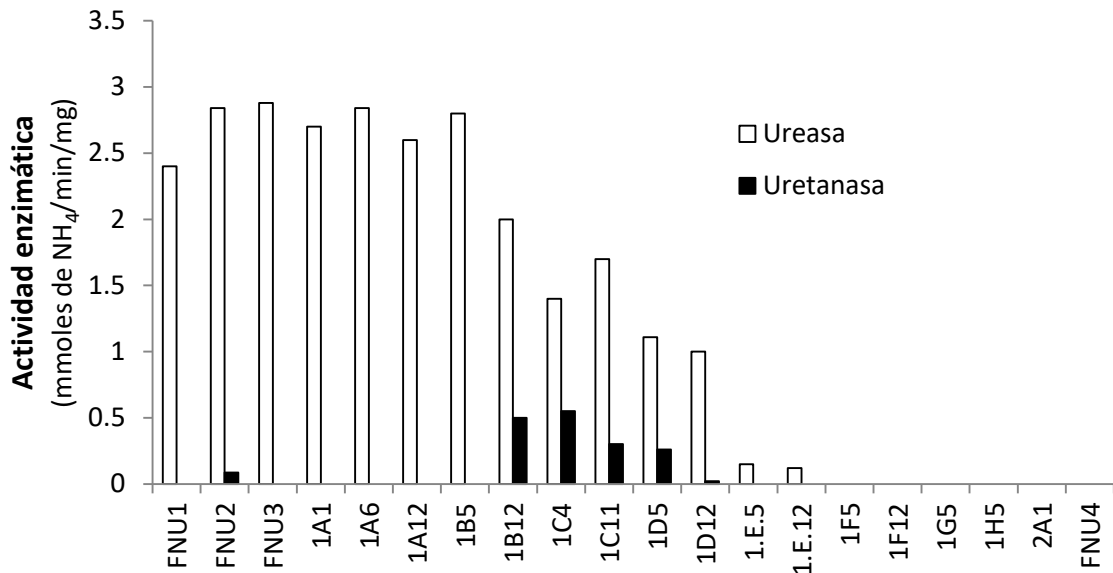


Figura 19. Actividades ureasa (barras blancas) y uretanasa (barras negras) cuantificadas espectrofotométricamente en las fracciones de la columna de intercambio aniónico descrita en Fig. 18.

8.5.1 Resolución de las proteínas del extracto semipurificado

Una vez identificadas las fracciones con actividad ureasa y uretanasa se realizaron geles de poliacrilamida para determinar el grado de purificación de las muestras e identificar el tamaño aproximado de las proteínas de interés. Por contratiempos experimentales no pudieron realizarse las pruebas para la actividad uretanasa, únicamente se analizó la actividad ureasa en geles SDS-PAGE. En el perfil proteico teñido con Coomassie se presentaron pocas bandas, la mayoría entre 20 y 70 kDa (Fig. 20a).

En el zimograma para actividad ureasa se identificaron dos bandas, una a 100 kDa, la cual presentó la mayor actividad ureasa espectrofotométricamente determinada (Fig. 21), detectada claramente en la FNU3 (Fig. 20b). La otra banda se observó a 150 kDa y fue detectada en las fracciones C2 y D2 que correspondieron a las fracciones que

tuvieron actividad ureasa y uretanasa espectrofotométricamente determinada (Fig. 21). Las dos bandas que presentaron actividad ureasa positiva no se detectaron en el perfil proteico teñido con Coomassie, posiblemente debido a la poca cantidad de proteína cargada en los geles, sin embargo, las bandas parecen tener una elevada actividad ureasa. Para comprobar que las bandas observadas a 100 y 150 kDa no fueran artefactos en la técnica, se realizó un control negativo donde se siguió el mismo protocolo y se utilizaron las mismas muestras pero no se adicionó el substrato urea. Al revelar el gel no se observó ninguna banda (Fig. 20c), lo cual indica que las bandas observadas en el análisis son efectivamente señales de la hidrólisis de urea por alguna actividad enzimática y no por un artefacto experimental.

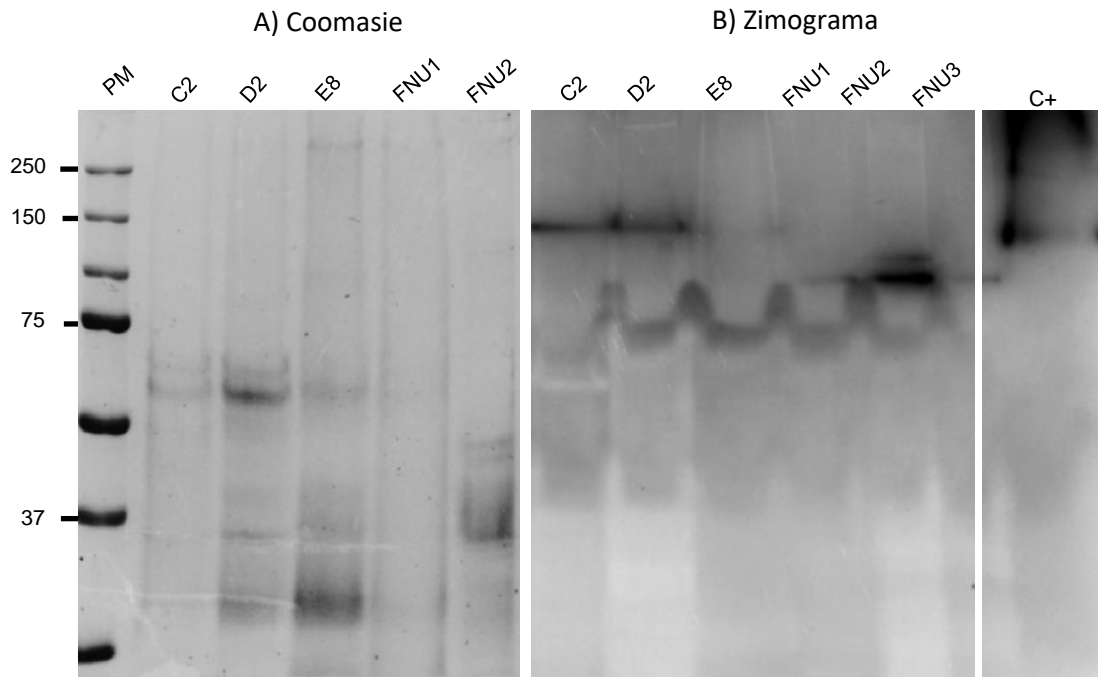
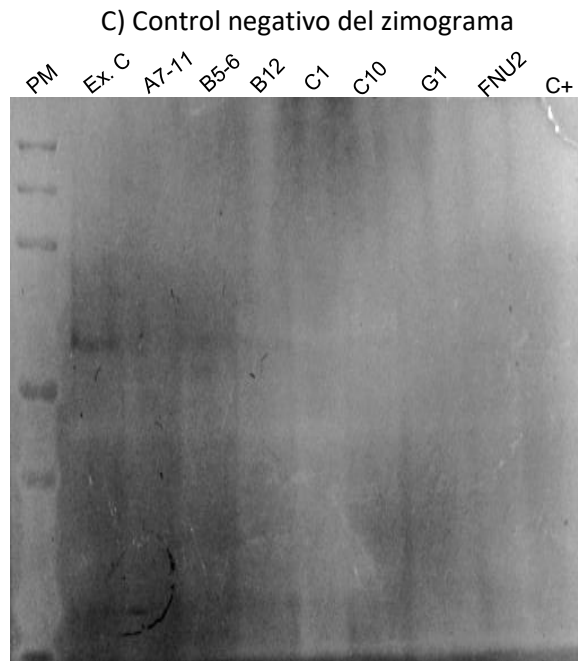


Fig 20. Análisis por PAGE-SDS y zimograma de la purificación de la activada ureasa. Fotos de geles SDS-PAGE al 10% cargados con 10 μ g de proteína de las fracciones de la columna de intercambio iónico (letras de la parte superior). Como control positivo se utilizó ureasa de Jack Bean (2U). Se utilizó un marcador de peso molecular BioRad dualcolor. **A)** gel teñido con azul de Coomassie. **B)** zimograma de actividad ureasa. **C)** control negativo. Flechas negras indican las bandas encontradas con actividad ureasa.



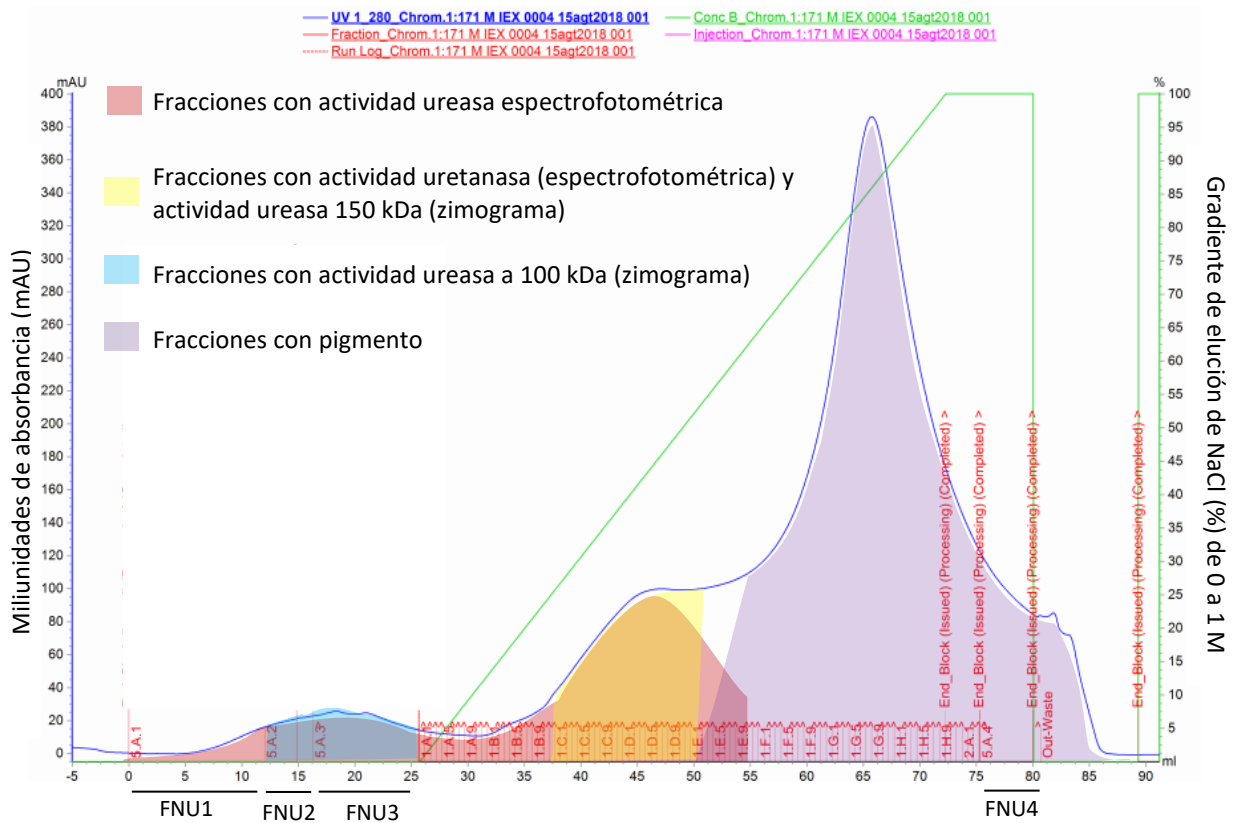


Figura 21. Cromatograma de columna de intercambio iónico con actividades ureasa y uretanasa cuantificadas espectrofotométricamente y actividad ureasa analizada por zimografías.

En cuanto a las posibles enzimas responsables de las actividades ureasa y uretanasa hay reportes de hongos capaces de producir urea amidohidrolasa o urea amidoliasa y algunos organismos del filo ascomycota presentan ambas enzimas (Navarathna *et al.*, 2010). La urea amidohidrolasa es una enzima importante en la virulencia de diversos hongos fitopatógenos como *Cryptococcus neoformans* y *Coccidioides immitis* (Mirbord-Donovan *et al.*, 2006), inhibiendo el sistema de defensa de las plantas (Navarathna, *et al.* 2010; Lerm, *et al.* 2017), siendo *Cladosporium* un hongo fitopatógeno podría ser esta enzima la que se observa con mayor actividad ureasa. Además de que en plantas y hongos se reporta a las ureasas compuestas por dos subunidades idénticas,

comúnmente ensambladas en trímeros o hexámeros con un tamaño entre 480 y 545 kDa por lo que esas unidades idénticas al ser desnaturalizadas tienen un peso aproximado de 150 kDa, haciendo posible que la banda que se observó en los geles de SDS sea una amidohidrolasa. Por otro lado, la urea amidoliasa está involucrada en el catabolismo de la urea, el cual activa la ruta de señalización urea-dependiente, que está relacionada con la patogenicidad del hongo (Gosh *et al.*, 2009). Algunos hongos del subfilo Pezizomycota que es al cual pertenece el género *Cladosporium* tienen esta enzima y en el mismo subfilo se encontraron especies de Sordariomycetes que tienen genes que codifican a ambas enzimas (Navarathna *et al.*, 2010). Se llegó a purificar una urea amidoliasa de *Candida utilis*, la cual fue capaz de romper enlaces de tipo uretano (Roon y Levenberg, 1972). Esta enzima es inducible y se encuentra en el citoplasma, por lo que es posible que haya una mayor actividad uretanasa en las condiciones con más espumas debido a la muerte celular por estrés de las hifas liberando estas enzimas al medio.

Hay dos genomas del género *Cladosporium* (*C. fulvum* y *C. sphaerospermum*) reportados en el GenBank, en ambos genomas se encontraron genes que codifican a la urea amidohidrolasa, la cual fue previamente sugerida como una de las posibles responsables de la degradación de PU (Yew *et al.*, 2016).

9. Conclusiones

- Con el protocolo desarrollado para la concentración de la proteína extracelular de *Cladosporium tenuissimum* A3.1.1 se logró disminuir el tiempo de obtención de las proteínas de 5 a 2 días sin afectar las actividades ureasa y uretanasa de interés
- Al determinar la condición 1e/3m a los 14 días como la ideal para la purificación de las enzimas de interés en menor tiempo se obtuvo una mayor actividad ureasa y uretanasa extracelulares en un 25 y 33% respectivamente en comparación con la condición inicial.
- Se identificó una correlación entre la actividad ureasa y la degradación de las espumas, pero no con la actividad uretanasa. La actividad ureasa y uretanasa presentaron valores de correlación negativos lo que sugirió que estas actividades corresponden a proteínas distintas.
- En los ensayos de actividad ureasa y uretanasa la mayor actividad se presentó en buffer fosfatos 50 mM a pH 8 y pH 7 respectivamente. Estas actividades soportan concentraciones de NaCl 1 M sin abatirse por completo.
- Con los análisis preliminares para la purificación de las actividades ureasa y uretanasa extracelulares, por cromatografía de intercambio aniónico se identificaron dos fracciones de interés: una solo con actividad ureasa y otra con actividad ureasa y uretanasa medidas espectrofotométricamente.
- Por zimografía se identificaron dos proteínas con actividad ureasa: una de 100 kDa en las fracciones que presentaron solo actividad ureasa y otra de 150 kDa en las fracciones que presentaron actividad ureasa y uretanasa medidas

espectrofotométricamente, probando que son dos proteínas distintas: una con actividad ureasa y otra con actividad ureasa y uretanasa.

10. Perspectivas

- Purificar e identificar la(s) enzima(s) con actividad ureasa y uretanasa en la condición 1e/3m a los 14 días de cultivo relacionadas con la degradación de espumas de PE-PU.
- Caracterizar la actividad de la(s) enzima(s) relacionadas con la degradación de las espumas de PE-PU.
- Determinar si la(s) enzima(s) con actividad ureasa y uretanasa son capaces de degradar otros poliuretanos y otros plásticos.
- Utilizando la enzima pura o el hongo desarrollar un proceso biotecnológico para optimizar la degradación de las espumas de PE-PU.
- Secuenciar el genoma de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 e identificar el/los gen/es que codifica/n las enzimas relacionadas con la degradación de las espumas.

Literatura citada

- Acosta GEN, Bourdon A, Gutiérrez DI. 2016. Determinación de la longitud de onda máxima por barrido espectral dentro del rango ultravioleta visible (UV-VIS). *Elementos* 6(6):101-116.
- Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinome I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *Int J Environl Bioremed Biodegrad.* 3(1):28-39.
- Akutsu-Shiego 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 Biotech.* 70(4):422-429.
- Álvarez Barragán J. 2013. Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis de licenciatura QFB. Facultad de Química, UNAM. Posgrado en C. Bioquímicas, UNAM.
- 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(17):5225-5235.
- Amaral JS, Sepúlveda M, Cateto CA, Fernández IP, Rodríguez AE, Belgacem MN y Barreiro MF. 2012. Fungal degradation of lignin-base rigid polyurethane foams. *Polym Degrad Stab.* 97(1):2069-2076.
- Cochrane VW. 1958. *Physiology of fungi.* John Wiley and sons. Ltd. Inglaterra, 1-27.
Tomado de: <https://archive.org/stream/physiologyoffung00coch#page/n11>
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl Environ Microbiol.* 73(18):5817-5824.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Handley GD, Robson GD. 2010. Effect of bioestimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *Appl Environ Microbiol.* 76(3):810-819.

- Cregut M, Bedas M, Durand MJ, Thouand G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotech Adv.* 31(8):1634-1647.
- Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, Aisen P, Nosanchuk JD, Casadevall A. 2007. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *Plos One.* 2(5):1-13.
- Debet MR, Gildey MJ. 2006. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carb Poly.* 64(3):452-465.
- Gautam R, Bassi AS, Yanful EK. 2006. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Appl Biochem Biotech.* 141(1):85-108.
- Ghosh S, Navarathna D.H, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM, Nickerson KW. 2009. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Inf Immun.* 77(4):1596-1605.
- González-Hernández RA. 2016. Optimización del cultivo de hongos filamentosos para biodegradar espumas de poliéter poliuretano y determinación de actividades enzimáticas relacionadas. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM. Posgrado en C. Bioquímicas, UNAM.
- Gottlieb D. 1971. Limited growth in fungi. *Mycol.* 63(3):619-629.
- Howard TG. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 49 (4):245-252.
- Hu P, Fan X, Lin L, Wang J, Zhang L, Wei C. 2017. Effects of surface proteins and lipids on molecular structure, thermal properties and enzymatic hydrolysis of rice starch. *Food Sci Technol.* 38 (1): 84-90.
- Kavanagh K. 2005. *Fungi biology and applications.* John Wiley and Sons, Ltd. Inglaterra. Departamento de biología. 1-34.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680 – 685.
- Lerm B, Keyon C, Schwartz IS, Kroukamp H, Witt R, Govender NP, Hoog GS, Botha A. 2017. First report of urease activity in the novel systemic fungal

- pathogen *Emergomyces africanus*: a comparison with the neurotrope *Cryptococcus neoformans*, FEMS Yeast Res. 17 (7): 1-5.
- Loredo-Treviño A, García G, Velasco-Téllez A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2011. Polyurethane foam as substrate for fungal strains. Adv Biosci Biotech. 2 (2):52-58.
- 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 appl microbial. 108 (6): 1946-1953.
- McKenna ST, Hull TR. 2016. The fire toxicity of polyurethane foams. Fire Sci rev. 5 (3): 1-27.
- Mirbod-Donovan F, Schaller R, Cole GT. 2002. Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Med Mycol. 40 (X): 35-44
- Mirbod-Donovan F, Schaller R, Chiung-Yu H, Xue J, Reichard U, Cole GT. 2006. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. Infect Immun. 74(1): 504-515
- Mobley HLT, Cortesia MJ, Rosenthal LE, Jones BD. 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol. 26 (5): 831-836
- Mora D, Monnet C, Parini C, Guglielmetti S, Mariani A, Pintus P, Molinari F, Daffonchio D, Manachini PL. 2005. Urease biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. Res Microbiol. 156 (9): 897-903.
- Nan-di Z, Xiao-lei G, Ya-ping T. 2013. Isolation and characterization of urethanase from *Penicillium* variable and its application to reduce ethyl carbamate contamination in Chinese rice wine. Appl Biochem Biotechnol 170 (3):718-728.
- Narea F, Porras L, Muñoz R, Muñoz A. 2010. Diseño de interfaz gráfica para determinar los índices de pigmentación y eritema de la piel humana. Universidad de Carabobo, UC.
- Navarathna DH, Harris SD, Roberts DD, Nickerson KW. 2010. Evolutionary aspects of urea utilization by fungi. FEMS Yeast res. 10(2): 209-214

- Ortiz SIA, Álvarez RVP, González CG, Valenzuela NLM, Potisek TMC y Chávez SJA. 2015. Concentración de almidón y proteínas solubles en tubérculos de *Caladium bicolor* en diferentes etapas fenológicas. Rev Mex Agríc. 6 (3): 483-494.
- Parker L. 2017. We made plastic. We depend on it. Now we are drowning in it. National geographic, tomado de <https://nationalgeographic.com/magazine/2018/06/plastic-planet-waste-pollution-trash-crisis/>.
- Plastics Europe. 2016. Tomado de: www.plasticseurope.org/es
- Ren X. 2003. Biodegradable plastics: a solution or a challenge?. J Clean Prod. 11 (1):27-40.
- Reyes LA, Soto MAR, Olvera JAO, Orozco EL, Galo NL, Tellechea LFP, Galván JV, Parrilla EA, Martínez AM, Sánchez AGD. 2016. Aspectos estructurales y mecanismos de la enzima ureasa y sus proteínas accesorias. Sci Techno UACJ. Vol. especial. 19-37.
- Robinson PM. 1969. Aspects of staling in liquid cultures of fungi. New phytol. 68 (1): 351-357.
- Rodríguez-Sandoval E, Sandoval AA, Fernández-Quintero A. 2007. Evaluación de la retrogradación del almidón en harina de yuca precocida. Rev Colomb Quim. 36 (1):13-30
- Roon RJ, y Levenberg B. 1972. Urea amidolyase. J Biol Chem. 247 (13):4107-4113
- Russel JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantsel KW. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. Appl Environ Microbiol. 77 (17):6076-6084.
- Shiau KS, Chen TL. 1996. Initial protein concentration effects on precipitation by salt. Biotechnol and bioengineering. 53 (1): 202-206
- Smith PT, Douglas AK, Goodman N. 1993. Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*. J Gnrl Microbiol. 139 (X): 957-962
- UTECH las Américas, 2017. El evento líder en poliuretanos llega a México. www.PortalAutomotriz.com Tomado de:

<https://portalautomotriz.com/noticias/proveedores/utech-las-americas-2017-el-evento-lider-en-poliuretanos-llega-a-mexico>.

- Wang S, Luo H, Zhang J, Zhang Y, He Z, Wang S. 2014. Alkali-induced changes in functional properties and in vitro digestibility of wheat starch: the role of surface proteins and lipids. *J. Agric Food Chem.* 62(16): 3636-3646
- 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 indophenol reaction. *Anal Biotechm.* 290 (1): 102-107.
- Yang W, Dong Q, Liu S, Xie H, Liu L, Li J. 2012. Recycling and disposal methods for polyurethane foam wastes. *Procedia Env Sci* 16(1): 167-175.
- Yew MS, Chan LC, Ngeow YF, Toh YF, Na SL, Lee KW, Hoh Chee-Choong, Wai-Yan Y, Ng KP, Kuan CS. 2016. Insight into different environmental niches adaptation and allergenicity from the *Cladosporium sphaerospermum* genom, a common human allergy-eliciting dothideomycetes. *Sci. report.* 6(27008): 1-13
- Zafar U, Houlden A, Robson GD. 2013. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *Appl. Env. Microbiol.* 79 (23):7313-7324.

Anexo 1. Preparación de medios y reactivos

Medio papa broth (PB)

Para 1 L

Papa de cáscara blanca

250 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa
2. Filtrar usando 5 capas de gasa
3. Centrifugar el filtrado a 10 000 rpm 10 min y descartar el pellet
4. Reponer el volumen hasta 1 L con dH₂O y distribuir en alícuotas de 250 mL
5. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 min

Medio papa dextrosa broth (PDB)

Para 1 L

Papa de cáscara blanca

250 g

Dextrosa

20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa
2. Filtrar usando 5 capas de gasa
3. Centrifugar el filtrado a 10 000 rpm 10 min y descartar el pellet
4. Reponer el volumen hasta 1 L con dH₂O y distribuir en alícuotas de 250 mL
5. Por cada 250 mL adicionar 5 g de dextrosa
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 min

Medio papa dextrosa agar (PDA)

Para 1 L

Papa de cáscara blanca

250 g

Dextrosa

20g

Agar

20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa
2. Filtrar usando 5 capas de gasa
3. Centrifugar el filtrado a 10 000 rpm 10 min y descartar el pellet
4. Reponer el volumen hasta 1 L con dH₂O y distribuir en alícuotas de 250 mL

5. Por cada 250 mL adicionar 5 g de dextrosa y 5 g de agar
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 min

Medio con bioestimulante (PBPL) Para 500 mL

Medio PB 50%	250 mL
PolyLack stock al 3.0% m/v	4.0 mL

Al caldo de papa (PB) diluido al 50% se le agregará la cantidad de barniz PolyLack (PL) para tener una concentración 0.25%. El barniz comercial viene a un porcentaje de sólidos del 30%. Aforar a 500 mL con dH₂O.

Solución lava hongos (SLH) Para 500 mL

NaCl	0.9 g
Tween 80	0.5 mL

1. En 400 mL de dH₂O disolver el NaCl, sin calentar
2. Adicionar y disolver el Tween
3. Aforar a 500 mL
4. Almacenar a TA en frasco ámbar etiquetado

Soluciones para cuantificación de las actividades ureasa y uretanasa

Fenol-Nitroprusiato Para 100 mL

Fenol	7 g
Nitroprusiato	34 g

1. En 60 mL de dH₂O disolver el fenol en parrilla de agitación
2. Adicionar el nitroprusiato y disolver
3. Aforar a 100 mL con dH₂O
4. Almacenar en frasco ámbar a 4 °C

Nota: Utilizar la campana de extracción al manejar fenol

Hipoclorito	Para 200 mL
Hidróxido de sodio	2.96 g
Fosfato disódico anhidro	11.79 g
Hipoclorito al 12%	16.6 mL

1. En 100 mL de dH₂O disolver el hidróxido de sodio
2. Una vez disuelto adicionar fosfato disódico
3. Adicionar el hipoclorito
4. Ajustar el pH a 12 con NaOH
5. Aforar a 200 mL con dH₂O y almacenar a temperatura ambiente

Preparación de geles de SDS 10%

Gel separador	2 geles
dH ₂ O	4 mL
Buffer separador	2.5 mL
Acrilamida al 30%	3.3 mL
Persulfato de amonio al 20%	50 µL
TEMED	5 µL

1. Armar el equipo de Bio-Rad para la preparación de los geles, utilizar los cristales de 1 mm de espesor, asegurarse que se encuentren completamente limpios y desengrasados
2. Mezclar, dH₂O, el buffer separador y la acrilamida
3. Justo antes de usarlo agregar persulfato y TEMED, agitar un poco y verter entre los vidrios
4. Dejar polimerizar (5 min) y posteriormente adicionar un poco de etanol encima para alinear el gel
5. Quitar completamente el etanol antes de vaciar el gel apilador

Gel apilador	2 geles
dH ₂ O	2.4 mL
Buffer separador	1.04 mL
Acrilamida al 30%	700 μL
Persulfato de amonio al 20%	30 μL
TEMED	5 μL

1. Mezclar, dH₂O, el buffer separador y la acrilamida
2. Justo antes de usarlo agregar persulfato y TEMED, agitar un poco y verter entre los vidrios
3. Colocar encima del gel separador y colocar inmediatamente el peine para formar los carriles
4. Dejar polimerizar (5 min) para poder retirar el peine

Buffer separador	Para 100 mL
Tris-base	18.17 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris, disolver en 800 mL de dH₂O y ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N
2. Agregar el SDS y aforar a 100 mL con dH₂O. Almacenar a temperatura ambiente

Buffer apilador	Para 100 mL
Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris disolverlo en 80 mL de dH₂O y ajustar el pH a 6.8 con HCl 12 N
2. Agregar el SDS y aforar con dH₂O. Almacenar a temperatura ambiente

Buffer de corrida 10X	Para 1 L
Tris-base	30 g

Glicina 144 g

SDS 10 g

1. Disolver en 600 mL de dH₂O la glicina 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, disolverlo y ajustar el volumen a 1 L con dH₂O
5. Almacenar a TA

Nota: se utiliza al 1X en la cámara de electroforesis

Disolución de Tritón-X100 2.5% Para 1 L

Triton-x100 25 mL

1. Disolver la disolución de Triton-X100 en 500 mL de dH₂O
2. Mantener en agitación constante (se recomienda mezclar con temperatura moderada, 35 °C) hasta mezclar completamente los componentes
3. Aforar a 1 L con dH₂O

Para 100 mL

Colorante de Coomassie

Coomassie brillante blue R250 0.05 g

Metanol QP 50 mL

dH₂O 40 mL

Ácido acético glacial 10 mL

1. Pesar y medir los reactivos, disolverlos en un vaso de precipitado de vidrio (no usar plástico) sin calentar
2. Almacenar a TA

Mezcla desteñidora Para 250 mL

Ácido acético glacial 18.75 mL

Metanol grado técnico 50 mL

1. Medir los reactivos y ajustar a 250 mL con dH₂O
2. Almacenar a TA.

Anexo 2. Análisis estadístico ANOVA

Diferencias significativas entre grupos de las variables degradación y actividad ureasa.

Tukey HSD test; variable degradación					
Grupos homogéneos					
n	df	Error entre medias	F	P	alpha
27	18	8.61	3.65	0.88	0.05
Condición	Media	n	Grupos		
			A	B	C
1e/1m	67	3	x		
1e/2m	63.3	3	x		
1e/3m	66	3	x		
2e/1m	52.2	3		x	
2e/2m	50.8	3		x	
2e/3m	45.9	3		x	
3e/1m	20.4	3			x
3e/2m	17.2	3			x
3e/3m	15.16	3			x

Tukey HSD test; variable ureasa					
Grupos homogéneos					
n	df	Error entre medias	F	P	alpha
27	18	0.098	7.5	0.47	0.05
Condición	Media	n	Grupos		
			A	B	C
1e/1m	3.63	3	x		
1e/2m	3.17	3	x		
1e/3m	2.18	3		x	
2e/1m	2.62	3		x	
2e/2m	2.36	3		x	
2e/3m	2.34	3		x	
3e/1m	1.03	3			x
3e/2m	0.87	3			x
3e/3m	3.10	3	x		