



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Actividades esterasa y uretanasa, y perfil proteómico preliminar durante la degradación del poliéster poliuretano Impranil por *Alicyclophilus denitrificans* BQ1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. JACQUELINE FUENTES JAIME

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Bertha González Pedrajo
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera en el laboratorio 105 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El proyecto contó con los financiamientos PAPIIT-DGAPA-UNAM IN223317 y IN227620, PAIP-FQ-UNAM 5000-9117 y CONACYT-PRONAES (Programa Presupuestario F003 "Programas Nacionales Estratégicos de Ciencia, Tecnología y Vinculación con los sectores Social, Público y Privado") 101737. Durante los estudios de Doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT (No. CVU 443492) y con una beca para la obtención de grado otorgado por PAPIIT-DGAPA-UNAM IN223317 (período 2017-2019). Conté con el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

Se agradece la participación del Dr. Martín Vargas Suárez en el diseño experimental, la interpretación y la discusión de resultados, así como en el montaje de la técnica y ejecución de la cuantificación enzimática de tipo lipasa.

Al Dr. M. Javier Cruz Gómez del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la UNAM por facilitar el equipo donde se realizaron los análisis GC-MS.

Al Dr. David Schleheck de la Universidad de Konstanz Alemania por facilitar la realización de los análisis de proteómica total diferencial.

Agradecimientos especiales a la Q. Maricela Gutiérrez Franco del Laboratorio de Espectroscopia de Infrarrojo de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM por su apoyo técnico.

A los miembros del jurado por su tiempo y dedicación invertidos en la revisión del manuscrito final y por fungir como miembros del jurado evaluador.

El jurado de examen de Doctorado estuvo conformado por:

Presidente	Dr. Alejandro Sosa Peinado
Secretario	Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Vocal	Dr. José Guillermo Aguilar Osorio
Vocal	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Vocal	Dra. Gloria Soberón Chávez

***A mis dos grandes motores de vida,
mi madre y mi hermano Alan.***

***“En memoria de Gorila...
siempre te llevaré en mi corazón”.***

CONTENIDO

ABREVIATURAS	10
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1 Poliuretano (PU).....	13
2.1.1 Revestimientos de PU base agua.....	14
2.1.2 Biodegradación del PU.....	16
2.2 <i>Alicyclophilus denitrificans</i>	19
2.3 Proteínas relacionadas con la degradación del PU.....	20
2.4 Búsqueda de vías metabólicas relacionadas con la degradación del PU	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Caracterización bioquímica parcial de la actividad uretanasa citoplásmica	27
6.2 Selección de la fuente de carbono para los análisis de proteómica total diferencial	28
6.3 Obtención de proteínas extracelulares, citosólicas y membranales a partir de cultivos de BQ1 creciendo en Impranil y acetato	28
6.4 Proteómica total diferencial	29
6.5 Análisis bioinformático	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1 <i>Alicyclophilus denitrificans</i> BQ1 utiliza el Impranil como única fuente de carbono para crecer escindiendo los grupos éster y uretano	30
7.2 Durante la biodegradación del Impranil se exhibe una acción concertada entre esterases y uretanasas, tanto extracelulares como citoplásmicas	33
7.3 Caracterización bioquímica parcial de la actividad uretanasa	40
7.4 Para el análisis comparativo de proteómica diferencial el medio mínimo con acetato fue seleccionado como fuente de carbono control.....	42
7.5 Comparación de las proteínas de <i>A. denitrificans</i> BQ1 expresadas en Impranil y acetato con FC>2.....	43
7.6 Vías metabólicas y proteínas relacionadas con la degradación del Impranil en <i>A. denitrificans</i> BQ1.....	45
7.6.1 Degradación de ácidos grasos o β -oxidación	45

7.6.2 Síntesis de nicotinato y nicotinamida.....	48
7.6.3 Gluconeogénesis.....	49
7.6.4 Proteínas de unión a sustrato (SBPs) de Transportadores Tripartitas de Tricarboxilatos (TTT).....	50
7.6.5 Hidrolasas con posible actividad sobre grupos éster y uretano del Impranil.....	51
8. CONCLUSIONES	55
9. PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS.....	57
ANEXOS	62

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Isocianatos más comunes empleados en la síntesis del PU. a) Isómeros de TDI, b) Isómeros de MDI, c) HDI. Dependiendo de la aplicación, los isómeros son separados o usados como mezcla.14
- Figura 2.** Algunos polioles empleados en la síntesis de PU. a) poli caprolactona, b) poli butilensuccinato, c) poli butilenadipato, d) polietilenglicol, e) poli propilenglicol, f) poli propilencarbonato.14
- Figura 3.** Estructura hipotética del Impranil®DLN W50 (Biffinger *et al.* 2015).....15
- Figura 4.** Crecimiento de *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 en MM-Impranil y degradación del Impranil. a) Crecimiento de *A. denitrificans* BQ1 usando diferentes concentraciones de Impranil. b) Aclaramiento del Impranil en MM-Impranil inoculado con BQ1 y no inoculado y actividad específica de aclaramiento cuantificada en cultivos de BQ1 a diferentes tiempos de incubación. Los datos son el promedio de tres réplicas biológicas. Las barras representan la desviación estándar.31
- Figura 5.** Análisis de la biodegradación del Impranil por *A. denitrificans* BQ1 mediante espectroscopia FTIR. Los espectros se obtuvieron a partir de los sobrenadantes de cultivos de MM-Impranil no inoculado (control) e inoculado con *A. denitrificans* BQ1 incubados a 37°C y 200 rpm durante diferentes tiempos de cultivo. Se muestran los espectros representativos de cuatro réplicas biológicas.32
- Figura 6.** Análisis curso temporal mediante GC-MS de la degradación del Impranil por *A. denitrificans* BQ1. Los sobrenadantes de diferentes tiempos de cultivo inoculados y no inoculados (tiempo 0) incubados a 37 °C y 200 rpm fueron sometidos a una extracción orgánica con metanol:cloroformo (1:1, v/v). a) Cromatogramas representativos de los diferentes tiempos analizados. Los números en las señales de los cromatogramas corresponden a los números de los compuestos en el mapa de calor. b) Mapa de calor representando el área de las señales correspondientes a los diferentes compuestos identificados y sus fórmulas en los tiempos de cultivo indicados. Los compuestos se identificaron por comparación usando el NIST Mass Spectrometry Data Center (2002 library).33
- Figura 7.** Aclaramiento del Impranil y actividades esterasa y uretanasa de proteínas extracelulares y citoplásmicas de *A. denitrificans* BQ1 cultivada en MM-Impranil. Las proteínas extracelulares y citoplásmicas se obtuvieron en los tiempos indicados. Cada reacción se llevó a cabo usando 10 µg de proteína. a) El aclaramiento del Impranil se cuantificó a 600 nm en ensayos *in vitro* utilizando Impranil 1.25 mg ml⁻¹. b) La actividad esterasa se cuantificó a 405 nm usando *p*-NPA 5 mM como sustrato. c) La actividad uretanasa se determinó a 636 nm con uretano 50 mM como sustrato. Las barras representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.34
- Figura 8.** Modelo propuesto para la acción concertada de las actividades esterasa y de escisión del uretano de *A. denitrificans* BQ1 durante la degradación de Impranil. a) BQ1 usa el Impranil como única fuente de carbono alcanzando su máximo crecimiento y aclaramiento

del Impranil a las 24 h. b) El Impranil es una dispersión coloidal base agua de tipo PS-PU sintetizada a partir de poli hexano/neopentil poliéster adipato y HDI. Mediante polimerización de tipo “step-growth”, estos compuestos pueden reaccionar aleatoriamente generando diferentes segmentos de polímero donde los grupos uretano estarían flanqueados por distintos grupos funcionales, proporcionando composiciones estructurales químicas específicas para ser atacadas por actividades enzimáticas. c) Durante la biodegradación del Impranil BQ1 exhibe de forma concertada proteínas de tipo esterasa y de escisión del uretano expresadas en dos etapas (los niveles de actividad están representados por las alturas de las barras azul y roja y el tamaño de la letra).35

Figura 9. Análisis por espectroscopia FTIR de la biodegradación *in vitro* del Impranil por proteínas extracelulares (ECP) y citoplásmicas (CP) de *A. denitrificans* BQ1. Se obtuvieron y concentraron las proteínas de cultivos de BQ1 creciendo en MM-Impranil (1.25 mg ml⁻¹) a las 12, 18 y 36 h de cultivo. En todos los ensayos se utilizó Impranil (1.25 mg ml⁻¹) resuspendido en buffer de fosfatos pH 7. En el primer conjunto de experimentos, cada análisis se realizó agregando 60 µg de proteína e incubando durante 6 h a 37 °C; a) proteínas extracelulares (ECP) de 12 h y proteínas citoplasmáticas (CP) de 12 h; b) 36 h ECP y 36 h CP. En el segundo conjunto de experimentos, se agregaron 100 µg de proteína a cada ensayo *in vitro* y se incubaron durante 12 h a 37 °C, y luego, si correspondía, se agregó la segunda fracción de proteína; c) 12 h ECP y 12 h ECP más 18 h ECP; d) 12 h CP y 12 h CP más 18 h CP. Como controles se usaron proteínas desnaturalizadas por calor en las mismas condiciones que cada conjunto experimental. Se muestran espectros representativos de cuatro réplicas biológicas.40

Figura 10. Efectos del pH y osmolitos sobre la actividad uretanasa citoplásmica de *A. denitrificans* BQ1 cultivada en MM-Impranil. La actividad uretanasa se ensayó con uretano 50 mM y se cuantificó a 636 nm. a) Efecto del pH sobre la actividad uretanasa. b) Actividad uretanasa en presencia de etilenglicol 10 % (v/v), glicerol 10 % (v/v) y NaCl (0-1 M) en amortiguador McIlvaine pH 8. Las barras representan las desviaciones estándar de tres réplicas independientes.....41

Figura 11. Crecimiento de *A. denitrificans* BQ1 en MM-Impranil y MM-acetato. Los cultivos se incubaron a 37°C y 200 rpm. El crecimiento se cuantificó con base en la concentración de proteína usando el método de Bradford (Bradford, 1976). Las flechas indican los tiempos de cosecha celular para cada fuente de carbono. Los datos son promedios de tres réplicas biológicas. Las barras representan la desviación estándar.42

Figura 12. Comparación de categorías funcionales de proteínas de *A. denitrificans* BQ1 con FC>2 expresadas en MM-Impranil y MM-acetato. Las comparaciones están basadas en la información proporcionada por la base de datos KEGG Orthology And Links Annotation. Los números representan los KO asignados para cada categoría funcional.44

Figura 13. Mecanismo de β-oxidación de ácidos grasos que conduce a la formación sucesiva de acetil-CoA y proteínas que catalizan los cuatros pasos de la vía (a) (Modificado de Madigan *et al.* 2015). Proteínas de BQ1 expresadas en MM-Impranil y MM-acetato asociadas con la degradación de ácidos grasos (b).45

Figura 14. Comparación de valores de FC de las proteínas de <i>A. denitrificans</i> BQ1 expresadas en MM-Impranil que participan en la vía de degradación de ácidos grasos. El símbolo * denota las proteínas expresadas exclusivamente en MM-Impranil.....	47
Figura 15. Vía de síntesis de las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD ⁺) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP ⁺) (a), modificado de KEGG. Proteínas de BQ1 sobre-expresadas en MM-Impranil asociadas con la síntesis de NAD ⁺ y NADP ⁺ (b).	48
Figura 16. Proteínas de <i>A. denitrificans</i> BQ1 expresadas en MM-Impranil asociadas con la gluconeogénesis (a) y sus correspondientes valores de FC (b).	50
Tabla 1a. Bacterias relacionadas con la biodegradación de diferentes tipos de PU (Modificado de Magnin <i>et al.</i> 2020).....	17
Tabla 1b. Hongos y comunidades microbianas relacionadas con la biodegradación de diferentes tipos de PU (Modificado de Magnin <i>et al.</i> 2020).....	18
Tabla 2. Cepas de <i>Alicyclophilus denitrificans</i>	19
Tabla 3a. Proteínas relacionadas con la degradación del PU (Modificado de Magnin <i>et al.</i> 2020).	21
Tabla 3b. Proteínas relacionadas con la ruptura de los grupos uretano del PU.....	22
Tabla 4. Especificidad de sustrato para actividades de tipo esterasa y uretanasa de <i>Alicyclophilus denitrificans</i> BQ1 cultivada en MM-Impranil.	39
Tabla 5. Proteínas totales, proteínas con FC>2 y proteínas con asignación KO de <i>A. denitrificans</i> BQ1 identificadas mediante proteómica diferencial en presencia de Impranil o acetato como fuente de carbono.	43
Tabla 6. Proteínas de unión a sustrato de TTT de <i>A. denitrificans</i> BQ1 expresadas en MM-Impranil.....	50
Tabla 7. Hidrolasas de <i>A. denitrificans</i> BQ1 exclusivas y expresadas en MM-Impranil con FC>2	52

ABREVIATURAS

CoA	Coenzima A
CP	Proteínas citosólicas
ECP	Proteínas extracelulares
FC	Fold-change
FTIR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HDI	Hexametilen diisocianato
HPLC	High performance liquid chromatography
kDa	Kilodalton
KOALA	KEGG Orthology And Links Annotation
KO	KEGG Orthology
MDI	Diisocianato de 4,4'-metilendifenilo
MM	Medio mínimo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PF	Peptide fingerprinting
PS	Poliéster
PU	Poliuretano
rpm	Revoluciones por minuto
SBP	Substrate binding protein
SDS	Dodecilsulfato sódico
TDI	Diisocianato de tolueno
TTT	Tripartite tricarboxylate transport

1. RESUMEN

En este trabajo se examina la capacidad de *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 para biodegradar el poliéster (PS)-PU Impranil en función de la expresión temporal y espacial de las esterasas y las actividades que rompen los grupos uretano, extracelulares y citoplásmicas, así como sus efectos independientes y combinados en la biodegradación del Impranil. *A. denitrificans* BQ1 creció en Impranil, y su aclaramiento se correlacionó con la escisión de los grupos éster y uretano desde tiempos tempranos, con decrementos de algunos compuestos del Impranil y la aparición de productos de biodegradación. Mientras la actividad esterasa extracelular estuvo activa en tiempos tempranos con su máximo a las 18 h, la actividad uretanasa apareció en este tiempo y aumentó hasta el final del análisis (48 h), las actividades citoplásmicas se comportaron de manera similar, pero con niveles más bajos que las extracelulares. Ambas actividades enzimáticas exhibieron distintas especificidades de sustrato según su localización celular y tiempo de cultivo, lo que sugiere que escinden grupos funcionales ubicados en ambientes estereoquímicos diferentes. Dado que se observó escisión de los grupos uretano a tiempos tempranos, aun cuando no se detectó actividad uretanasa, se deduce que otro tipo de enzimas deberían estar actuando sobre los grupos uretano en tiempos tempranos. Los experimentos *in vitro* con fracciones de proteínas independientes o combinadas respaldaron la deducción anterior y confirmaron la acción concertada de las actividades de escisión de uretano y esterasa tanto extracelulares como citoplásmicas. Con la información anterior se propone un proceso de dos etapas para la degradación del Impranil por *A. denitrificans* BQ1. Mediante el análisis proteómico diferencial durante el crecimiento de BQ1 en Impranil y acetato como control, se identificaron 448 proteínas expresadas más del doble (fold-change (FC)>2). Entre las proteínas sobreexpresadas se encontraron las que forman parte de la β -oxidación, síntesis de nicotinato y nicotinamida y gluconeogénesis. Además, se encontraron sobreexpresadas proteínas de unión a sustrato (SBP) de Transportadores Tripartita de Tricarboxilatos (TTT) y se identificaron algunas hidrolasas que podrían estar relacionadas con la ruptura de los grupos éster y uretano del Impranil.

ABSTRACT

The concerted action of commercial esterases, proteases, and amidases has been demonstrated to be relevant in polyurethane (PU) degradation by *in vitro* experiments. However, the spatial and temporal dynamics of these activities during PU biodegradation by degrading bacteria have not been addressed. Here, we examined the capability of *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 to biodegrade the polyester (PS)-PU Impranil, analyzed the temporal and spatial coordination between the extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities, and their independent and combined effects on Impranil biodegradation. *A. denitrificans* BQ1 grew in Impranil, and its clearing was correlated with the cleavage of ester and urethane groups since early times, with decrements of some Impranil compounds and the appearance of biodegradation products. While extracellular esterase was active at early times with its maximum at 18 h, urethanase appeared at this time and increased up to the end of the analysis (48 h), with the cytoplasmic activities behaving similarly but with lower levels than the extracellular ones. Both enzymatic activities exhibited distinct substrate specificity depending on their cellular localization and cultivation times, suggesting they cleave differentially located groups. As the urethane cleavage occurred since early cultivation times, when no urethane-cleaving activity was detected, different proteins should be acting at early and late times. *In vitro* experiments with independent or combined cellular protein fractions supported the previous deduction and confirmed the concerted action of extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities. A two-stage process for Impranil degradation by *A. denitrificans* BQ1 is proposed. By differential proteomic analysis, 448 proteins with FC>2 values were identified. Among the overexpressed proteins were those that are part of β -oxidation, the synthesis of nicotinate and nicotinamide, and gluconeogenesis. Furthermore, the substrate-binding proteins (SBPs) of the tricarboxylate tripartite transporters (TTT) were overexpressed, and some hydrolases were identified that could be related to the cleavage of Impranil ester and urethane groups.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Poliuretano (PU)

En 2019, la producción mundial de plásticos alcanzó casi los 370 millones de toneladas. El poliuretano (PU), que es un polímero sintético, representó el 7.9% del total de los plásticos producidos, posicionándose como el sexto plástico más empleado en el mundo (<https://www.plasticseurope.org/en>, [diciembre 2020]). El PU posee una elevada versatilidad disponible en formas que van desde espumas rígidas o flexibles hasta elastómeros rígidos, fibras textiles, e incluso recubrimientos y adhesivos. Actualmente se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones para crear todo tipo de productos industriales y de uso cotidiano debido a su combinación única de características que incluyen excelente resistencia mecánica, buena resistencia a la abrasión, flexibilidad a baja temperatura y resistencia a la corrosión, entre otras (Tian 2020). En la estructura del PU, las unidades básicas son los grupos uretano ($-\text{NHCOO}-$). El primer uretano fue sintetizado en 1849 por Wurtz (Ionescu, 2005), pero fue hasta 1937 que el Dr. Otto Bayer y col. sintetizaron el primer PU mediante un proceso de poli adición de isocianatos con polioles (Avar *et al.* 2012). Cabe señalar que el PU no se caracteriza por tener una estructura simple y repetitiva ya que la diversidad de estructuras está altamente determinada por las propiedades de las materias primas empleadas para su síntesis, entre las cuales se encuentran isocianatos, polioles, tensoactivos, extensores de cadena y catalizadores, además de acrilatos y carbonatos (Sonnenschein 2015).

Los isocianatos proporcionan dureza y rigidez a las estructuras del PU. En el proceso de síntesis se emplean dos clases de isocianatos, aromáticos y alifáticos, los primeros poseen elevada reactividad y ventajas para algunas propiedades mecánicas, mientras que los segundos se usan generalmente en formulaciones para revestimientos y tienen la ventaja de resistir la oxidación causada por la luz. Entre los isocianatos más empleados se encuentran: diisocianato de tolueno (TDI), diisocianato de 4,4'-metilendifenilo (MDI) y hexameten diisocianato (HDI) (Figura 1) (Avar *et al.* 2012).

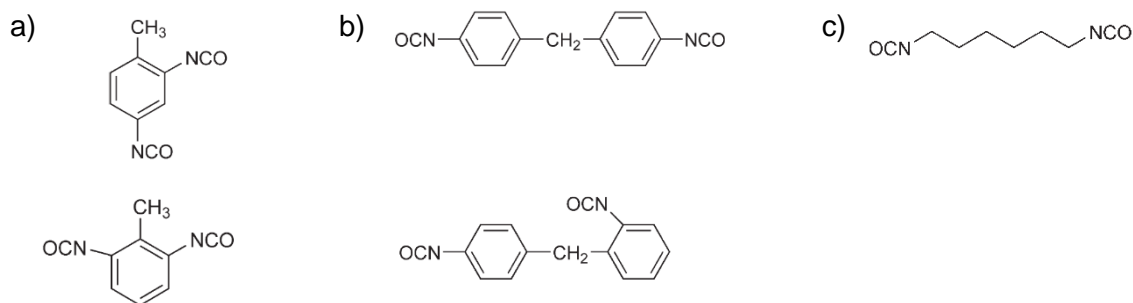


Figura 1. Isocianatos más comunes empleados en la síntesis del PU. a) Isómeros de TDI, b) Isómeros de MDI, c) HDI. Dependiendo de la aplicación, los isómeros son separados o usados como mezcla.

En las formulaciones de PU, los polioles generalmente proporcionan flexibilidad, e industrialmente los más importantes son los de tipo poliéster y poliéter. Los de tipo poliéster son menos estables contra la hidrólisis y proporcionan mejores propiedades físicas mientras que los de tipo poliéter son más resistentes a la hidrólisis, pero menos estables contra la oxidación (Avar *et al.* 2012). Algunos polioles usados en la síntesis de PU se muestran en la Figura 2 (Magnin *et al.* 2020).

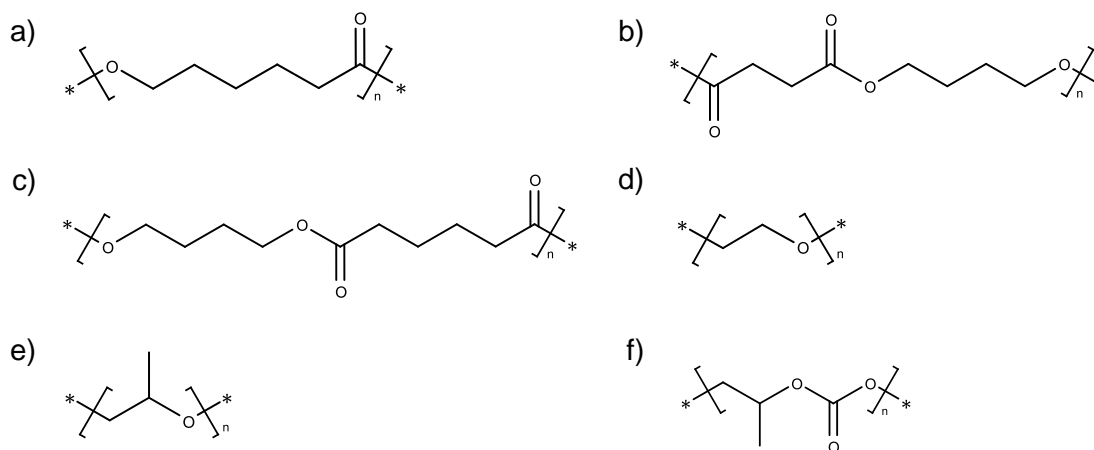


Figura 2. Algunos polioles empleados en la síntesis de PU. a) poli caprolactona, b) poli butilensuccinato, c) poli butilenadipato, d) polietilenglicol, e) poli propilenglicol, f) poli propilencarbonato.

2.1.1 Revestimientos de PU base agua

Debido a los problemas de contaminación ambiental generados por diversos compuestos, la demanda por generar productos amigables con el ambiente se ha incrementado de manera razonable. Como parte del tan necesario cambio, algunos

recubrimientos y adhesivos de PU que solían emplear una base de solventes actualmente emplean una base agua, generando de esta manera un menor impacto ecológico.

Los PU base agua se definen como polímeros reactivos o no reactivos conteniendo grupos uretano y urea estabilizados en agua mediante emulsionantes (Noble 1997). Entre las propiedades exhibidas por este tipo de recubrimientos se encuentran: elevada resistencia a la intemperie y al ataque químico, alta resistencia a la abrasión, excelente adherencia, alto brillo y buena resistencia a la luz (en el caso de revestimientos derivados de isocianatos alifáticos). Dependiendo de su composición, los revestimientos se dividen en productos de uno o dos componentes. Los de un componente se producen a partir de una mezcla estable de diisocianatos y polioles, mientras que los de dos componentes están conformados por reactivos almacenados por separado en dos mezclas, una que contiene polioles, catalizadores y aditivos (componente I) y otra que contiene un endurecedor en forma de diisocianatos (componente II) (Janik *et al.* 2014).

El interés en mencionar los revestimientos de PU base agua radica en que estos han sido utilizados como modelo para el estudio de la biodegradación del PU, lo anterior debido a que las partículas de los polímeros contenidos en estos productos poseen tamaño nanométrico, una mayor superficie de contacto entre el microorganismo degradador y el polímero, así como por su homogeneidad en agua (Magnin *et al.* 2019). El revestimiento base agua más usado con este propósito ha sido el Impranil®DLN W 50, que es una dispersión alifática aniónica de tipo poliéster-PU (PS-PU), comercializada por Covestro (Alemania), cuyos precursores son poli hexano/neopentil adipato poliéster y hexametilen diisocianato (Howard *et al.* 2012). La estructura exacta del Impranil no se conoce aunque se ha propuesto una estructura hipotética (Figura 3) (Biffinger *et al.* 2015).

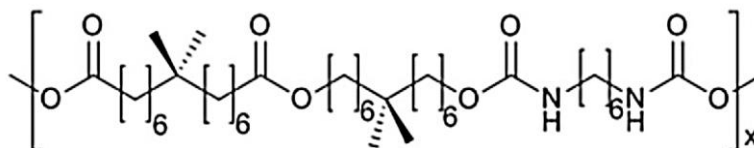


Figura 3. Estructura hipotética del Impranil®DLN W50 (Biffinger *et al.* 2015).

2.1.2 Biodegradación del PU

Debido a la elevada versatilidad y uso del PU, considerables cantidades de residuos contaminantes se han ido acumulando en el ambiente con el paso del tiempo. El manejo de residuos se ha establecido con base en el tipo de material desechado, ya sean productos al final de su vida útil, productos post consumo o desechos de manufactura de PU. Entre los métodos de disposición de residuos de PU se encuentran (Kemonna and Piotrowska 2020):

- Disposición en vertederos (landfill)
- Reciclaje mecánico
- Reciclaje químico
- Incineración
- Biodegradación o degradación biológica

Debido a que la biodegradación es usualmente más amigable con el ambiente, se han dirigido esfuerzos hacia la búsqueda de microorganismos y proteínas capaces de degradar el PU, que puedan ser empleados en procesos biotecnológicos. La biodegradación se define como la descomposición de materiales que ocurre cuando los microorganismos usan una sustancia orgánica como fuente de carbono y energía. Puede ocurrir en condiciones aeróbicas, donde el oxígeno es el aceptor de electrones o en condiciones anaeróbicas, donde el nitrato, sulfato u otro compuesto es el aceptor de electrones (Poznyak *et al.* 2019).

Entre las entidades biológicas capaces de biodegradar al PU se encuentran: bacterias (Tabla 1a), hongos y comunidades microbianas (Tabla 1b). Cabe señalar que la elevada versatilidad de precursores usados en la síntesis de PU genera una gama de estructuras diversa, por lo que resulta complicado encontrar un solo microorganismo o enzima que pueda biodegradar varios tipos de PU.

Tabla 1a. Bacterias relacionadas con la biodegradación de diferentes tipos de PU (Modificado de Magnin *et al.* 2020).

Sustratos de PU	Microorganismos
Recubrimiento de poliéster PU (Impranil)	<i>Acinetobacter gernerii</i> P7 <i>Bacillus pumilus</i> NMSN-1d <i>Pseudomonas putida</i>
Recubrimiento de poliéster PU	<i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 <i>Arthrobacter calcoaceticus</i> ATCC 31012 <i>Arthrobacter calcoaceticus</i> NAV-2 <i>Arthrobacter globiformis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NAV-6 <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17484 <i>Pseudomonas cepacia</i>
Recubrimiento y espumas de poliéster PU	<i>Alicyclophilus</i> sp. BQ8
Poliéster PU termoplástico	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Bacillus subtilis</i> MZA-75 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MZA-85
Recubrimiento de poliéster PU (Impranil) Poliéster PU termoplástico	<i>Bacillus</i> sp.
Poliéter urea PU termoplástico	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Espuma de poliéster PU	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 13388 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 55729
Poliéster y poliéter PU termoplástico	<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35
Poliéster PU termoplástico Espuma de poliéster PU	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.
Poliéter urea PU termoplástico	<i>Escherichia coli</i>
Poliéster PU termoplástico Poliéter urea PU termoplástico	<i>Micrococcus</i> sp.
Poli (amido amina) PU Poliéster PU Recubrimiento de poliéster PU (Impranil) Poli (éster amida) PU Espuma de poliéster PU	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Poliéster PU termoestable Recubrimiento de poliéter PU y poliéster PU (Impranil)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 7814 <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Recubrimiento de poliéster PU (Impranil) Poliéter PU termoplástico	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5
Éster dibutílico del ácido toluen-2,4-dicarbámico	<i>Rhodococcus equi</i> TB-60
Poli (éter urea) PU PU no definido	<i>Staphylococcus aureus</i>
Poliéter PU termoplástico	<i>Staphylococcus epidermidis</i> KH 11

Tabla 1b. Hongos y comunidades microbianas relacionadas con la biodegradación de diferentes tipos de PU (Modificado de Magnin *et al.* 2020).

Sustratos de PU	Microorganismos
Hongos	
Poliéster PU termoplástico	<i>Alternaria</i> sp. <i>Alternaria solani</i> Ss.1-3 <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 <i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i> <i>Aspergillus tubingensis</i> <i>Gliocladium roseum</i> <i>Penicillium</i> section <i>lanata-divaricata</i>
Espuma de poliéter PU	<i>Alternaria</i> sp. PURDK2 <i>Aspergillus niger</i> <i>Cladosporium herbarum</i>
Poliéter PU termoplástico	<i>Alternaria tenuissima</i>
Espuma de poliéster PU	<i>Aspergillus</i> sp.
Recubrimiento de poliéster PU (Impranil) Espuma de poliéter PU Poliéster PU termoplástico	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Recubrimiento de poliéster PU (Impranil)	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Curvularia senegalensis</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Pestalotiopsis microspora</i>
Poliéster PU termoestable y termoplástico	<i>Chaetomium globosum</i>
Recubrimiento de poliéster PU (Impranil) Espuma de poliéter PU	<i>Cladosporium</i> sp. <i>Cladosporium tenuissimum</i> <i>Cladosporium asperulatum</i> <i>Cladosporium montecillanum</i> <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>
Molécula modelo de uretano (N-tolilcarbamato)	<i>Exophiala jeanselmei</i>
Comunidades microbianas	
Espuma de poliéster PU Poliéster PU termoplástico Poliéster PU termoestable	Comunidades microbianas de composta
Espuma de poliéster y poliéter PU	Comunidades microbianas de vertedero de basura
Espuma de poliéster PU	Comunidades microbianas de aguas residuales
Espuma de poliéter PU	Comunidades microbianas de una planta industrial de espumas de PU
Poliéster PU termoplástico	Cultivo mixto de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Comunidades microbianas de suelo, bioaugmentación con hongos degradadores de PU
Poliéster PU Espuma de poliéster y poliéter PU Recubrimiento de PU Poliéster y poliéter PU termoplástico	Comunidades microbianas de suelo
Poliéster PU	Vermiculita inoculada con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Achromobacter marplatensis</i>

2.2 *Alicyclophilus denitrificans*

El género *Alicyclophilus* pertenece a la familia *Comamonadaceae*, subclase β -proteobacteria. Las bacterias de este género presentan motilidad, son oxidasa positiva y Gram-negativas (Mechichi *et al.* 2003). El interés en el género *Alicyclophilus*, representado únicamente por la especie *A. denitrificans*, ha surgido debido a que sus miembros son bacterias ambientales que se encuentran principalmente en sitios contaminados, exhibiendo capacidad para degradar xenobióticos y contaminantes recalcitrantes, además de poseer elevada versatilidad metabólica para adaptarse a entornos desafiantes en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Lo anterior coloca a las cepas de *Alicyclophilus* como candidatas prometedoras para su uso en estrategias biotecnológicas de remediación ambiental (Solís-González y Loza-Tavera 2019).

Actualmente hay siete genomas reportados para *A. denitrificans* (NCBI, Genomes. Consultado: 28 de marzo, 2022) (Tabla 2), única especie reportada para este género.

Tabla 2. Cepas de *Alicyclophilus denitrificans*.

Cepa	Acceso GenBank (NCBI)	Fuente de aislamiento	Referencia
BQ1	GCA_002250385.2	Residuos de espuma de PU de basurero	Facultad de Química, UNAM, 2017
K601^T	GCA_000204645.1	Lodos residuales anaeróbicos	Oosterkamp <i>et al.</i> 2011
BC	GCA_000179015.2	Aguas residuales y suelo contaminado con benceno	
DP3	GCA_012530715.1	Tanque de sedimentos	Shanghai Fisheries Research Institute, China, 2020
CD02	GCA_002894355.1	Lodo de biorreactor	Stanford University, 2018
I51	GCA_016592015.1	Lodos activados	Suenaga <i>et al.</i> 2019
SCN18_25_8_15_R2_B_69_21	GCA_017308615.1	Biorreactor inoculado con lodos activados	University of California, Berkeley, 2021

La cepa tipo es K601^T, fue aislada de una planta de tratamiento de aguas residuales, usando ciclohexanol como única fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones (Dangel *et al.* 1988). *A. denitrificans* cepa BQ1 se aisló a partir de una pieza de espuma de PU en descomposición colectada en el basurero Bordo de Xochiaca (Nezahualcóyotl, Edo. de México). BQ1 es capaz de degradar el barniz de tipo PS-PU

Hydroform[®], además de la *N*-metil-2-pirrolidona, la cual es una amida cíclica usada como aditivo en la manufactura de barnices de PU (Oceguera-Cervantes *et al.* 2007; Solís-González *et al.* 2018).

2.3 Proteínas relacionadas con la degradación del PU

Dependiendo de los precursores usados en la síntesis de PU, las enzimas relacionadas con su degradación han sido identificadas como oxidorreductasas (EC 1) e hidrolasas (EC 3). En la estructura de los diferentes tipos de PU, los enlaces éster (R-C(=O)-O-R') son los más abundantes y susceptibles de ser escindidos, su hidrólisis por esterasas y/o lipasas ha sido demostrada mediante diferentes técnicas analíticas (Howard *et al.* 2001; Rowe and Howard 2002; Cregut *et al.* 2013; Shah *et al.* 2013; Biffinger *et al.* 2015; Pérez-Lara *et al.* 2016; Gaytán *et al.* 2020). Entre las esterasas y lipasas involucradas en la degradación del PU (Tabla 3a) se han identificado aquellas que contienen el motivo distintivo serina hidrolasa Gly-X¹-Ser-X²-Gly, tales como la esterasa PudA de *Comamonas acidovorans* TB-35 (Nomura *et al.* 1998); la lipasa extracelular PulA de *Pseudomonas fluorescens* (Vega *et al.* 1999); la esterasa extracelular PueA y la esterasa/lipasa extracelular PueB de *P. chlororaphis* (Howard *et al.* 2001; Stern y Howard, 2000).

Por otro lado, el PU contiene también en su estructura el característico y recalcitrante grupo uretano o carbamato (R-NH-C(=O)-O-R') y aunque hay varios trabajos relacionados con la hidrólisis de grupos uretano en insecticidas (Tomasek and Karns 1989; Zhang *et al.* 2012; Rousidou *et al.* 2017; Jiang *et al.* 2020) y bebidas alcohólicas (Zhao and Kobashi 1994; Yang *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2014; Liu *et al.* 2017), muy pocas proteínas relacionadas con la hidrólisis de los grupos uretano del PU han sido reportadas (Tabla 3b).

Tabla 3a. Proteínas relacionadas con la degradación del PU (Modificado de Magnin *et al.* 2020).

Nombre de la proteína	Origen	Sustrato modelo	Referencia
PS-hidrolasas: Tcur0390, Tcur1278, TfCut2	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183 <i>Thermobifida fusca</i> KW3	Poliéster PU termoplástico Impranil	Schmidt <i>et al.</i> 2017
Esterasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Impranil	Rowe y Howard, 2002
Esterasa	<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35	Impranil	Allen <i>et al.</i> 1999
Esterasa	<i>Curvularia senegalensis</i>	Impranil	Crabbe <i>et al.</i> 1994
Esterasa E3576	Protéus	Impranil	Magnin <i>et al.</i> 2019
Esterasa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Impranil	Biffinger <i>et al.</i> 2015
Lipasa	<i>Cryptococcus</i> sp. MTCC5455	Poliéster PU termoplástico	Thirunavukarasu <i>et al.</i> 2015
Lipasa	<i>Pseudomonas cepacia</i>	PU termoplástico	Zhou y Xie, 2017
Lipasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	Impranil	Biffinger <i>et al.</i> 2015
Lipasa	<i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Rhizopus delemar</i>	Poliéster PU termoplástico	Tokiwa <i>et al.</i> 1988
Lipasa	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Poli (éster urea) PU termoplástico Poliéster PU termoestable	Fang <i>et al.</i> 2014 Wu <i>et al.</i> 2016
Esterasa	Hígado porcino	Poliéster PU termoplástico	Li y Yang 2006
Lipasa	<i>Candida antarctica</i>	Poliéster PU termoplástico Recubrimiento de poliéster PU	Takamoto <i>et al.</i> 2001 Liu <i>et al.</i> 2016
Lipasa	<i>Candida cylindracea</i>	Poliéster PU termoplástico	Kim y Kim 1998
Lipasa	<i>Candida rugosa</i>	Poliéster PU termoplástico Impranil	Li <i>et al.</i> 2015 Gautam y Yanful 2007
Lipasa	Páncreas porcino	Espuma de poliéster PU Poliéster y poliéter PU termoplástico	Brzeska <i>et al.</i> 2015 Ferris <i>et al.</i> 2010

Tabla 3b. Proteínas relacionadas con la ruptura de los grupos uretano del PU.

Nombre de la proteína	Origen	Sustrato modelo	Referencia
Subtilisina	No especificado	Poli (amida-uretano)	Huang y Roby 1986
Papaína	Boehringer Mannheim	Poliéter uretano (Biomer®)	Phua <i>et al.</i> 1987
Uretano hidrolasa	<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Compuestos conteniendo ácido dicarbámico dibutil-éster	Akutsu-Shigeno <i>et al.</i> 2006
Amidasa	<i>Nocardia farcinica</i>	1-metoxipropan-2-yl (4-nitrofenil) carbamato	Gamerith <i>et al.</i> 2016
Carboxil-ester hidrolasa (CE_Ubrb)	Microbioma de rumen bovino	Fenobucarb	Ufarté <i>et al.</i> 2017
Amidasa E4143	Protéus	butil N-(4-toluensulfonil) carbamato	Magnin <i>et al.</i> 2019

En la búsqueda de proteínas capaces de degradar el PU, se ha observado que la participación concurrente de más de una actividad hidrolítica favorece el proceso degradativo. Se encontró que las mezclas binarias conteniendo esterasa de hígado porcino (Sigma Aldrich) y las proteasas, DSM (Cognis) o pellucit FS (Cognis), mostraban una mejor degradación en dos tipos de PU que la esterasa individual (Ozsagiroglu *et al.* 2012). Recientemente se reportó el efecto sinérgico de dos enzimas comerciales, esterasa E3576 y amidasa E4143 (Protéus, Francia), sobre la degradación de un PU termoplástico, indicando que las actividades cooperativas de esterasa y amidasa/proteasa deben ser fundamentales para una mejor biodegradación del PU (Magnin *et al.* 2019). En vista de lo anterior, durante la biodegradación bacteriana del PU, la acción concertada de las actividades esterasa y uretanasa podría también ser crucial para un proceso exitoso. Sin embargo, dicho fenómeno no ha sido abordado de forma experimental hasta ahora.

2.4 Búsqueda de vías metabólicas relacionadas con la degradación del PU

La búsqueda de proteínas relacionadas con la degradación del PU se ha centrado principalmente en la investigación de proteínas capaces de romper el polímero. Sin embargo, la identificación de las vías metabólicas empleadas por las bacterias degradadoras de PU ha sido escasamente abordada. La elucidación de estas vías permitirá tener una comprensión más completa del proceso degradativo, además, con

este conocimiento se podrán generar nuevas estrategias de remediación para contender con los desechos del PU.

Gracias a la aparición de tecnologías avanzadas de cromatografía líquida y espectrometría de masas para caracterizar mezclas complejas de proteínas se ha impulsado enormemente el campo de la proteómica. El análisis global de proteínas, que son las entidades funcionales clave en la célula, mediante proteómica total diferencial, permite encontrar aquellas proteínas cuyo nivel de sobreexpresión es más elevado en cierta condición de crecimiento. En este trabajo se identificaron algunas de las vías metabólicas que BQ1 despliega cuando crece en presencia de Impranil como única fuente de carbono mediante proteómica total diferencial.

3. HIPÓTESIS

Para el presente trabajo se proponen las siguientes hipótesis:

- Dado que *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 es capaz de crecer usando poliuretano como única fuente de carbono y sabiendo que la participación concurrente de más de una actividad hidrolítica favorece la escisión de los enlaces éster y uretano de la estructura del poliuretano se propone que actividades de tipo esterasa y uretanasa actúan de manera concertada durante el metabolismo degradativo de la bacteria sobre el polímero.
- Dado que el Impranil®DLN es una dispersión alifática de tipo PS-PU y que *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 es capaz de degradarlo, entonces durante la degradación de este polímero BQ1 expresará proteínas relacionadas con el metabolismo de compuestos alifáticos.

4. OBJETIVOS

Generales

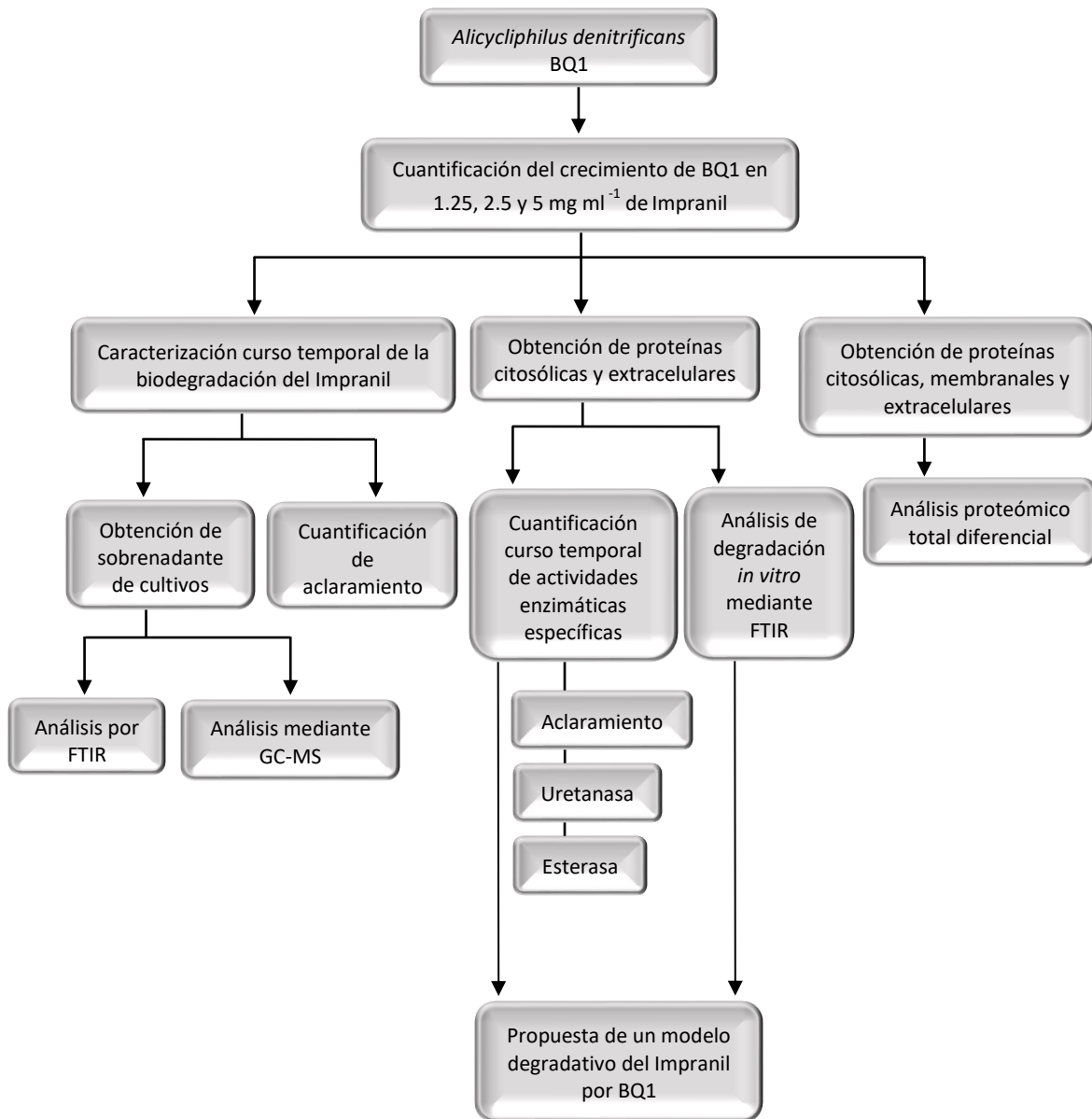
Caracterizar la biodegradación del Impraniil®DLN, una dispersión alifática de tipo PS-PU, por *Alicycliphilus denitrificans* BQ1. Analizar si BQ1 expresa actividades capaces de escindir los grupos éster y uretano y cómo se coordinan las actividades esterasa y uretanasa citosólicas y extracelulares durante la biodegradación del Impraniil®DLN.

Analizar el perfil proteómico de *Alicycliphilus denitrificans* BQ1 creciendo en Impraniil®DLN para proponer la(s) vía(s) involucradas en el proceso degradativo.

Particulares

1. Cuantificar el crecimiento de *Alicycliphilus denitrificans* BQ1 en Impraniil®DLN
2. Cuantificar el aclaramiento curso-temporal del Impraniil®DLN generado por BQ1
3. Identificar los grupos funcionales del Impraniil®DLN que son modificados por la actividad biológica de BQ1 mediante FTIR
4. Identificar algunos metabolitos producto de la degradación del Impraniil®DLN por BQ1 usando GC-MS
5. Cuantificar las actividades específicas curso temporales de aclaramiento, esterasa y uretanasa de BQ1 creciendo en Impraniil®DLN. Realizar una caracterización bioquímica preliminar de la actividad uretanasa
6. Determinar si entre las actividades esterasa y uretanasa existe una acción concertada durante la degradación del Impraniil®DLN
7. Identificar las proteínas sobreexpresadas de BQ1 creciendo en Impraniil®DLN mediante proteómica total diferencial
8. Proponer un modelo para la degradación del Impraniil®DLN por BQ1

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada en este estudio (objetivos particulares 1-6 y 8) se encuentra descrita en el artículo: Fuentes-Jaime J., Vargas-Suárez M., Cruz-Gómez MJ., and Loza-Tavera H. 2022. Concerted action of extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities during Impranil biodegradation by *Alicyclophilus denitrificans* BQ1. *Biodegradation* 33(4): 389-406. <https://doi.org/10.1007/s10532-022-09989-8> (Anexo V).

La metodología empleada para la caracterización bioquímica parcial de la actividad uretanasa (objetivo particular 5) y los análisis proteómicos (objetivo particular 7) se describe a continuación.

6.1 Caracterización bioquímica parcial de la actividad uretanasa citoplásmica

Se realizó la caracterización preliminar de la actividad uretanasa citoplásmica. Para ello, se determinó el efecto de diferentes pHs en amortiguador McIlvaine (3 a 8) sobre la actividad uretanasa citoplásmica proveniente de cultivos de 36 h. El efecto de diferentes concentraciones de NaCl (0.2-1 M) y etilenglicol o glicerol (10% v/v) usando amortiguador McIlvaine pH 8 se realizó utilizando 10 µg de proteínas citoplásmicas. Además, se ensayó el efecto de los agentes reductores (ditiotreitolo (DTT) 5 mM y β-mercaptoetanol (BME) 10 mM), inhibidores de unión a serina (benzamidina 1 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM) y un inhibidor de unión a metales (fenantrolina 200 mM). Para ello, 20 µg de proteínas citoplásmicas provenientes de cultivos de 30 h se incubaron durante 10 min a 37°C en amortiguador McIlvaine pH 8, conteniendo uno de los compuestos, y posteriormente se añadió uretano 50 mM para cuantificar la actividad uretanasa.

Para el intento de purificación de la actividad uretanasa citoplásmica se utilizó el equipo Äkta Avant 25 Health Care (General Electric). Todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C. Las proteínas citoplásmicas (24 mg) de cultivos de 36 h se cargaron en una columna Superdex 200 (prep grade) Amersham Biosciences (5 x 100 cm), equilibrada previamente con amortiguador McIlvaine pH 8 y glicerol 10 % (v/v). Las proteínas se eluyeron de la columna con el mismo amortiguador de equilibrio a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. Las fracciones con actividad uretanasa se agruparon y se cargaron en una columna de cromatografía de intercambio aniónico HiScreen

Capto™ Q (Millipore Sigma) (0.77 x 10 cm) pre-equilibrada con amortiguador McIlvaine pH 8 y glicerol 10% (v/v). La columna se lavó con 35 ml de amortiguador de equilibrio a una velocidad de flujo de 0.5 ml min⁻¹ y las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl en 60 ml del mismo amortiguador a una velocidad de flujo de 0.5 ml min⁻¹.

6.2 Selección de la fuente de carbono para los análisis de proteómica total diferencial

El establecimiento del inóculo y la cuantificación del crecimiento de BQ1 se realizó como se describe en Fuentes-Jaime y col. (2022). El medio mínimo (MM) empleado fue el reportado por Nakajima-Kambe y col. (1995). Las fuentes de carbono usadas para cuantificar el crecimiento de BQ1 y poder elegir el control para los estudios proteómicos fueron: acetato 25 mM, glucosa 25 mM, malato 10 y 25 mM y succinato 10 y 25 mM (Mechichi *et al.* 2003).

6.3 Obtención de proteínas extracelulares, citosólicas y membranales a partir de cultivos de BQ1 creciendo en Impranil y acetato

Para la extracción de proteínas se usaron 300 ml de cultivos MM-Impranil (1.25 mg ml⁻¹) y MM-acetato (25 mM) distribuidos en tres matraces de 500 ml y se incubaron 22 h (Impranil) y 16 h (acetato) a 37°C y 200 rpm con base en crecimiento equivalente en ambas fuentes de carbono. Para obtener las proteínas extracelulares los medios de cultivo se centrifugaron a 8,631 x g (rotor JA-14, Avanti JXN-26, Beckman Coulter) a 4°C durante 20 min. Se colectó el sobrenadante y se concentró mediante ultrafiltración (Cell 8400, Amicon) usando membranas de corte de 10 kDa y manteniendo el sistema en hielo. Las proteínas concentradas se lavaron tres veces con 5 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7. Para la obtención de las proteínas citosólicas, el pellet obtenido en la centrifugación previa se resuspendió y lavó 3 veces con buffer de fosfatos frío 50 mM, pH 7. En el último lavado el pellet se resuspendió en 2 ml de buffer de fosfatos y las células se lisaron en frío usando ultrasonificación (Vibra Cell, VCX 750, Sonics & Materials Inc.), 6 ciclos de pulsos de 15 s por 15 s de descanso a una amplitud de 21%. La suspensión obtenida se ultracentrifugó a 100,000 x g durante 40 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en el cual se encontraban las proteínas citosólicas. Para la obtención de las proteínas membranales, el pellet obtenido después de la ultracentrifugación se lavó 3 veces con buffer de fosfatos y después del último lavado

se resuspendió con buffer Tris 62 mM, SDS 1% y se dejó en agitación 12 h a 4°C. Pasado el tiempo se centrifugó a 20,800 x g (Microcentrifuga 5417C, Eppendorf) durante 15 min a 4°C y se recuperaron las proteínas membranales localizadas en el sobrenadante. Para la cuantificación de las proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

6.4 Proteómica total diferencial

Con el objetivo de eliminar contaminantes en las muestras de proteínas de los diferentes compartimentos, 250 µg de cada una de las tres fracciones se corrieron en un gel SDS-PAGE. Para ello, se mezclaron con buffer de carga para SDS-PAGE (Tris-HCl 0.3 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.04% y β-mercaptoetanol 4%), se desnaturalizaron a 95°C durante 10 min, se cargaron en un gel apilador SDS (5%) y se corrieron a 30 mA durante 40 min sin que las proteínas se separaran en el gel separador (Mini-PROTEAN 3 cell, BIO-RAD). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (BIO-RAD, No. Cat. 1610400), cada banda de proteínas fue escindida del gel y enviada a nuestro colaborador, el Dr. David Schleheck, quien envió las muestras a analizar en las instalaciones de Proteómica de la Universidad de Konstanz Alemania, para su identificación mediante peptide fingerprinting mass spectrometry (PF-MS). Cada muestra se realizó por duplicado. Las muestras fueron digeridas con tripsina y analizadas en un Orbitrap Fusion EASY-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific), los espectros de masas en tándem se buscaron contra todas las secuencias de proteínas predichas del genoma de *A. denitrificans* BQ1 utilizando Mascot (Matrix Science) y Proteome Discoverer V1.3 (Thermo Fisher Scientific) considerando digestión con tripsina, alquilación de cisteínas por cloroacetamida y oxidación variable de metionina. El análisis proteico “bottom up” fue realizado de acuerdo con los protocolos establecidos por las instalaciones de proteómica de la Universidad de Konstanz, Alemania (www.proteomics-facility.uni-konstanz.de).

6.5 Análisis bioinformático

La reconstrucción de las vías metabólicas diferenciales se realizó mediante la comparación de asignaciones KO (KEGG Orthology) usando la base de datos KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation) (<https://www.kegg.jp/blastkoala/con>) e ingresando bacteria como grupo taxonómico y especie procarionte en el archivo de base de datos de KEGG GENES.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte de los resultados y discusión generados durante el trabajo de doctorado se encuentran publicados en el artículo: Fuentes-Jaime J., Vargas-Suárez M., Cruz-Gómez MJ., and Loza-Tavera H. 2022. Concerted action of extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities during Impranil biodegradation by *Alicyclophilus denitrificans* BQ1. *Biodegradation*. 33(4): 389-406. <https://doi.org/10.1007/s10532-022-09989-8> (Anexo V). A continuación, se muestra un resumen de los resultados y discusión incluidos en el artículo mencionado anteriormente.

7.1 *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 utiliza el Impranil como única fuente de carbono para crecer escindiendo los grupos éster y uretano

Diferentes cepas del género *Alicyclophilus* son capaces de biodegradar varios contaminantes orgánicos, recubrimientos de PU (Hydroform® y PolyLack®) y espumas, lo cual sugiere que este género podría ser útil para la biorremediación de xenobióticos (revisado en Solís-González y Loza-Tavera, 2019). Sin embargo, los mecanismos bioquímicos subyacentes que participan en la degradación del PU siguen siendo desconocidos. Debido a lo anterior, en este trabajo se investigan temporal y espacialmente las actividades de *A. denitrificans* BQ1 de tipo esterasa y aquellas capaces de romper grupos uretano relacionadas con la degradación del PS-PU Impranil. El Impranil se ha usado como un sustrato modelo para estudiar la biodegradación microbiana del PU debido a la fácil supervisión de su aclaramiento durante el proceso (Blake *et al.* 1998; Pathirana y Seal, 1984; Russel *et al.* 2011). En este trabajo se realizaron todos los experimentos en medio mínimo con Impranil 1.25 mg ml⁻¹, el cual produjo el mejor crecimiento de *A. denitrificans* BQ1 (Figura 4a). El máximo aclaramiento del Impranil (Figura 4b) coincidió con las disminuciones más significativas en las señales de los grupos éster C=O y uretano C-N, C-O-C detectadas en los sobrenadantes de cultivo mediante FTIR (Figura 5) con su máximo al comienzo de la fase estacionaria (24 h) (Figura 4b).

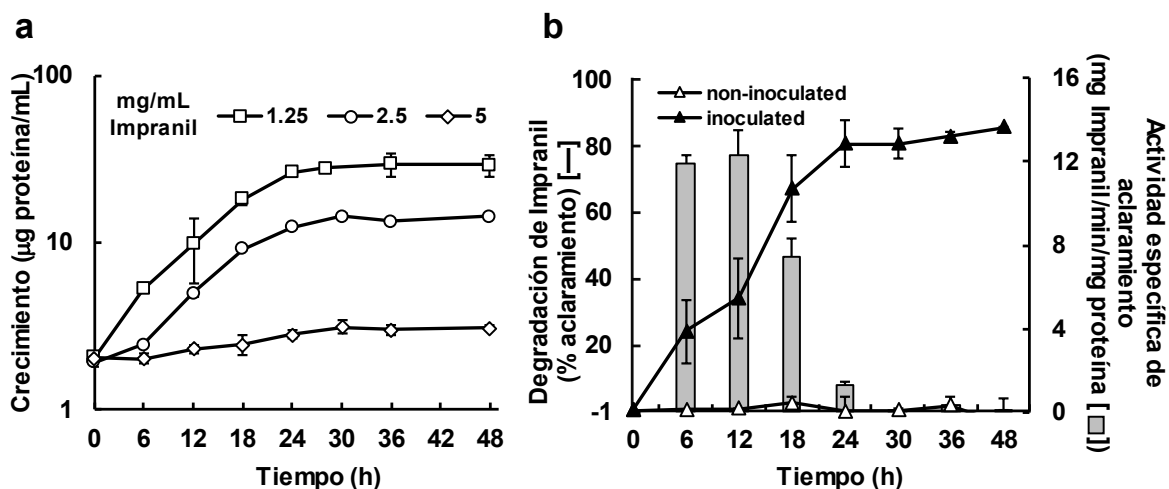


Figura 4. Crecimiento de *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 en MM-Impranil y degradación del Impranil. a) Crecimiento de *A. denitrificans* BQ1 usando diferentes concentraciones de Impranil. b) Aclaramiento del Impranil en MM-Impranil inoculado con BQ1 y no inoculado y actividad específica de aclaramiento cuantificada en cultivos de BQ1 a diferentes tiempos de incubación. Los datos son el promedio de tres réplicas biológicas. Las barras representan la desviación estándar.

La escisión de los grupos uretano también se reveló por los cambios fluctuantes en la señal correspondiente a las aminas (3324 cm^{-1}) observados en diferentes momentos a lo largo del análisis temporal (Figura 5). Estos cambios sugieren que las aminas fueron generadas continuamente por biofragmentación del polímero y asimiladas por BQ1 durante su crecimiento en Impranil. La biofragmentación, también denominada despolimerización, se ha definido como el proceso lítico necesario para la posterior asimilación de los componentes del polímero. La biofragmentación y la posterior etapa de asimilación son procesos relacionados con los diferentes grados de biodegradación de los polímeros y preceden a la mineralización, que es la transformación final del polímero a CO_2 , H_2O y NH_4^+ (Ali *et al.* 2021; Lucas *et al.* 2008). Se ha observado que algunas aminas incrementan su concentración debido a la hidrólisis de grupos uretano de PU sólido durante el cultivo de *Pseudomonas* sp. DBFIQ-P36 (Spontón *et al.* 2013), *Alicyclophilus* sp. BQ8 (Pérez-Lara *et al.* 2016), y en el análisis de la actividad uretanasas de *Rhodococcus hoaggi* TB-60 al hidrolizar el éster dibutílico del ácido toluen-2,4-dicarbámico, un compuesto relacionado con el PU (Akutsu-Shigeno *et al.* 2006). Por lo tanto, nuestros resultados aportan evidencia de que además de la hidrólisis de los grupos éster, los grupos uretano también son escindidos por BQ1.

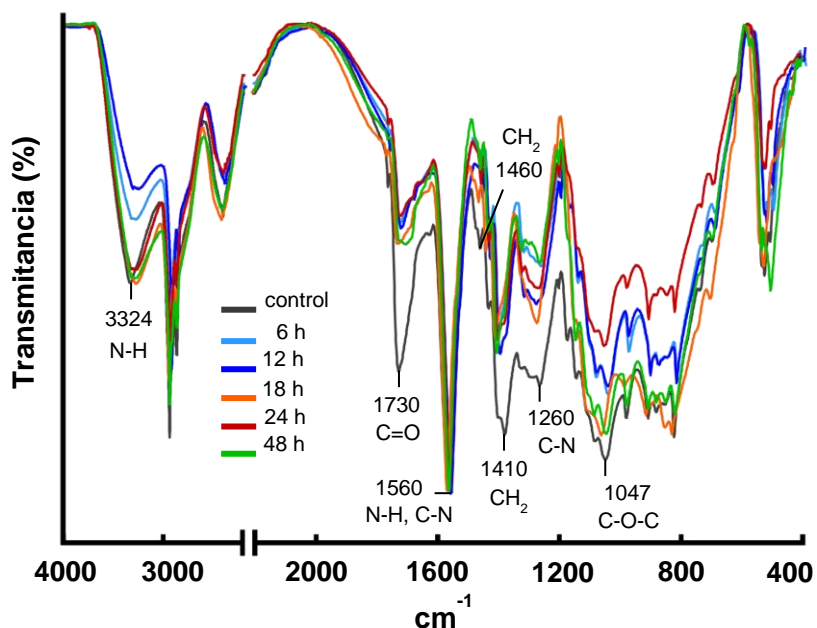


Figura 5. Análisis de la biodegradación del Impranil por *A. denitrificans* BQ1 mediante espectroscopia FTIR. Los espectros se obtuvieron a partir de los sobrenadantes de cultivos de MM-Impranil no inoculado (control) e inoculado con *A. denitrificans* BQ1 incubados a 37°C y 200 rpm durante diferentes tiempos de cultivo. Se muestran los espectros representativos de cuatro réplicas biológicas.

Respaldando los resultados de FTIR, el análisis GC-MS reveló que los sustratos que constituyen el polímero Impranil se liberaron, fluctuando a lo largo del tiempo de cultivo; algunos de ellos, como los compuestos 1 y 2, con tendencia a aumentar, sugiriendo que fueron poco o nada asimilados; o a reducirse, como los compuestos 3 y 4, indicando que fueron asimilados por la bacteria. Además, la mayoría de los compuestos de tipo plastificante, tales como los compuestos 5, 6, 7 y 8, se metabolizaron parcial o totalmente. Adicionalmente, algunos compuestos de degradación aparecieron y disminuyeron o desaparecieron en los análisis finales (24 h), lo que indica su metabolización (Figura 6). Estos hallazgos evidencian la capacidad metabólica de *A. denitrificans* BQ1 para degradar el PS-PU y algunos plastificantes usados en el barniz.

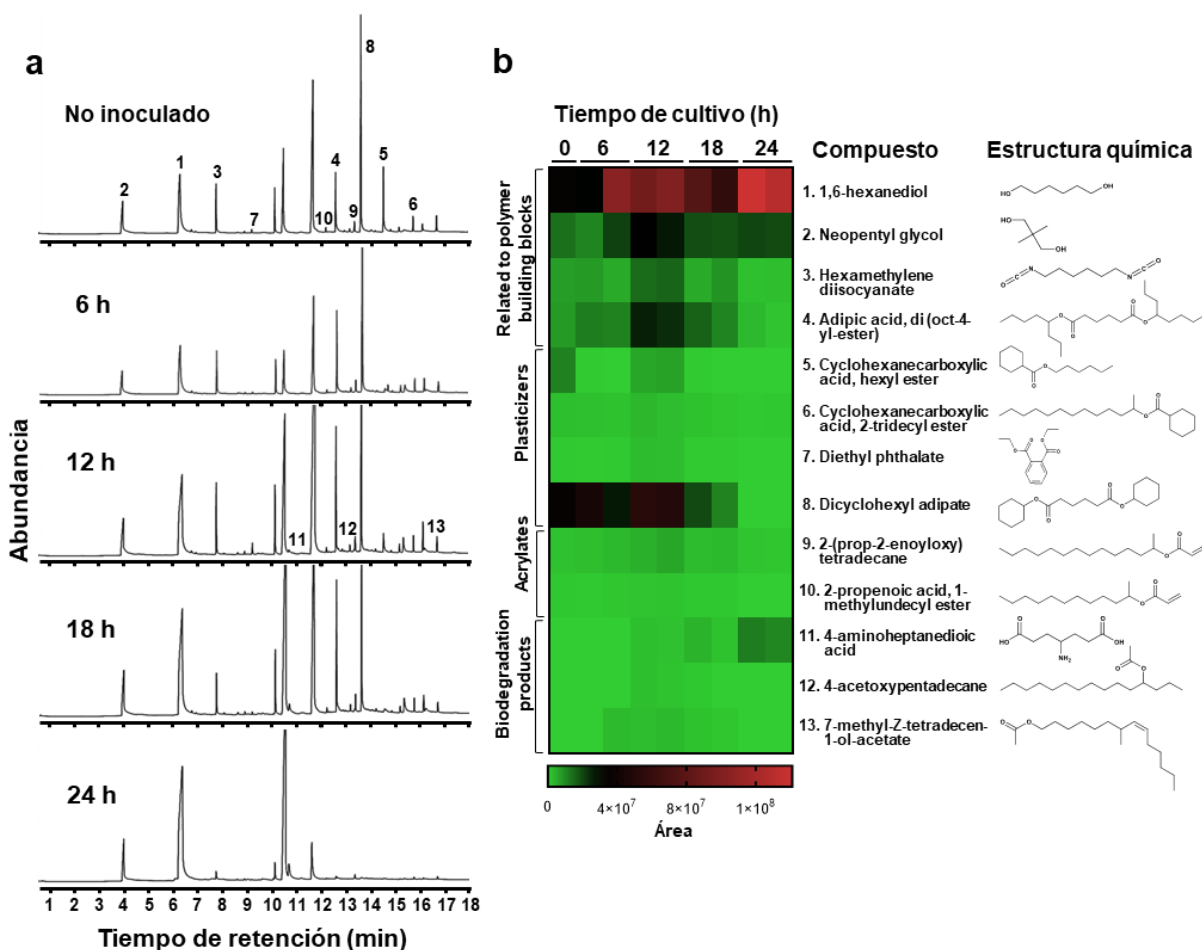


Figura 6. Análisis curso temporal mediante GC-MS de la degradación del Impranil por *A. denitrificans* BQ1. Los sobrenadantes de diferentes tiempos de cultivo inoculados y no inoculados (tiempo 0) incubados a 37 °C y 200 rpm fueron sometidos a una extracción orgánica con metanol:cloroformo (1:1, v/v). a) Cromatogramas representativos de los diferentes tiempos analizados. Los números en las señales de los cromatogramas corresponden a los números de los compuestos en el mapa de calor. b) Mapa de calor representando el área de las señales correspondientes a los diferentes compuestos identificados y sus fórmulas en los tiempos de cultivo indicados. Los compuestos se identificaron por comparación usando el NIST Mass Spectrometry Data Center (2002 library).

7.2 Durante la biodegradación del Impranil se exhibe una acción concertada entre esterasas y uretanasas, tanto extracelulares como citoplásmicas

Los análisis de las actividades de tipo esterasa y aquellas capaces de romper los grupos uretano tanto extracelulares como citoplásmicas de *A. denitrificans* BQ1 (Figura 7), así como los efectos que estas fracciones de proteína solas o combinadas produjeron en el PS-PU Impranil revelaron una acción concertada que permite un ataque eficaz al polímero.

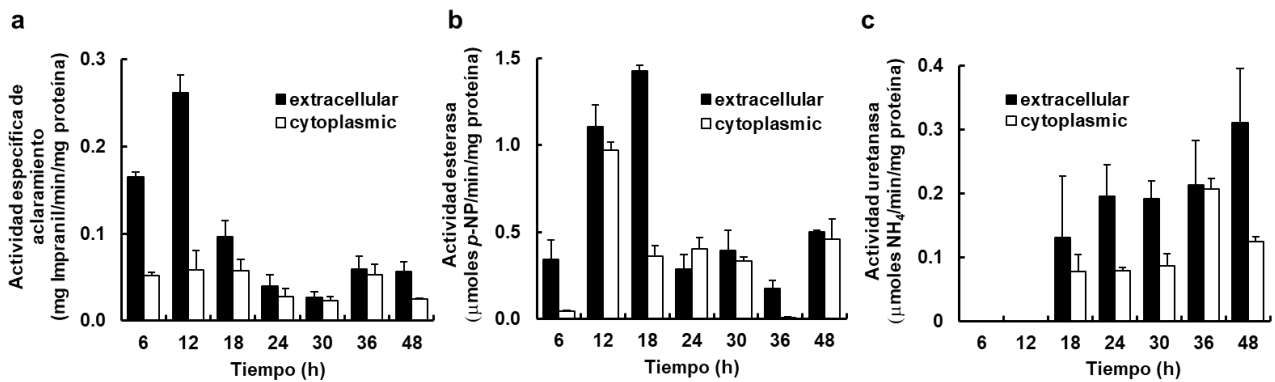


Figura 7. Aclaramiento del Impranil y actividades esterasa y uretanaso de proteínas extracelulares y citoplásmicas de *A. denitrificans* BQ1 cultivada en MM-Impranil. Las proteínas extracelulares y citoplásmicas se obtuvieron en los tiempos indicados. Cada reacción se llevó a cabo usando 10 μg de proteína. a) El aclaramiento del Impranil se cuantificó a 600 nm en ensayos *in vitro* utilizando Impranil 1.25 mg ml⁻¹. b) La actividad esterasa se cuantificó a 405 nm usando *p*-NPA 5 mM como sustrato. c) La actividad uretanaso se determinó a 636 nm con uretano 50 mM como sustrato. Las barras representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.

Con base en estos resultados, se propone un proceso de dos etapas que integra espacial y temporalmente la acción concertada de las actividades esterasa y aquellas capaces de escindir los grupos uretano, que participan en la biodegradación de Impranil (Figura 8). En la primera etapa (0 a 18 h), que corresponde a la fase de crecimiento activo, la alta actividad esterasa en la fracción extracelular escinde los enlaces éster del PS-PU Impranil fragmentando el polímero en cadenas más cortas con carboxilatos o alcoholes en sus extremos. Aunque se ha reportado que la actividad de tipo lipasa es más eficaz que la esterasa en la biodegradación del Impranil (Biffinger *et al.* 2015), las actividades de tipo esterasa extracelulares y citoplásmicas de BQ1 hidrolizaron sustratos de cadena corta pero no de cadena larga; por lo tanto, la actividad de tipo esterasa, pero no lipasa es activa en esta etapa. Coincidiendo con esta observación, en *Acinetobacter gernerii* P7, una esterasa degradadora de Impranil mostró mejor actividad hidrolítica con sustratos de cadena corta como *p*-nitrofenil-acetato, *p*-nitrofenil-propionato (con mayor actividad) y *p*-nitrofenil-butirato, pero no se detectó actividad cuando se usaron sustratos de cadena larga como *p*-nitrofenil-caproato o *p*-nitrofenil-caprilato (Howard *et al.* 2012). Después de la acción de las esterases extracelulares de BQ1, los carboxilatos producidos se podrían internalizar en la célula mediante transportadores periplásmicos tripartitas independientes de ATP (TRAP), transportadores de tricarboxilatos tripartitas (TTT), o ambos.

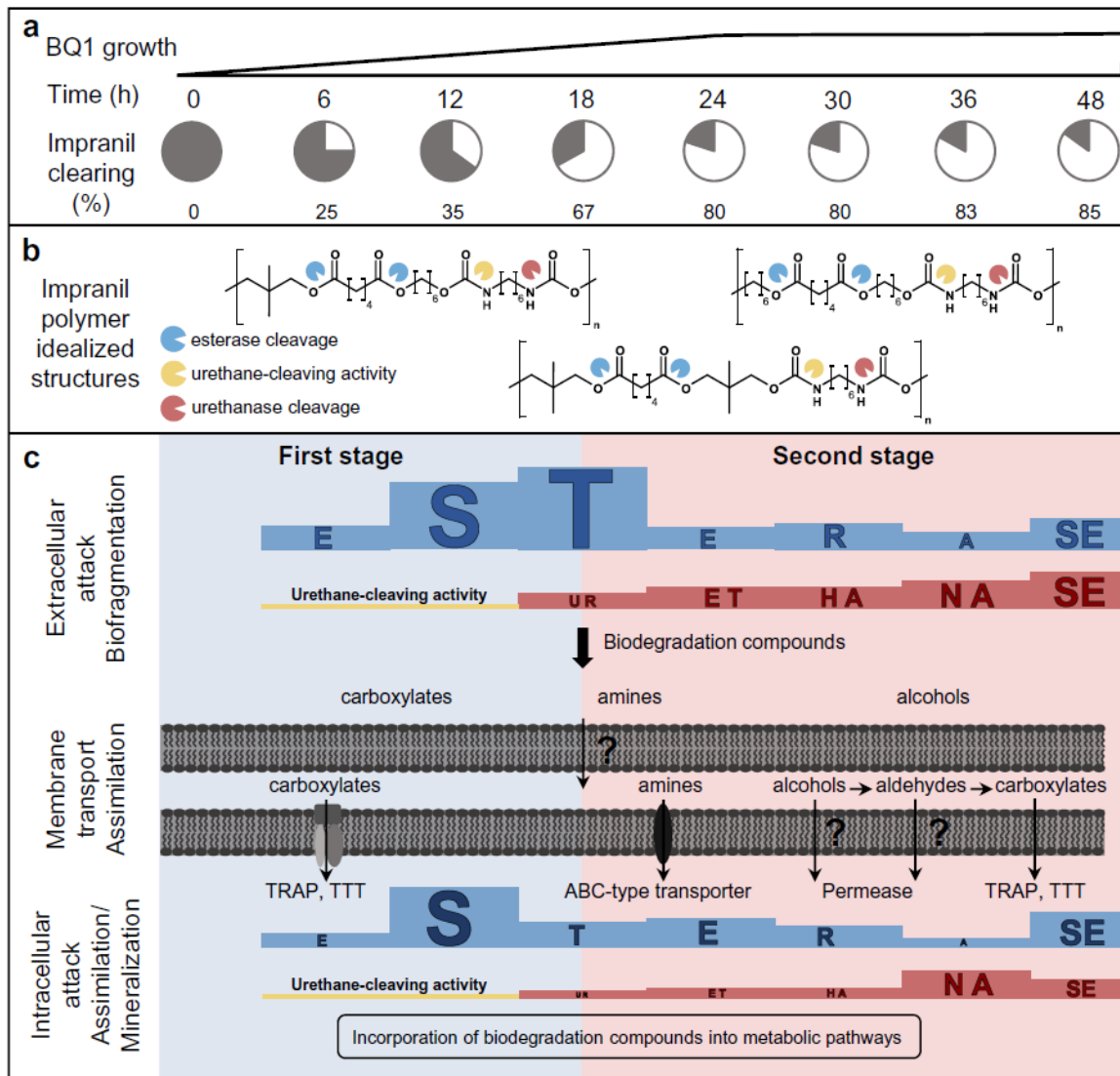


Figura 8. Modelo propuesto para la acción concertada de las actividades esterasa y de escisión del uretano de *A. denitrificans* BQ1 durante la degradación de Impranil. a) BQ1 usa el Impranil como única fuente de carbono alcanzando su máximo crecimiento y aclaramiento del Impranil a las 24 h. b) El Impranil es una dispersión coloidal base agua de tipo PS-PU sintetizada a partir de poli hexano/neopentil poliéster adipato y HDI. Mediante polimerización de tipo “step-growth”, estos compuestos pueden reaccionar aleatoriamente generando diferentes segmentos de polímero donde los grupos uretano estarían flanqueados por distintos grupos funcionales, proporcionando composiciones estructurales químicas específicas para ser atacadas por actividades enzimáticas. c) Durante la biodegradación del Impranil BQ1 exhibe de forma concertada proteínas de tipo esterasa y de escisión del uretano expresadas en dos etapas (los niveles de actividad están representados por las alturas de las barras azul y roja y el tamaño de la letra).

Los transportadores TRAP internalizan diferentes aniones orgánicos y C4-dicarboxilatos, mientras que los TTT introducen C6-di o tricarboxilatos en la célula. Cada tipo de transportador está formado por dos proteínas transmembranales y una

proteína de unión a sustrato (substrate binding protein, SBP) periplásmica de alta afinidad (revisado por Rosa *et al.* 2018). Interesantemente, de los siete genomas de *A. denitrificans* anotados hasta ahora, la cepa BQ1 tiene el mayor número de genes que codifican SBP de TTT (164 genes que no son isoformas). Este mayor número de genes de SBPs podría proporcionar a BQ1 una mayor versatilidad para reconocer e internalizar diferentes carboxilatos para ser metabolizados en el citoplasma. Por otro lado, los alcoholes, el otro producto de la escisión de los grupos éster, pueden ser oxidados en el periplasma por deshidrogenasas formando los aldehídos y carboxilatos correspondientes (Cuenca *et al.* 2016; Kawai 2010), los cuales pueden ser internalizados por TRAP, TTT o permeasas al citoplasma (Kawai 2010). De manera general, los carboxilatos y alcoholes resultantes de la oxidación se internalizan en las células bacterianas para su posterior asimilación en el citoplasma (Ali *et al.* 2021; Lucas *et al.* 2008). Dado que en los sobrenadantes de cultivo se observaron disminuciones en las señales de los grupos uretano desde los primeros tiempos de crecimiento bacteriano (Figura 5), se esperaba detectar actividad uretanasa extracelular. Sin embargo, esta actividad no se observó ni a las 6 ni a las 12 h de cultivo (Figura 7c). Por lo tanto, debido a que en el ensayo *in vitro*, la actividad uretanasa de 36 h fue capaz de escindir sustratos con grupos carbamoilo libres (Tabla 1), pero no se observó actividad uretanasa antes de las 18 h, razonamos que otras proteínas diferentes a las que actúan a las 36 h realizaron la escisión de los grupos uretano. Estas enzimas que escinden el uretano en tiempos tempranos deberían actuar en grupos uretano específicos flanqueados por estructuras químicas distintivas. La existencia de diferentes estructuras químicas en el PU es concebible con base en las reacciones de polimerización de tipo “step-growth”, las cuales pueden generar grupos uretano embebidos en diferentes unidades estructurales formando diversos segmentos del polímero. Estas composiciones estructurales específicas serían los sitios en los que actuarían selectivamente las enzimas que escinden el uretano en tiempos tempranos. Esta enzima de tiempos tempranos (antes de las 18 h) debe ser una esterasa o uretanasa no canónica con la capacidad de romper el enlace éster o amida en los grupos carbamato. Existe evidencia reportada de la existencia de este tipo de enzimas, como lo es la uretano hidrolasa de *R. hoaggi* TB-60, la cual mostró actividad sobre los derivados de carbamato relacionados con los polímeros del PU (éster dibutílico del ácido toluen-2,4-

dicarbámico; éster dibutílico del ácido metilen bisfenil dicarbámico, éster dibutílico del ácido hexameten dicarbámico), anilidas, amidas e incluso ésteres. Sin embargo, su actividad fue baja hacia el etil y butil carbamato, los cuales poseen un grupo carbamoilo libre (Akutsu-Shigeno *et al.* 2006). Estos compuestos fueron los que se probaron para detectar la actividad uretanasa en este estudio, la cual no fue detectada a tiempos tempranos, aunque si a tiempos más tardíos. Lo cual apoya la propuesta de la existencia de distintos tipos de actividad uretanasa en diferentes tiempos de cultivo. Coincidiendo con este tipo de enzimas no canónicas (que actúan sobre una gama amplia de sustratos) capaces de escindir el uretano, la esterasa EstA8 de *Acinetobacter* sp. no. 6, que muestra la firma de las amidasas G-[GAV]-S-[GS](2)-G-x-[GSAE]-[GSAVYCT]-x-[LIVMT]-[GSA]-x-(6)-[GSAT]-x-[GA]-x-[DE]x-[GA]-x-S-[LIVM]-R-x-P-[GSACTL] (<https://prosite.expasy.org/doc/PS00571>) hidroliza tanto los ésteres de *p*-nitrofenilo como las *p*-nitroanilidas (Wei *et al.* 2003). Además, una carboxil éster hidrolasa aislada a partir de un metagenoma de rumen y capaz de escindir el Impranil, ataca también el grupo carbamato del insecticida Fenobucarb (Ufarté *et al.* 2017). De hecho, en el genoma de *A. denitrificans* BQ1 se identificaron cuatro genes (CE154_002430, CE154_010035, CE154_012165, CE154_005235) con homología (score >130, identity >32%, query cover >95%) con la uretano hidrolasa de *R. hoaggi* TB-60, lo que apoya la hipótesis de que BQ1 codifica una enzima no canónica, con capacidades similares a las de la uretano hidrolasa de *R. hoaggi* TB-60 capaz de romper el grupo uretano. La hidrólisis de los grupos uretano genera como productos ácidos carboxílicos y aminos. Confirmando la escisión de los grupos uretano del Impranil, el producto de biodegradación que contiene nitrógeno, el ácido 4-aminoheptanodioico (compuesto 11), se identificó por GC-MS después de las 12 h de cultivo, cuando aún no se había detectado actividad uretanasa, y se mantuvo elevado hasta el final del análisis (Figuras 6a y 6b). Las aminos liberadas durante el proceso de escisión del uretano, las cuales fueron detectadas por FTIR, podrían transportarse al interior de la célula mediante transportadores de tipo ABC. En *Pseudomonas putida* cepa U, la proteína PeaH es un transportador ABC que transporta propil-, butil- y pentil-amina al interior celular (Luengo y Olivera, 2020). En el genoma de *A. denitrificans* BQ1 se identificaron tres genes (CE154_001345, CE154_020915, CE154_006925) que codifican proteínas con

homología (score >190, identity \geq 30%, query cover >75%) con PeaH, lo que sugiere que BQ1 tiene capacidad para internalizar aminas alifáticas.

Se propone una segunda etapa en el proceso de biodegradación del Impranil por *A. denitrificans* BQ1 a partir de las 18 h (Figura 8), cuando la actividad uretanasa se detectó (Figuras 7b y 7c). Luego de su máxima actividad a las 18 h, la actividad esterasa disminuyó abruptamente a las 24 h, alcanzando niveles muy bajos, mientras que la actividad uretanasa continuó aumentando hasta el final del análisis (48 h). Por lo tanto, a partir de las 18 h, la elevada actividad uretanasa debería escindir grupos uretano embebidos en composiciones estructurales poliméricas diferentes a las reconocidas por las actividades de escisión del uretano de tiempos tempranos. La aparición de la actividad uretanasa a las 18 h indica que la expresión del gen que codifica esta proteína es inducible, lo cual es similar a lo observado para la uretano hidrolasa TB-60 de *Rhodococcus hoaggi*, la cual fue fuertemente inducida en presencia de acetanilida (Akutsu-Shigeno *et al.* 2006). En esta segunda etapa, los productos biofragmentados del PU resultantes de la ruptura de los grupos éster y uretano continúan ingresando a la célula para su posterior transformación por enzimas citoplásmicas y ser posteriormente transformados como biomasa. Debido a que los fragmentos resultantes de la biofragmentación que son asimilados por las células bacterianas aún pueden contener grupos éster y uretano, se necesitarían actividades citoplásmicas de tipo esterasa y uretanasa para escindir estos grupos dentro de las células. Sin embargo, estas actividades mostrarían una especificidad de sustrato diferente a las extracelulares. La evidencia de esta diferencia se observó en el análisis enzimático realizado a las 36 h, donde distintas especificidades de sustrato para las actividades esterasa y uretanasa citoplásmicas, en comparación con las extracelulares, fueron observadas (Tabla 4).

La diferente naturaleza y efectos de las proteínas extracelulares y citoplásmicas capaces de romper los grupos éster y uretano que participan en la degradación del PS-PU Impranil se confirmaron mediante experimentos *in vitro* con fracciones de proteínas aisladas o combinadas de diferentes tiempos de cultivo. Las proteínas extracelulares (ECP) de 12 h disminuyeron la señal C-N del uretano e incrementaron la señal de las aminas, mientras que las proteínas citoplásmicas (CP) de 12 h no las modificaron

(Figura 9), lo que indica que las actividades citoplásmicas tempranas no actúan sobre el Impranil intacto.

Tabla 4. Especificidad de sustrato para actividades de tipo esterasa y uretanasa de *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 cultivada en MM-Impranil.

Sustratos ensayados para actividad de tipo	12 h cultivo		36 h cultivo		^a Controles
	U/mg proteína (10 ⁻³)		U/mg proteína (10 ⁻³)		
	extracelular	citoplásmica	extracelular	citoplásmica	U/mg proteína (10 ⁻³)
esterasa					
<i>p</i> -NPA	27 ± 6	14 ± 2	17 ± 5	^b ND	3417 ± 52
<i>p</i> -NPB	47 ± 9	22 ± 9	38 ± 3	26 ± 7	4699 ± 60
<i>p</i> -NPC	ND	ND	ND	ND	7735 ± 269
<i>p</i> -NPL	ND	ND	ND	ND	3100 ± 232
<i>p</i> -NPP	ND	ND	ND	ND	ND
uretanasa					
urea	ND	ND	ND	ND	33775 ± 815
etil carbamato	ND	ND	213 ± 69	206 ± 16	81 ± 23
butil carbamato	ND	ND	ND	89 ± 11	ND
fenil carbamato	ND	ND	ND	ND	ND

^a *Aspergillus oryzae* lipasa (0.1 U); *Canavalia ensiformis* urease (0.25 U). ^b ND, no detectado.
MM-Impranil: Medio mínimo con Impranil 1.25 mg ml⁻¹. Los datos son el promedio de tres replicas biológicas.

De manera similar, los experimentos con fracciones combinadas mostraron que las CP de 12 h más las CP de 18 h incrementaron la señal C-N del uretano (Figura 9d), demostrando que la presencia de la actividad de escisión del uretano fue decisiva para inducir cambios en los grupos uretano del polímero intacto. Además, tanto las CP de 12 h como las CP de 12 h más las CP de 18 h disminuyeron fuertemente la señal de las aminas, lo que sugiere que las enzimas para la utilización de las aminas están presentes en la fracción citoplásmica (Figura 9d). Por otro lado, la ausencia de cambios adicionales en la señal del uretano en el experimento de las ECP de 12 h más las ECP de 18 h (Figura 9c) sugiere que se requieren actividades enzimáticas previas para atacar el PS-PU o que los productos de degradación acumulados en el ensayo *in vitro* podrían estar causando inhibición enzimática. Considerando esta última posibilidad, en los cultivos bacterianos, los productos formados serían consumidos activamente por las células microbianas, impidiendo la inhibición de las enzimas extracelulares y manteniéndolas en funcionamiento. Finalmente, la acción concertada entre las esterasas y las actividades extracelulares y citoplásmicas que escinden el uretano durante la biodegradación del Impranil también se observó al detectar una mayor

actividad de aclaramiento del Impranil en los cultivos de BQ1, en comparación con la actividad observada usando las fracciones independientes de ECP o CP.

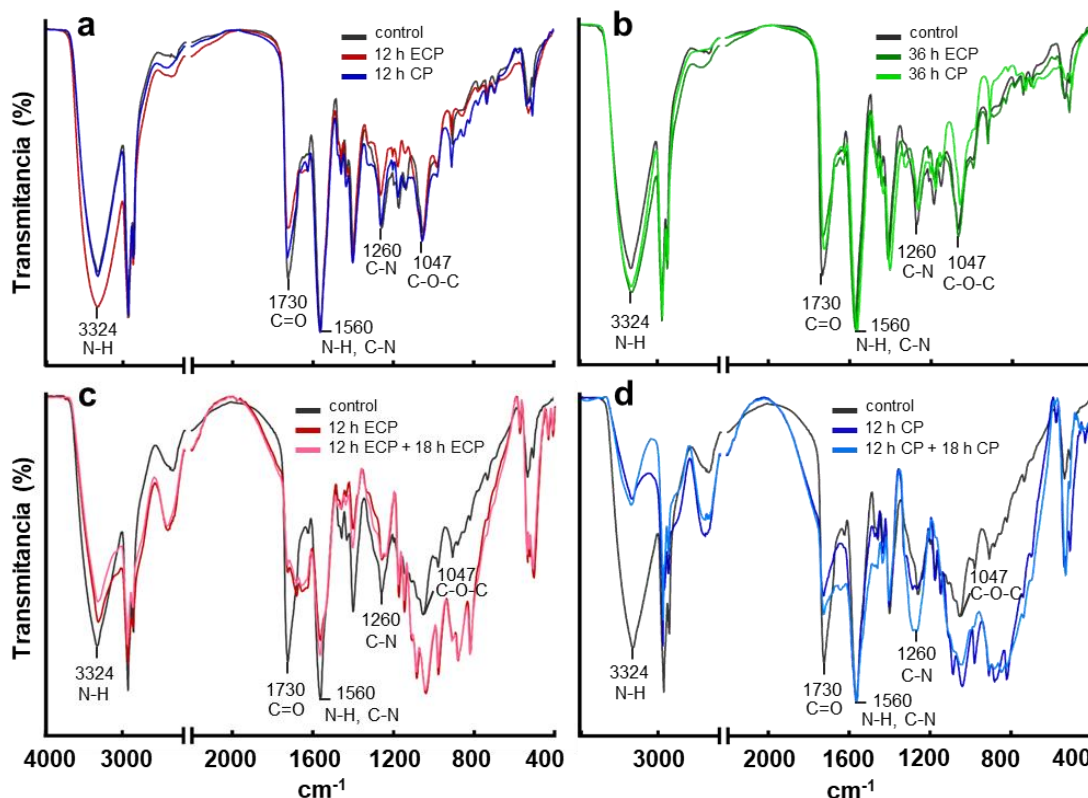


Figura 9. Análisis por espectroscopia FTIR de la biodegradación *in vitro* del Impranil por proteínas extracelulares (ECP) y citoplásmicas (CP) de *A. denitrificans* BQ1. Se obtuvieron y concentraron las proteínas de cultivos de BQ1 creciendo en MM-Impranil (1.25 mg ml^{-1}) a las 12, 18 y 36 h de cultivo. En todos los ensayos se utilizó Impranil (1.25 mg ml^{-1}) resuspendido en buffer de fosfatos pH 7. En el primer conjunto de experimentos, cada análisis se realizó agregando $60 \mu\text{g}$ de proteína e incubando durante 6 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$; a) proteínas extracelulares (ECP) de 12 h y proteínas citoplásmicas (CP) de 12 h; b) 36 h ECP y 36 h CP. En el segundo conjunto de experimentos, se agregaron $100 \mu\text{g}$ de proteína a cada ensayo *in vitro* y se incubaron durante 12 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, y luego, si correspondía, se agregó la segunda fracción de proteína; c) 12 h ECP y 12 h ECP más 18 h ECP; d) 12 h CP y 12 h CP más 18 h CP. Como controles se usaron proteínas desnaturizadas por calor en las mismas condiciones que cada conjunto experimental. Se muestran espectros representativos de cuatro réplicas biológicas.

A continuación, se presentan los resultados y discusión no incluidos en la publicación.

7.3 Caracterización bioquímica parcial de la actividad uretanasa

Debido a que la uretanasa citoplásmica mostró la capacidad de escindir el etil y butil carbamato, representando una proteína potencialmente involucrada en el catabolismo del Impranil, se realizó una caracterización bioquímica parcial de su actividad. Para

caracterizar la actividad uretanasa citoplásmica, se analizó el efecto del pH, glicerol, etilenglicol y NaCl en extractos de cultivos incubados 36 h. La actividad tuvo su máximo valor a pH 8 ($1.8 \mu\text{moles de amonio min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), la cual fue siete veces mayor que a pH 7 ($0,25 \mu\text{moles de amonio min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$) (Figura 10a). Las concentraciones de NaCl (0.2-1 M) inhibieron la actividad uretanasa hasta cuatro veces, pero el etilenglicol o glicerol 10% (v/v) revirtió la inhibición y, excepto a 1 M, confirió mayor actividad que la observada sin NaCl (Figura 10b). Los agentes reductores, DTT y BME, redujeron la actividad uretanasa 63% y 46%, respectivamente. De manera similar, los inhibidores de unión a serina, benzamidina y PMSF, y el compuesto de unión a metales fenantrolina inhibieron la actividad de la uretanasa 92%, 28% y 34%, respectivamente.

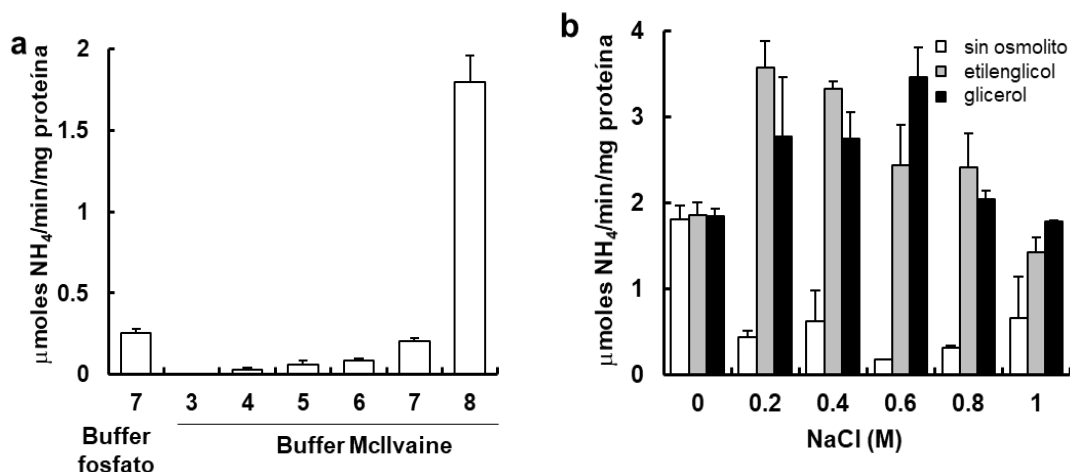


Figura 10. Efectos del pH y osmolitos sobre la actividad uretanasa citoplásmica de *A. denitrificans* BQ1 cultivada en MM-Impranil. La actividad uretanasa se ensayó con uretano 50 mM y se cuantificó a 636 nm. a) Efecto del pH sobre la actividad uretanasa. b) Actividad uretanasa en presencia de etilenglicol 10 % (v/v), glicerol 10 % (v/v) y NaCl (0-1 M) en amortiguador Mcllvaine pH 8. Las barras representan las desviaciones estándar de tres réplicas independientes.

Asimismo, se intentó purificar la actividad uretanasa citoplásmica de 36 h usando cromatografía. Después de la cromatografía de exclusión molecular, las fracciones eluidas que mostraron actividad uretanasa se agruparon y se cargaron en una columna de intercambio aniónico. Sin embargo, aunque se probaron diferentes columnas y condiciones de funcionamiento, no se recuperó actividad después de este paso de purificación. La elevada actividad uretanasa observada con glicerol, incluso en

presencia de NaCl 0.8 M (Figura 10b), sugiere que la actividad está dada por una proteína multimérica que contiene subunidades predominantemente asociadas por interacciones hidrofóbicas, lo que la hace susceptible a la agregación (Sahu y Prakash, 2008). Esta observación y la imposibilidad de recuperar una fracción activa después de probar diferentes condiciones de cromatografía de intercambio aniónico sugiere que la uretasa es una proteína hetero u homomultimérica.

7.4 Para el análisis comparativo de proteómica diferencial el medio mínimo con acetato fue seleccionado como fuente de carbono control

Con el objetivo de comparar la expresión proteica, se buscó una fuente de carbono en la que el crecimiento de BQ1 se comportara de manera similar al mostrado con Impranil. Se encontró que usando acetato 25 mM como única fuente de carbono, el patrón general de crecimiento y los niveles de proteína generada por *A. denitrificans* BQ1 fueron similares a los observados con Impranil (Figura 11). Durante el crecimiento de *A. denitrificans* BQ1 en acetato 25 mM, la fase lag comprendió las primeras 6 h de crecimiento, la fase exponencial abarcó de las 6 y hasta las 18 h, mientras que el período comprendido entre las 18 h y las 48 h correspondió a la fase estacionaria (Figura 11). La velocidad de crecimiento (μ) de *A. denitrificans* BQ1 cultivada en acetato (25 mM) fue de 0.283 h^{-1} mientras que cultivada en Impranil (1.25 mg ml^{-1}) correspondió a 0.136 h^{-1} .

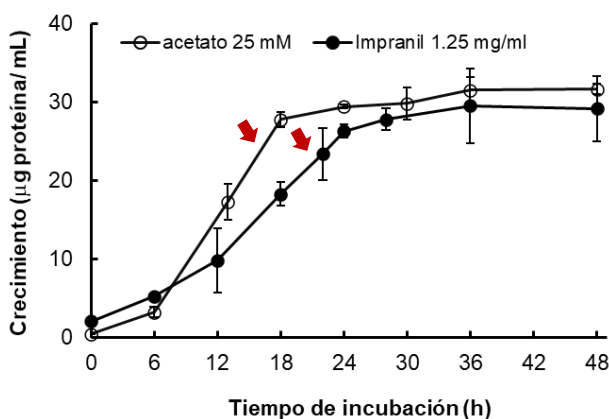


Figura 11. Crecimiento de *A. denitrificans* BQ1 en MM-Impranil y MM-acetato. Los cultivos se incubaron a 37°C y 200 rpm. El crecimiento se cuantificó con base en la concentración de proteína usando el método de Bradford (Bradford, 1976). Las flechas indican los tiempos de cosecha celular para cada fuente de carbono. Los datos son promedios de tres réplicas biológicas. Las barras representan la desviación estándar.

Dada la diferencia entre las velocidades de crecimiento, los tiempos de cultivo seleccionados para la cosecha de células y posterior extracción de proteínas fueron 22 h de incubación para los cultivos con Impranil y 16 h de incubación para los cultivos con acetato, ambos tiempos correspondientes a la fase exponencial tardía.

7.5 Comparación de las proteínas de *A. denitrificans* BQ1 expresadas en Impranil y acetato con FC>2

Como resultado del análisis proteómico total, se identificaron 1,343 proteínas cuando BQ1 se cultivó en Impranil, lo que representó 31.4% del total de genes presentes en su genoma (4,273 genes que codifican para proteínas, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por otro lado, 1,309 proteínas fueron identificadas cuando la fuente de carbono fue acetato, representando 30.6% del total de genes de BQ1 (Tabla 5). Por lo que, durante la fase exponencial tardía de crecimiento y en presencia de Impranil o acetato como fuente de carbono, BQ1 expresa el 30% del total de proteínas codificadas en su genoma.

Tabla 5. Proteínas totales, proteínas con FC>2 y proteínas con asignación KO de *A. denitrificans* BQ1 identificadas mediante proteómica diferencial en presencia de Impranil o acetato como fuente de carbono.

Fuente de carbono	Proteínas expresadas identificadas	Proteínas con FC>2	Proteínas con KO asignado según KOALA
Impranil (1.25 mg ml ⁻¹)	1343	448	334
Acetato (25 mM)	1309	595	486

Con el objetivo de encontrar las proteínas expresadas diferencialmente se aplicó un criterio de selección usando un valor de sobre-expresión mayor a 2 (FC>2), el cual representa la relación entre la abundancia de la intensidad de las señales de los péptidos para cada proteína dada en cada condición usada de fuente de carbono. Con este criterio se encontraron 448 proteínas sobre-expresadas en Impranil (Tabla 5, Anexo IV) y 595 proteínas sobre-expresadas en acetato. El análisis de las categorías funcionales de las proteínas que presentaron FC>2 mostró, para ambas fuentes de carbono, un número mayor de KO asignados para la categoría correspondiente al metabolismo de carbohidratos, seguido por el metabolismo de aminoácidos, procesamiento de información ambiental y procesamiento de información genética

(Figura 12). El hecho de que el metabolismo de carbohidratos esté posicionado como la categoría funcional con mayor número de KO identificados para ambas fuentes de carbono pone de manifiesto la relevancia que posee esta categoría para la producción de energía.

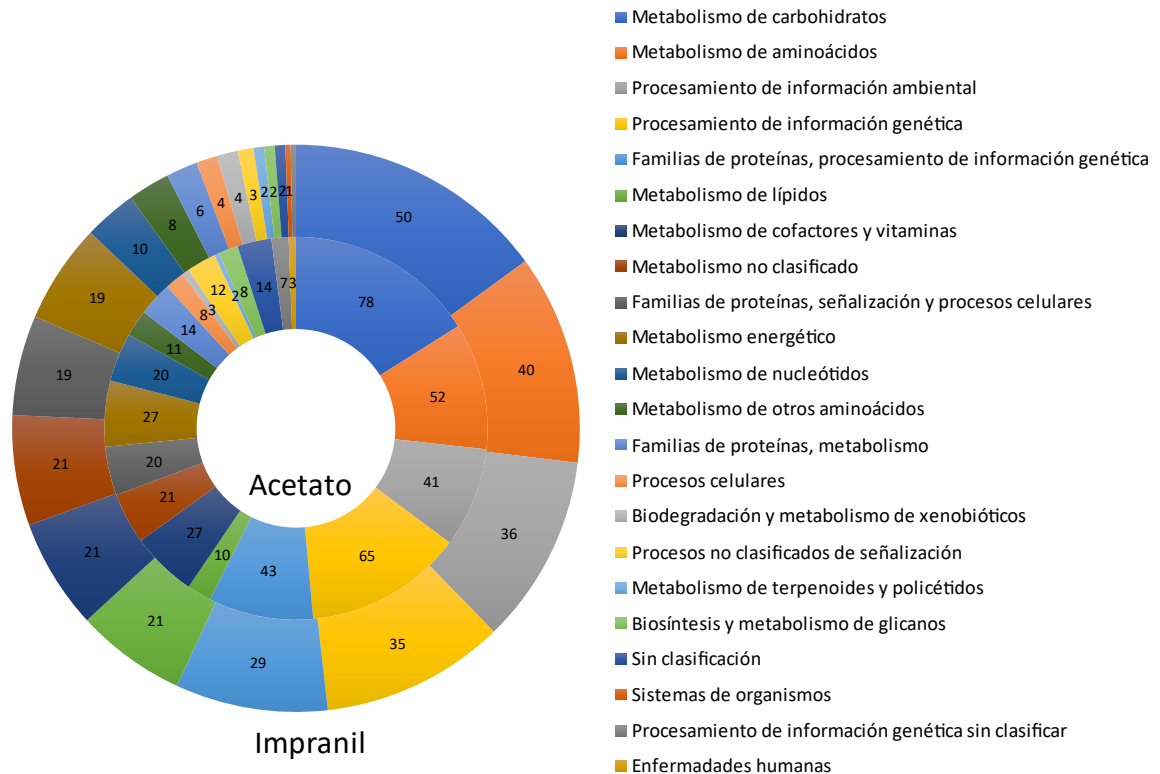


Figura 12. Comparación de categorías funcionales de proteínas de *A. denitrificans* BQ1 con FC>2 expresadas en MM-Impranil y MM-acetato. Las comparaciones están basadas en la información proporcionada por la base de datos KEGG Orthology And Links Annotation. Los números representan los KO asignados para cada categoría funcional.

De manera interesante, usando Impranil como fuente de carbono, la única categoría con mayor número de KO (21 KO) que la condición de acetato (10 KO) correspondió al metabolismo de lípidos (Figura 12). Este resultado denota la diferente estrategia metabólica que *A. denitrificans* BQ1 despliega durante el catabolismo del Impranil. Entre las categorías identificadas con mayor número de KO cuando se usó Impranil como fuente de carbono se encontraron: metabolismo de aminoácidos, procesamiento de información ambiental y procesamiento de información genética.

7.6 Vías metabólicas y proteínas relacionadas con la degradación del Impranil en *A. denitrificans* BQ1

7.6.1 Degradación de ácidos grasos o β -oxidación

El análisis arrojado por BlastKOALA mostró que durante el catabolismo del Impranil por *A. denitrificans* BQ1, la vía metabólica correspondiente a la degradación de ácidos grasos, también llamada β -oxidación, mostró sobre-expresadas todas las proteínas que la conforman (Figura 13).

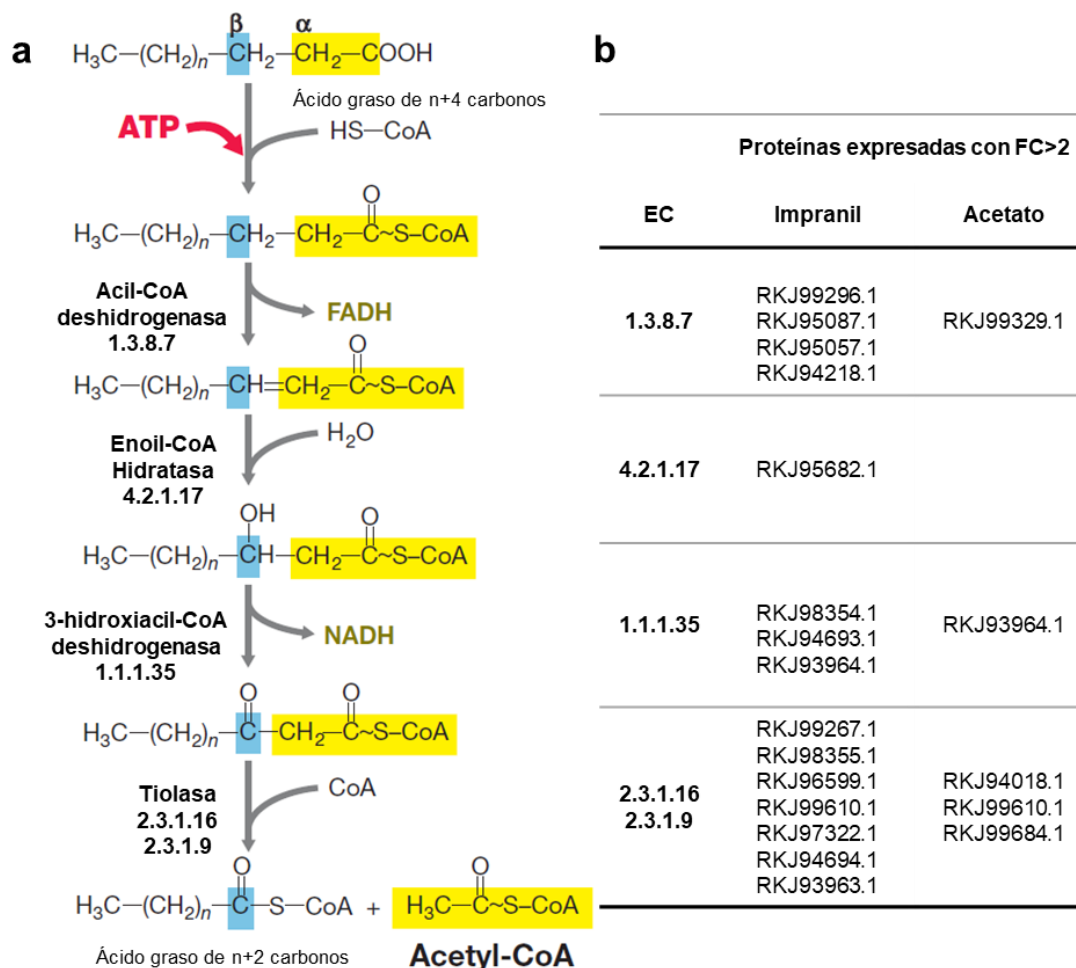


Figura 13. Mecanismo de β -oxidación de ácidos grasos que conduce a la formación sucesiva de acetil-CoA y proteínas que catalizan los cuatro pasos de la vía (a) (Modificado de Madigan *et al.* 2015). Proteínas de BQ1 expresadas en MM-Impranil y MM-acetato asociadas con la degradación de ácidos grasos (b).

De acuerdo con el análisis proteómico diferencial en el que se analizó la expresión de proteínas citosólicas, membranales y extracelulares, se pudo deducir que la proteína

RKJ93964 se encontró sobre-expresada en la fracción citosólica del MM-acetato, mientras que su sobreexpresión en MM-Impranil fue detectada en la fracción membranal. Por otro lado, la proteína RKJ99610 se sobre-expresó en la fracción citosólica del MM-Impranil y en la fracción membranal del MM-acetato.

En presencia de Impranil se identificaron cuatro proteínas con actividad acil-CoA deshidrogenasa (EC1.3.8.7), tres 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasas (EC 1.1.1.35) y siete tiolasas (EC 2.3.1.16; EC 2.3.1.9), sugiriendo una aparente redundancia de actividades enzimáticas. Mientras que, usando acetato como fuente de carbono, esta redundancia solo se observó para la actividad de tipo tiolasa (EC 2.3.1.9) (Figura 13). Esta aparente redundancia enzimática podría ser el resultado de la diversa composición química estructural del Impranil que se genera por las reacciones de polimerización de tipo “step-growth”. Por anterior, BQ1 despliega un mayor número de actividades enzimáticas de acuerdo con la variedad estructural presente en el Impranil.

Por otro lado, comparando los valores de FC de las proteínas expresadas de *A. denitrificans* BQ1 que participan en la β -oxidación, se observó que las acil-CoA deshidrogenasas RKJ95087.1, RKJ95057.1 y la enoil-CoA hidratasa RKJ95682.1 fueron exclusivamente expresadas en MM-Impranil, es decir, que no se expresaron en el medio mínimo con acetato. Mientras que la tiolasa RKJ99267.1 fue la proteína que mostró los mayores valores de FC (Figura 14).

Dado que se encontraron sobre-expresadas todas las proteínas relacionadas con la β -oxidación, el catabolismo del Impranil por *A. denitrificans* BQ1 debe involucrar la transformación sucesiva de compuestos alifáticos hasta la generación de acetil-CoA, NADH y FADH. La ficha técnica del Impranil, en la cual se describe como una dispersión alifática de tipo poliéster PU, además de las evidencias que se encontraron en el análisis por GC-MS en nuestro trabajo al detectar compuestos con cadenas alifáticas que son susceptibles de ser degradados por esta vía, concuerdan con estos resultados.

A partir de la identificación del producto de degradación 6-hidroxihexanoato, obtenido de la hidrólisis de un PU sintetizado a partir de policaprolactona polioliol (Magnin *et al.* 2019), se ha hipotetizado parte de la vía metabólica que podrían emplear los microorganismos para su asimilación (Ru *et al.* 2020). Después de las primeras reacciones de ruptura de los grupos éster y uretano, se generaría el 6-

hidroxihexanoato, el cual se convierte en 6-oxohexanoico por acción de la 6-hidroxihexanoato deshidrogenasa (ChnD). Posteriormente el 6-oxohexanoico se transforma en adipato por la 6-oxohexanoico deshidrogenasa (ChnE). Después de la unión con CoA, el adipato se convertirá en 3-oxoadipil-CoA, que finalmente formará succinil-CoA y acetyl-CoA que entrarán en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) produciendo ácido succínico (Ru *et al.* 2020). Esta hipótesis resalta las diferentes reacciones enzimáticas que podrían estar participando en los primeros pasos de la biodegradación, las cuales dependerán de los precursores empleados en la síntesis del PU, ya que las estructuras de este tipo de polímeros no poseen un patrón repetitivo a lo largo de su estructura.

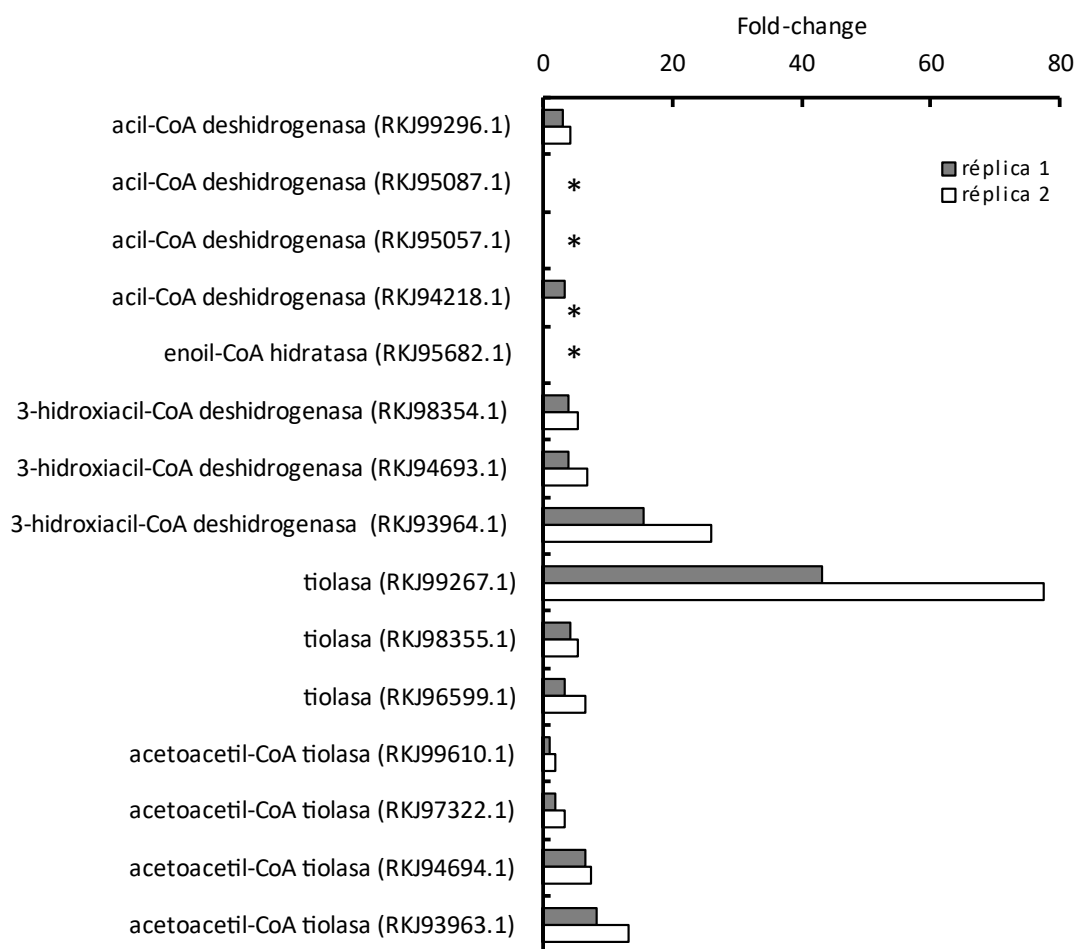


Figura 14. Comparación de valores de FC de las proteínas de *A. denitrificans* BQ1 expresadas en MM-Impranil que participan en la vía de degradación de ácidos grasos. El símbolo * denota las proteínas expresadas exclusivamente en MM-Impranil.

7.6.2 Síntesis de nicotinato y nicotinamida

En las células procariontas, el NAD(H) se utiliza como principal portador de electrones para alimentar cientos de reacciones redox esenciales y para regular directa o indirectamente procesos bioquímicos, tales como enzimas alostéricas y modificaciones postraduccionales. Además, las enzimas NAD-dependientes están involucradas en vías catabólicas relacionadas con la utilización de carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos y ácidos grasos. En bacterias, se ha observado que el metabolismo de NADH/NAD⁺ juega un papel clave en la adaptabilidad al medio ambiente y la estructura de la comunidad (Osterman 2009; Liu *et al.* 2019). Por otro lado, el NADPH proporciona el poder reductor que impulsa numerosas reacciones anabólicas, incluyendo las responsables de la biosíntesis de los principales componentes celulares como DNA y lípidos (Spaans *et al.* 2015). De las cinco enzimas que participan en la vía de síntesis de las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺), sólo la nicotinato nucleótido adenililtransferasa (EC 2.7.7.18) no se identificó en el análisis proteómico (Figura 15).

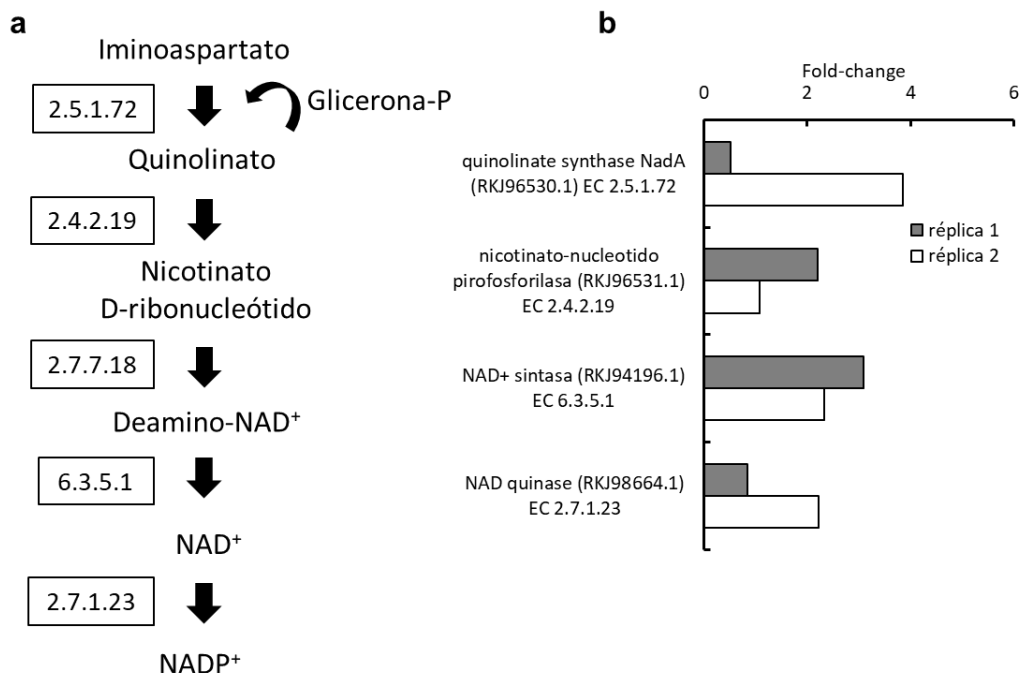


Figura 15. Vía de síntesis de las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) (a), modificado de KEGG. Proteínas de BQ1 sobre-expresadas en MM-Impranil asociadas con la síntesis de NAD⁺ y NADP⁺ (b).

En nuestro sistema de estudio, la sobre-expresión de éstas proteínas podría estar relacionada con la demanda de NAD⁺, la cual es una coenzima necesaria para la función catalítica de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enzima que participa en la degradación de ácidos grasos, vía que también estuvo sobre-expresada cuando BQ1 creció usando Impranil como única fuente de carbono.

7.6.3 Gluconeogénesis

Durante el crecimiento de BQ1 en MM-Impranil se observó que, a excepción de la hexocinasa y la fosfofructoquinasa, las proteínas implicadas en la transformación y escisión de la glucosa en gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato, se encontraron sobre-expresadas (Figura 16). Se ha reportado que algunas bacterias pueden usar la gluconeogénesis para sintetizar glucosa a partir de compuestos de dos o tres carbonos o de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Inui *et al.* 1999; Tang *et al.* 2005). En microorganismos como *Escherichia coli*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Sinorhizobium meliloti* se ha reportado la coexistencia de las rutas PckA (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y PpsA (fosfoenolpiruvato sintasa), las cuales están relacionadas con el primer paso de la gluconeogénesis en bacterias, el cual consiste en la síntesis de fosfoenolpiruvato (PEP) (Tang *et al.* 2005). En *A. denitrificans* BQ1 se encontró sobre-expresada la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa RKJ99311.1 en MM-Impranil, por lo que es probable que se esté llevando a cabo la síntesis de PEP mediante la ruta PckA.

En la gluconeogénesis hay dos enzimas que suplen las reacciones irreversibles llevadas cabo en la glucólisis. Una de ellas es la fructosa-1,6-bifosfatasa (EC 3.1.3.11) y la otra corresponde a la fosfoenolpiruvato sintasa (EC 2.7.9.2). En el MM-Impranil se encontró sobre-expresada la fructosa-1,6-bifosfatasa (RKJ94627) pero no la fosfoenolpiruvato sintasa (Figura 16). Sin embargo, dado que se encontraron sobre-expresadas la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (RKJ99311.1), proteína relacionada con la síntesis de fosfoenolpiruvato y la fructosa-1,6-bifosfatasa (EC 2.7.9.2), proteína clave en la vía gluconeogénica, es probable que la gluconeogénesis esté activa durante el crecimiento de BQ1 en MM-Impranil.

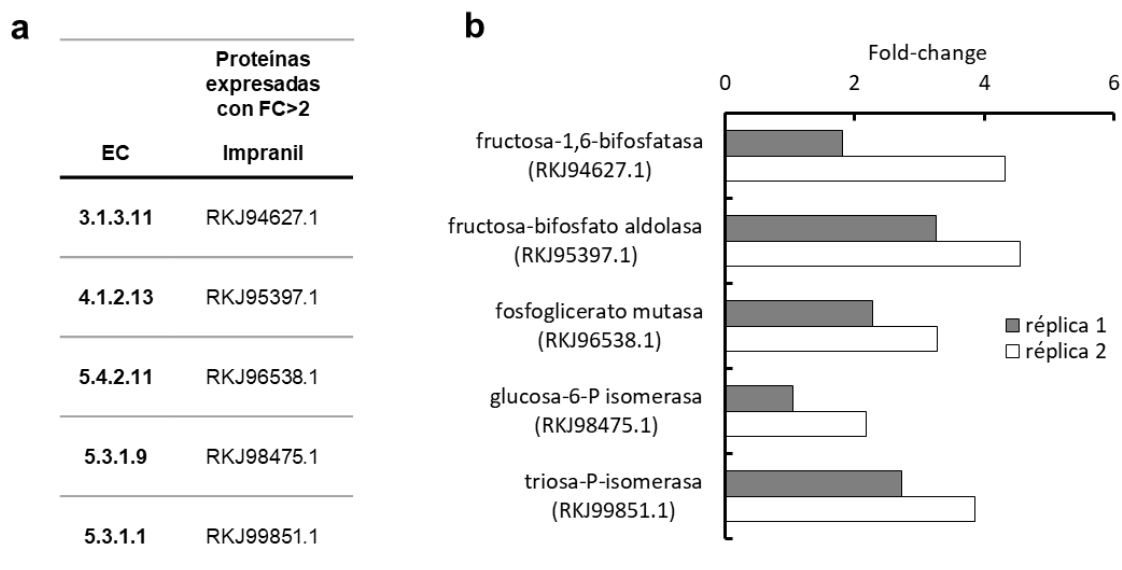


Figura 16. Proteínas de *A. denitrificans* BQ1 expresadas en MM-Impranil asociadas con la gluconeogénesis (a) y sus correspondientes valores de FC (b).

7.6.4 Proteínas de unión a sustrato (SBPs) de Transportadores Tripartitas de Tricarboxilatos (TTT)

De manera interesante en MM-Impranil se identificaron expresadas 33 proteínas de unión a sustrato (SBP) de TTT (Tabla 6) que no estuvieron presentes en el MM-acetato. Los TTT son un tipo de transportadores secundarios dependientes de SBPs, conformados por dos proteínas transmembranales y una SBP (Rosa *et al.* 2019).

Tabla 6. Proteínas de unión a sustrato de TTT de *A. denitrificans* BQ1 expresadas en MM-Impranil

SBPs de TTT expresadas en MM-Impranil			
RKJ99816.1	RKJ99273.1	RKJ98743.1	RKJ95680.1
RKJ99766.1	RKJ99271.1	RKJ97332.1	RKJ95676.1
RKJ99765.1	RKJ99270.1	RKJ97146.1	RKJ95673.1
RKJ99740.1	RKJ99265.1	RKJ96865.1	RKJ95544.1
RKJ99657.1	RKJ99251.1	RKJ96697.1	RKJ94944.1
RKJ99473.1	RKJ99239.1	RKJ96597.1	RKJ94480.1
RKJ99331.1	RKJ99165.1	RKJ96558.1	
RKJ99294.1	RKJ98947.1	RKJ96557.1	
RKJ99277.1	RKJ98846.1	RKJ95712.1	

En los últimos años se ha identificado que además de tricarboxilatos y aminoácidos, algunos sistemas TTT pueden transportar ácido nicotínico, nicotinamida, benzoato,

tereftalato, 3-sulfolactato y ácido 3,3'-ditiodipropiónico. Sugiriendo la posibilidad de que los sustratos para la familia TTT sean mucho más diversos de lo que se ha pensado (Rosa *et al.* 2019). Se ha observado que en ocasiones las SBPs están presentes sin las proteínas transmembranales que conforman el sistema TTT, denominándolas SBPs huérfanas (Antoine *et al.* 2003). Debido a su pobre caracterización, se desconoce la importancia funcional de las SBPs huérfanas, pero se ha sugerido que podrían ser reclutadas por proteínas de otras familias de transportadores o estar relacionadas con procesos de señalización o quimiotaxis en la célula en lugar del transporte (Piepenbreier *et al.* 2017).

7.6.5 Hidrolasas con posible actividad sobre grupos éster y uretano del Impranil

Se identificaron varias hidrolasas, esterasas y amidasas de *A. denitrificans* BQ1 expresadas en MM-Impranil que podrían estar participando en la hidrólisis de los enlaces de tipo éster y uretano del polímero (Tabla 7). El análisis bioinformático no les asignó KO a algunas proteínas, por lo que no estuvieron asociadas a ninguna vía metabólica integrada en el KEGG.

La variedad de funciones de las metalo- β -lactamasas (MBL) es muy amplia. Esta familia incluye las β -lactamasas de clase B, glioxalinas II, arilsulfatasas, flavoproteínas, ciclasas/hidratadas, proteínas de procesamiento de mRNA, proteínas reparadoras de DNA, proteínas relacionadas con la toma de alquilfosfonato, CMP-N-acetilneuraminato hidroxilasa, alquilsulfatasas e hidrolasas de insecticidas (Daiyasu *et al.* 2001). Entre las proteínas relacionadas con la hidrólisis de insecticidas se encuentran la carbofurano hidrolasa de *Achromobacter* sp. WM111, la cual es capaz de hidrolizar rápidamente el carbofurano y la metil paratión hidrolasa de *Plesiomonas* sp. M6 capaz de degradar el insecticida metil paratión (Daiyasu *et al.* 2001).

Particular interés posee la metalo-hidrolasa MBL (RKJ94592) de BQ1 expresada exclusivamente en MM-Impranil, ya que proteínas de esta familia han sido relacionadas con la hidrólisis del carbofurano, el cual es un pesticida de tipo carbamato. Por otro lado, las metalo-hidrolasas M20/M25/M40 pertenecen a la familia de las peptidasas MEROPS M20 (clan MH) que incluye a las metalo-peptidasas y homólogos que escinden enlaces C-N de tipo no proteico (amidohidrolasas). Las proteínas de este clan poseen dos iones de zinc catalíticos en el sitio activo, unidos por His/Asp, Asp, Glu, Asp/Glu e His. La familia de las peptidasas M20 posee cuatro subfamilias: M20A, M20B,

M20C y M20D. Mientras que los homólogos que no son peptidasas incluyen: acetil ornitina desacetilasa, N-acetildiaminopimelato desacetilasa, N-carbamoil-L-amino ácido hidrolasa, aminoacilasa-1 y succinil-diaminopimelato desuccinilasa (Rawlings *et al.* 2018).

Tabla 7. Hidrolasas de *A. denitrificans* BQ1 exclusivas y expresadas en MM-Impranil con FC>2

Clasificación	Asignación KO	RKJ	Nombre	FC	
				R1 ^a	R2
Hidrolasas		RKJ99800	metalo-hidrolasa MBL	2.036	1.521
		RKJ96238	metalo-hidrolasa M20/M25/M40	10.523	8.746
		RKJ95617	metalo-hidrolasa M20/M25/M40	5.456	4.340
		RKJ95385	alpha/beta hidrolasa	5.322	2.301
		RKJ94631	alpha/beta hidrolasa	6.897	5.766
		RKJ94592	metalo-hidrolasa MBL	Exclusiva de Impranil	
Esterasas		RKJ99272	tioesterasa familia Paal	1.521	3.339
	K19222	RKJ99343	tioesterasa	0.664	2.220
	K10806	RKJ98359	acil-CoA tioesterasa YciA	1.565	2.395
		RKJ98243	tanasa/feruloil esterasa	Exclusiva de Impranil	
		RKJ97199	tioesterasa	0	2.683
		K03412	RKJ97180	glutamato metilesterasa	2.091
Amidasas	K02433	RKJ99887	glutamil-tRNA (Gln) amidotransferasa subunidad A	0	2.622
	K02434	RKJ99056	Asp-tRNA (Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferasa subunidad GatB	2.102	2.572
	K02433	RKJ99053	Asp-tRNA (Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferasa subunidad GatA	2.986	1.365

a. R1: réplica 1; R2: réplica 2.

Las tioesterasas son un gran grupo de enzimas que hidrolizan el enlace tioéster entre un grupo carbonilo y un átomo de azufre de una amplia clase de compuestos, como la coenzima A, las proteínas transportadoras de acilos, glutatión u otras moléculas de proteína (Guevara-Martínez *et al.* 2019). Las tioesterasas de la familia Paal poseen un plegamiento de tipo Hot Dog, el cual está conformado por siete hebras de hojas-β

antiparalelas rodeando una hélice alfa, estas proteínas están relacionadas con la hidrólisis de cadenas de acil-CoA de cadena corta y media, así como degradación de ácido fenil acético y 4-clorobenzoato (Thioester-Active Enzyme Database: <http://www.enzyme.cbirc.iastate.edu>). Por otro lado, la acil-CoA tioesterasa YciA está relacionada con la síntesis de (*R*)-3-hidroxi butirato, molécula usada como precursor para la síntesis de antibióticos, vitaminas y como bloque de construcción para la síntesis de polihidroxicanoatos (familia de poliésteres con amplia variedad de aplicaciones), además tiene eficacia catalítica hacia diferentes intermediarios como acetoacetil-CoA, crotonato y butirato (Guevara-Martínez *et al.* 2019; Clomburg *et al.* 2012). La tanasa/feruloil esterasa es una subclase de hidrolasa de ésteres carboxílicos, en esta familia se incluyen proteínas capaces de hidrolizar bis-2(hidroxietil) tereftalato, producto de la hidrólisis del tereftalato de polietileno; amida del ácido bishidroxietil tereftálico; dimetil tereftalato, el cual es un aditivo ampliamente utilizado en la síntesis de fibras de poliéster, resinas, pinturas y plásticos industriales; mono(etilen tereftalato) así como mono-4-nitrofenil tereftalato (ESTHER Database: <http://bioweb.supagro.inra.fr/ESTHER/general?what=index>). De hecho, en el MM-Impranil no inoculado se identificó mediante GC-MS el plastificante dietil ftalato, el cual disminuyó a las 24 h de crecimiento de BQ1. Por lo tanto, de particular interés resulta esta proteína en la búsqueda de proteínas relacionadas con la degradación del PU y plastificantes, ya que está involucrada en la degradación del tereftalato de polietileno, un plástico sintético de tipo poliéster, así como en la degradación del dimetil tereftalato.

La quimiotaxis en bacterias es una respuesta conductual que les permite migrar hacia sustancias químicas favorables o alejarse de las desfavorables. La actividad de señalización de los receptores transmembranales de la quimiotaxis bacteriana se modula mediante la metilación reversible de residuos específicos de glutamato. El nivel de metilación del receptor resulta entre otras causas, de la actividad de la glutamato metilesterasa, la cual posee un dominio perteneciente a la clase serina hidrolasa con la tríada catalítica conformada por serina, histidina y aspartato (Sigrist *et al.* 2013).

Finalmente, las tres amidasas sobre-expresadas en MM-Impranil están relacionadas con el proceso de biosíntesis de proteínas (Uniprot Database: <https://www.uniprot.org/>). Interesantemente, el contexto genómico del gen que codifica la proteína glutamil-tRNA (Gln) amidotransferasa subunidad A (RKJ99887), la cual debe estar constituida de tres

subunidades para que su función canónica se lleve a cabo, no incluye las subunidades B y C. En su lugar se identificó al gen que codifica a la proteína RKJ99144, la cual es una SBP relacionada con TTT. Aunque la proteína RKJ99144 no se encontró sobre-expresada en Impranil, el hecho de que solo se encuentre un gen que codifica a la subunidad A de la glutamil-tRNA (Gln) amidotransferasa, la cual es la que realiza la actividad catalítica de transferencia de grupos amina, sugiere que esta proteína no participaría en su función canónica, la edición del tRNA de glutamina.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 es capaz de degradar el PS-PU Impranil desplegando actividades esterasa y actividades capaces de escindir los grupos uretano, tanto extracelulares como citoplásmicas, de una manera espacial y temporalmente reguladas, ejerciendo una acción degradativa concertada. Durante la degradación del Impranil se detectaron distintos tipos de actividades esterasa y de escisión del uretano en diferentes tiempos de cultivo y compartimentos celulares durante el crecimiento de *A. denitrificans* BQ1, lo que revela un escenario bioquímico más complejo que el vislumbrado previamente. La actividad temprana de escisión del uretano y la acción concertada de las actividades esterasa y uretanasa se confirmó mediante experimentos de biodegradación del Impranil *in vitro* con fracciones de proteínas independientes o combinadas usando FTIR.

Mediante análisis por GC-MS se identificaron los precursores usados en la síntesis del Impranil 1,6-hexanediol, neopentilglicol, HDI y ácido adípico di(oct-4-il-éster); los plastificantes ácido ciclohexano carboxílico hexil éster, ácido ciclohexano carboxílico 2-tridecyl éster, dietil ftalato y dicitclohexil adipato; y los productos de degradación ácido 4-amino heptanodioico, 4-acetoxi pentadecano y 7-metil-Z-tetradecen-1-ol-acetato.

Por otro lado, la caracterización parcial de la actividad uretanasa sugirió que la actividad está dada por una proteína multimérica que contiene subunidades predominantemente asociadas por interacciones hidrofóbicas.

Asimismo, mediante el análisis proteómico total diferencial se identificaron 448 proteínas expresadas con valores de FC>2 en MM-Impranil. Entre estas proteínas sobre-expresadas se encontraron las que forman parte de las vías metabólicas β -oxidación, síntesis de nicotinato y nicotinamida y gluconeogénesis. Además, se encontraron sobre-expresadas 33 proteínas de unión a sustrato (SBP) de Transportadores Tripartitas de Tricarboxilatos (TTT) que podrían estar relacionadas con el transporte de productos de degradación o procesos de señalización. Entre las hidrolasas identificadas y expresadas exclusivamente en MM-Impranil, se encontró la metalo-hidrolasa MBL (RKJ94592), la cual podría estar relacionada con la ruptura de los grupos carbamato del Impranil; y la tanasa/feruloil esterasa (RKJ98243), la cual está

relacionada con la degradación del tereftalato de polietileno y que podría tener alguna relación con la degradación de los enlaces éster del Impranil y/o plastificantes.

Estos hallazgos brindan nuevos conocimientos sobre la bioquímica de las enzimas que degradan el PU y ayudarán a desarrollar estrategias biotecnológicas para degradar los desechos de PS-PU.

9. PERSPECTIVAS

1. Realizar la búsqueda e identificación de productos de degradación usando HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con el propósito de detectar productos de degradación que no pudieron ser detectados por GC-MS.
2. Intentar purificar la(s) proteína(s) con actividad uretanasa usando diferentes columnas cromatográficas y condiciones que favorezcan la actividad.
3. Caracterizar bioquímicamente la actividad de la(s) uretanasa(s) purificada(s).
4. Realizar ensayos de degradación del Impranil usando las proteínas purificadas e identificar los productos de degradación para proponer un mecanismo degradativo.
5. Identificar si los genes que codifican las proteínas sobre-expresadas en MM-Impranil están organizadas como operones con el propósito de deducir una posible expresión coordinada de las mismas.
6. Ahondar en la función de las proteínas sobre-expresadas que no tuvieron asignación KO para saber si se pueden asociar con alguna actividad degradativa.
7. Intentar dilucidar la posible participación de las SBP de TTT durante la degradación del Impranil por *A. denitrificans* BQ1.
8. Determinar si entre las proteínas sobre-expresadas existe una posible interacción.
9. Aislar mutantes en los genes que codifican para las proteínas que se expresan preferencialmente en MM-Impranil y que pudieran participar en la degradación de este compuesto.

REFERENCIAS

- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T (2006) Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:422–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0071-1>
- Antoine R, Jacob-Dubuisson F, Drobecq H, Willery E, Lesjean S, Loch C (2003) Overrepresentation of a gene family encoding extracytoplasmic solute receptors in *Bordetella*. *J Bacteriol* 185:1470–1474. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1470-1474.2003>
- Avar G, Meier-Westhues U, Casselmann H, Achten D (2012) Polyurethanes. Germany Bayer Material Science AG, Leverkusen, 411-441.
- Biffinger JC, Barlow DE, Cockrell AL, Cusick KD, Hervey WJ, Fitzgerald LA, Nadeau LJ, Hung CS, Crookes-Goodson WJ, Russell JN (2015) The applicability of Impraniil® DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes. *Polym Degrad Stab* 120:178–185. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.020>
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1–2):248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Clomburg JM, Vick JE, Blankschien MD, Rodriguez-Moya M, Gonzalez R (2012) A synthetic biology approach to engineer a functional reversal of the beta-oxidation cycle. *ACS Synth Biol* 1(11):541–554. <https://doi.org/10.1021/sb3000782>
- 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. *Biotechnol Adv* 31:1634–1647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.011>
- Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y, Toh H (2001) Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett* 503:1–6. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02686-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02686-2)
- Dangel W, Tschech A, Fuchs G (1988) Anaerobic metabolism of cyclohexanol by denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 150:358–362. <https://doi.org/10.1007/BF00408307>
- Gamerith C, Herrero Acero E, Pellis A, Ortner A, Vielnascher R, Luschnig D, Zartl B, Haernvall K, Zitzenbacher S, Strohmeier G, Hoff O, Steinkellner G, Gruber K, Ribitsch D, Guebitz GM (2016) Improving enzymatic polyurethane hydrolysis by tuning enzyme sorption. *Polym Degrad Stab* 132:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.02.025>
- Gaytán I, Sánchez-Reyes A, Burelo M, Vargas-Suárez M, Liachko I, Press M, Sullivan S, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H (2020) Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02986>
- Guevara-Martínez M, Perez-Zabaleta M, Gustavsson M, Quillaguamán J, Larsson G, van Maris AJA (2019) The role of the acyl-CoA thioesterase “YciA” in the production of (R)-3-hydroxybutyrate by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*

103:3693–3704. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09707-0>

- Howard GT, Crother B, Vicknair J (2001) Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeterior Biodegrad* 47:141–149. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00042-7)
- Howard GT, Norton WN, Burks T (2012) Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation* 23:561–573. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9533-6>
- Huang, SJ, Roby MS (1986) Poly (amide-urethanes). *J Bioact Compat Polym* 1:61-71. <https://doi.org/10.1177/088391158600100106>
- Inui M, Nakata K, Roh JH, Zahn K, Yukawa H (1999) Molecular and functional characterization of the *Rhodopseudomonas palustris* no. 7 phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Bacteriol* 181:2689-2696. <https://doi.org/10.1128/jb.181.9.2689-2696.1999>
- Ionescu M (2005) Chemistry and technology of polyols for polyurethanes. iSmithers Rapra Publishing.
- Janik H, Sienkiewicz M, Kucinska-Lipka J (2014) Polyurethanes. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3107-7.00009-9>
- Jiang W, Gao Q, Zhang L, Wang H, Zhang M, Liu X, Zhou Y, Ke Z, Wu C, Qiu J, Hong Q (2020) Identification of the key amino acid sites of the carbofuran hydrolase CehA from a newly isolated carbofuran-degrading strain *Sphingbium* sp. CFD-1. *Ecotoxicol Environ Saf* 189:109938. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109938>
- Kafri R, Levy M, Pilpel Y (2006) The regulatory utilization of genetics redundancy through responsive backup circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11653–11658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604883103>
- Kemona A, Piotrowska M (2020) Polyurethane recycling and disposal: methods and prospects. *Polymers* 12, 1752. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.3390/POLYM12081752>
- Liu X, Zhang Q, Zhou N, Tian Y (2017) Expression of an acid urease with urethanase activity in *E. coli* and analysis of urease gene. *Mol Biotechnol* 59:84–97. <https://doi.org/10.1007/s12033-017-9994-x>
- Liu Y, Landick R, Raman S (2019) A Regulatory NADH/NAD⁺ redox biosensor for bacteria. *ACS Synth Biol* 8:264–273. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00485>
- Magnin A, Pollet E, Perrin R, Ullmann C, Persillon C, Phalip V, Avérous L (2019) Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. *Waste Manag* 85:141–150. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.12.024>
- Magnin A, Pollet E, Phalip V, Avérous L (2020) Evaluation of biological degradation of polyurethanes. *Biotechnol Adv* 39:107457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107457>
- Mechichi T, Stackebrandt E, Fuchs G (2003) *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing β -proteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:147–152. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02276-0>
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T (1995) Isolation and

- characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol Lett* 129:39–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00131-N](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00131-N)
- Noble KL (1997) Waterborne polyurethanes. *Prog Org Coatings* 32:131–136. [https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(97\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(97)00071-4)
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños-Nuñez S, Cruz-Gómez MJ, Wachter C, Loza-Tavera H (2007) Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol* 73:6214–6223. <https://doi.org/10.1128/AEM.01230-07>
- Oosterkamp MJ, Veuskens T, Plugge CM, Langenhoff AA, Gerritse J, van Berkel WJ, Pieper DH, Junca H, Goodwin LA, Daligault HE, Bruce DC, Detter JC, Tapia R, Han CS, Land ML, Hauser LJ, Smidt H, Stams AJ (2011) Genome sequences of *Alicyclophilus denitrificans* strains BC and K601^T. *J Bacteriol* 193 (18): 5028-9. <https://doi.org/10.1128/JB.00365-11>
- Osterman A (2009) Biogenesis and homeostasis of nicotinamide adenine dinucleotide cofactor. *EcoSal Plus* 3. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.10>
- Ozsagioglu E, Iyisan B, Guvenilir YA (2012) Biodegradation and characterization studies of different kinds of polyurethanes with several enzyme solutions. *Polish J Environ Stud* 21:1777–1782
- Pérez-Lara LF, Vargas-Suárez M, López-Castillo NN, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H (2016) Preliminary study on the biodegradation of adipate/phthalate polyester polyurethanes of commercial-type by *Alicyclophilus* sp. BQ8. *J Appl Polym Sci* 133:1–9. <https://doi.org/10.1002/app.42992>
- Phua SK, Castillo E, Anderson JM, Hiltner A (1987) Biodegradation of a polyurethane *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 21:231–246. <https://doi.org/10.1002/jbm.820210207>
- Piepenbreier H, Fritz G, Gebhard S (2017) Transporters as information processors in bacterial signalling pathways. *Mol Microbiol* 104:1–15. <https://doi.org/10.1111/mmi.13633>
- Poznyak IT, Oria CI, Posnyak SA (2019) Chapter 11 Biodegradation. *Ozonation and Biodegradation in Environmental Engineering*. 353-388. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812847-3.00023-8>.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* 46, D624-D632
- Rosa LT, Dix SR, Rafferty JB, Kelly DJ (2019) A new mechanism for high-affinity uptake of c4-dicarboxylates in bacteria revealed by the structure of *Rhodopseudomonas palustris* MatC (RPA3494), a periplasmic binding protein of the Tripartite Tricarboxylate Transporter (TTT) family. *J Mol Biol* 431:351–367. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.11.016>
- Rousidou C, Karaikos D, Myti D, Karanasios E, Karas PA, Tourna M, Tzortzakakis EA, Karpouzias DG (2017) Distribution and function of carbamate hydrolase genes *cehA* and *mcd* in soils: the distinct role of soil pH. *FEMS Microbiol Ecol* 93:1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw219>

- Rowe L, Howard GT (2002) Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeterior Biodegrad* 50:33–40. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00047-1)
- Ru J, Huo Y, Yang Y (2020) Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Front Microbiol* 11:1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>
- Sahu RK, Prakash V (2008) Mechanism of prevention of aggregation of proteins: a case study of aggregation of alpha-globulin in glycerol. *Int J Food Prop* 11(3):613–623. <https://doi.org/10.1080/10942910701580367>
- Shah Z, Krumholz L, Aktas DF, Hasan F, Khattak M, Shah AA (2013) Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation* 24:865–877. <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9634-5>
- Sigrist CJA, De Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* 41:344–347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Solís-González CJ, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, Gaytán I, Cevallos MÁ, Lozano L, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H (2018) Novel metabolic pathway for N-methylpyrrolidone degradation in *Alicyclophilus* sp. strain BQ1. *Appl Environ Microbiol* 84:1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.02136-17>
- Solís-González CJ, Loza-Tavera H (2019) *Alicyclophilus*: current knowledge and potential for bioremediation of xenobiotics. *J Appl Microbiol* 126:1643–1656. <https://doi.org/10.1111/jam.14207>
- Sonnenschein MF (2015) Polyurethanes. Science, technology, markets and trends. Wiley and Sons, Inc.
- Spaans SK, Weusthuis RA, van der Oost J, Kengen SWM (2015) NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front Microbiol* 6:1–27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00742>
- Suenaga T, Hori T, Riya S, Hosomi M, Smets BF, Terada A (2019). Enrichment, isolation, and characterization of high-affinity N₂O-reducing bacteria in a gas-permeable membrane reactor. *Environmental science and technology* 53(20): 12101-12112. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02237>
- Tang DJ, He YQ, Feng JX, He BR, Jiang B Le, Lu GT, Chen B, Tang JL (2005) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence. *J Bacteriol* 187:6231–6237. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.6231-6237.2005>
- Tian S (2020) Recent advances in functional polyurethane and its application in leather manufacture: a review. *Polymers* 12:1–16. <https://doi.org/10.3390/polym12091996>
- Tomasek PH, Karns JS (1989) Cloning of a carbofuran hydrolase gene from *Achromobacter* sp. strain WM111 and its expression in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 171:4038–4044. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.4038-4044.1989>
- Ufarté L, Laville E, Duquesne S, Morgavi D, Robe P, Klopp C, Rizzo A, Pizzut-Serin S, Potocki-Veronese G (2017) Discovery of carbamate degrading enzymes by functional metagenomics. *PLoS One* 12:1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189201>
- Yang Y, Kang Z, Zhou J, Chen J, Du G (2014) High-level expression and

characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:301–308. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5916-z>

Zhang J, Yin JG, Hang BJ, Cai S, He J, Zhou SG, Li SP (2012) Cloning of a novel arylamidase gene from *Paracoccus* sp. strain FLN-7 that hydrolyzes amide pesticides. *Appl Environ Microbiol* 78:4848–4855. <https://doi.org/10.1128/AEM.00320-12>

Zhao C-J, Kobashi K (1994) Purification and characterization of iron-containing urethanase from *Bacillus licheniformis*. *Biol Pharm Bull* 17:773–778. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.773>

Zhou N Di, Gu XL, Zha XH, Tian YP (2014) Purification and characterization of a urethanase from *Penicillium variable*. *Appl Biochem Biotechnol* 172:351–360. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0526-2>

ANEXOS

Anexo I. Medios de cultivo

Medio mínimo (Nakajima-Kambe *et al.* 1995), composición por litro.

Solución A (10X)

KH ₂ PO ₄	20 g
K ₂ HPO ₄	70 g

Solución B (100X)

NH ₄ NO ₃	100 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	10 g

Solución C (1000 X)

ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ • 7 H ₂ O	10 mg
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	10 g
MnSO ₄ • 6 H ₂ O	10 g

1. Preparar las soluciones A y B, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
2. Preparar la solución C y esterilizar utilizando membranas de poro 0.22 µm.
3. A un volumen de 800 ml de agua estéril adicionar en condiciones asépticas 100 ml de solución A, 10 ml de solución B y 1 ml de solución C.
4. Según la fuente de carbono agregar 2.5 ml de Impranil®DLN para una concentración final de 1.25 mg ml⁻¹, o 25 ml de acetato 1M para una concentración final de 25 mM.
5. Aforar a 1000 ml.

Anexo II. Geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Acrilamida 30% para 100 ml

Acrilamida	30 g
Bis acrilamida	0.8 g

1. La acrilamida es neurotóxica cuando no se ha polimerizado por lo que siempre emplear guantes para manejarla.
2. Disolver en 80 ml de agua desionizada usando una parrilla con agitación y un poco de calor. Aforar a 100 ml con agua desionizada y filtrar con Whatman # 1 u otro papel de poro grande. Almacenar a 4°C.

Buffer separador para 100 ml (25X)

Tris-base	18.17 g
SDS al 20 %	2 ml

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N

1. Disolver el Tris-base en 80 ml de agua desionizada y ajustar el pH. Agregar el SDS y aforar a 100 ml. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer apilador para 100 ml (25X)

Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 ml

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 12 N

1. Disolver el Tris-base en 80 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8.
2. Agregar el SDS y aforar con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de carga 5X para 10 ml

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

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

Nota: antes de usar agregar 4 ml de β-mercaptoetanol por 20 ml de buffer de carga. Se debe usar 1/5 de buffer de carga por un volumen de la muestra.

Buffer de corrida 10X para 1L

Tris-base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

1. Disolver en 800 ml de agua desionizada la glicina, calentar un poco y agitar.
2. Agregar el Tris y esperar a que se solubilice, checar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8. No ajustarlo, si no está a ese pH es que se pesó mal el Tris o se usó el Tris-HCl. Volver a pesar.

3. Agregar el SDS en polvo, disolverlo y ajustar el volumen a 1000 ml. Almacenar a temperatura ambiente.
4. Antes de usarlo para correr el gel, medir 70 ml de este buffer 10X y llevarlo a 700 ml con agua desionizada.

Persulfato de amonio 20% (10 ml)

Persulfato de amonio 2 g

1. Disolver en 10 ml de agua desionizada.
2. Hacer alícuotas de 500 μ l en tubos Eppendorf, congelarlas a -20°C.
3. Un tubo se puede descongelar 3 o 4 veces más. Después es mejor desecharlo y usar otro tubo nuevo.

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

Azul de Coomassie para teñir geles (100 ml)

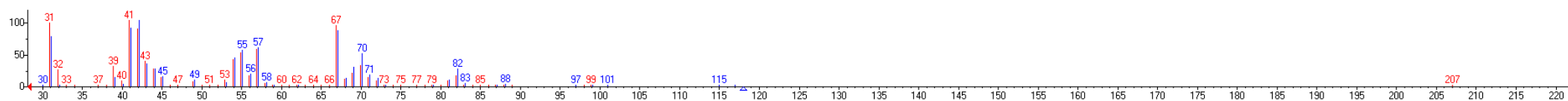
Coomassie brilliant blue R250	0.05 g
Metanol QP	50 ml
Agua	45 ml
Ácido acético glacial	10 ml

1. Disolver en un vaso de precipitados de vidrio el azul de Coomassie con metanol, añadir el ácido acético y el agua.
2. El Coomassie se une a proteínas por lo que se recomienda usar guantes para prepararlo. Almacenarlo a temperatura ambiente.

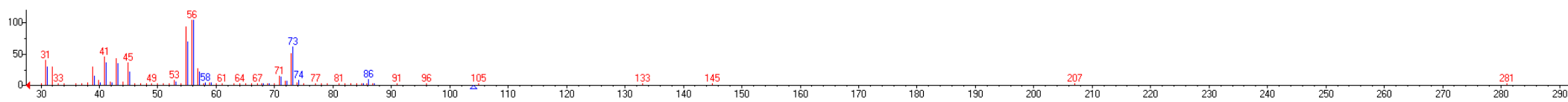
Anexo III. Espectros de masas de los compuestos identificados por GC-MS

Los compuestos identificados se muestran en color rojo y los hits (referencias) de la biblioteca en color azul.

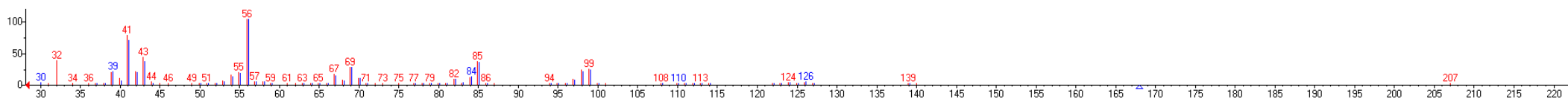
Compuesto 1: 1,6-hexanodiol, R-match 922



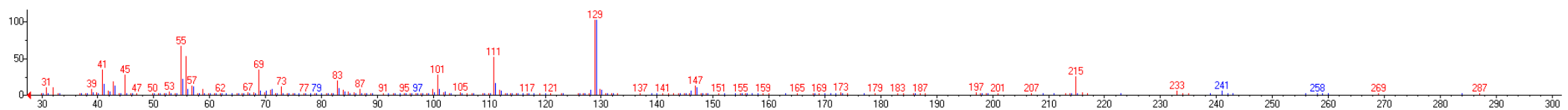
Compuesto 2: neopentil glicol, R-match 879



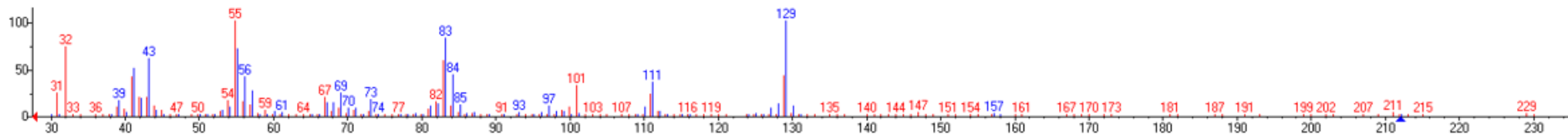
Compuesto 3: Derivado de hexameten diisocianato, R-match 944



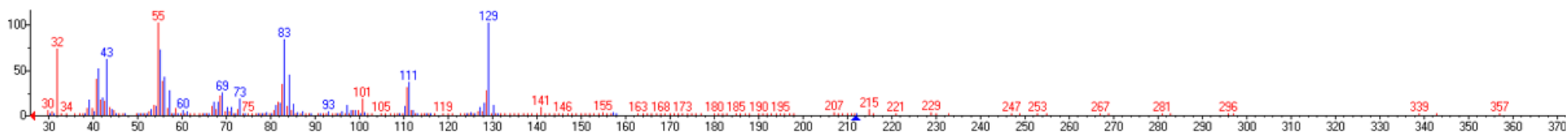
Compuesto 4: Ácido adípico, di (oct-4-il-éster), R-match 711, % probabilidad 6.29



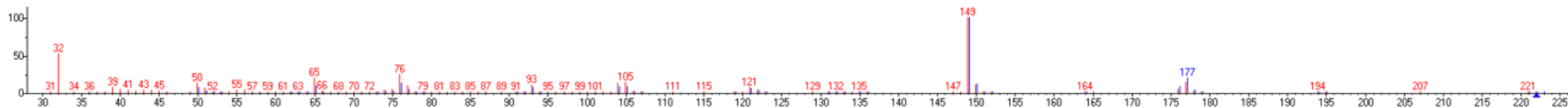
Compuesto 5: Ácido ciclohexano carboxílico, hexil éster, R-match 754, % probabilidad 5.2



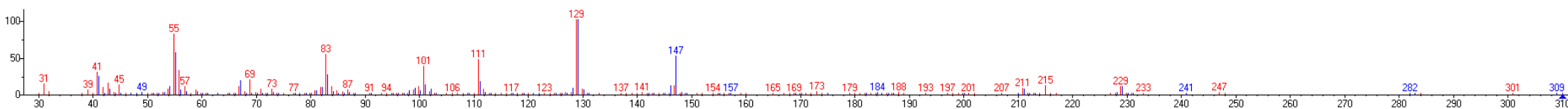
Compuesto 6: Ácido ciclohexano carboxílico, 2-tridecil éster, R-match 775, % probabilidad 4.67



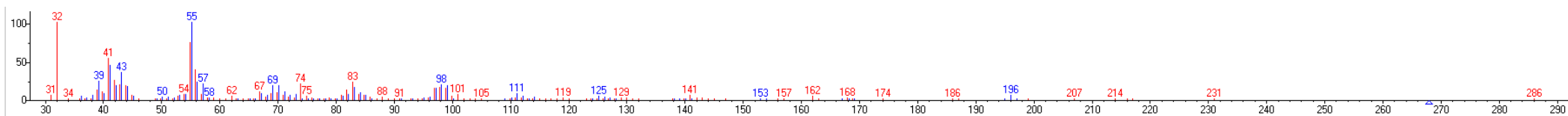
Compuesto 7: Dietil ftalato, R-match 943, % probabilidad 79.1



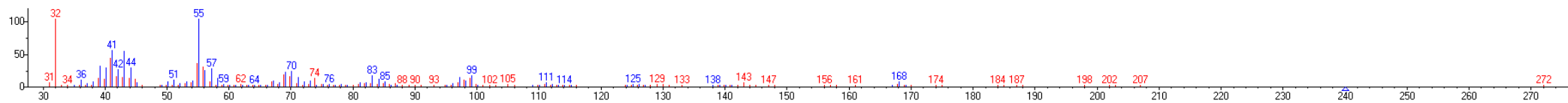
Compuesto 8: Diciclohexil adipato, R-match 762, %probabilidad 25.3



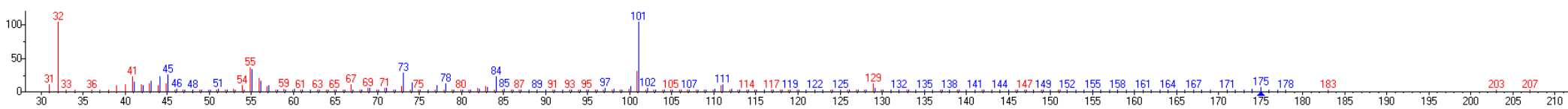
Compuesto 9: 2-(prop-2-enoiloxi) tetradecano, R-match 772, % probabilidad 10.3



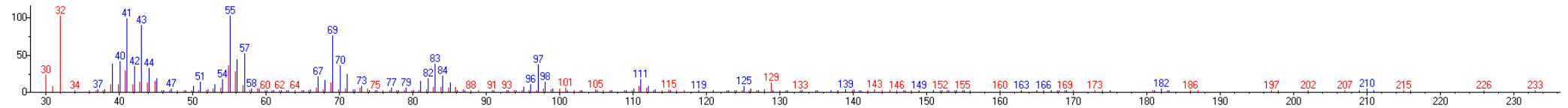
Compuesto 10: Ácido 2-propenoico, 1-metilundecil éster, R-match 786, % probabilidad 14.5



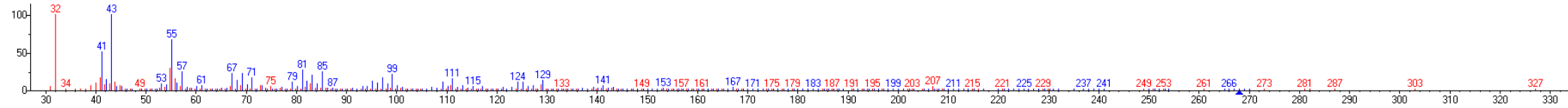
Compuesto 11: ácido 4-aminoheptanodioico, R-match 706, % probabilidad 26



Compuesto 12: 4-acetoxipentadecano, R-match 739, % probabilidad 5.82



Compuesto 13: 7-metil-Z-tetradecen-1-ol-acetato, R-match 700, % probabilidad 23.9



Anexo IV. Proteínas de *A. denitrificans* BQ1 expresadas en MM-Impranil con FC>2 y su correspondiente asignación KO.

El análisis se realizó usando la base de datos KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation) (<https://www.kegg.jp/blastkoala/con>) por lo que el “query” denota cada una de las proteínas que formaron parte del análisis. El KO corresponde al número K asignado y el score a la mayor puntuación utilizada para la asignación. El “Second best” contiene una posible alternativa de asignación, para el presente trabajo sólo se consideró el primer score.

Query	KO	Definition	Score	Second best		Fold-Change	
				R1	R2	R1	R2
RKJ99897.1 (784)	K00549	metE; 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [EC:2.1.1.14]	534			1.645	2.797
RKJ99887.1 (474)	K02433	gatA; aspartyl-tRNA(Asn)/glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A [EC:6.3.5.6 6.3.5.7]	184	K01426	12	0.000	2.622
RKJ99881.1 (266)	K01142	E3.1.11.2; exodeoxyribonuclease III [EC:3.1.11.2]	327			2.097	1.781
RKJ99886.1 (164)			53			exclusiva Impranil	
RKJ99851.1 (264)	K01803	TPI; triosephosphate isomerase (TIM) [EC:5.3.1.1]	232			2.773	3.895
RKJ99845.1 (309)	K02523	ispB; octaprenyl-diphosphate synthase [EC:2.5.1.90]	263			2.960	3.368
RKJ99844.1 (251)	K18778	zapD; cell division protein ZapD	276			1.864	2.363
RKJ99825.1 (478)	K01251	E3.3.1.1; adenosylhomocysteinase [EC:3.3.1.1]	419			1.790	2.531
RKJ99821.1 (293)			5	K03769	3	1.449	2.259
RKJ99816.1 (332)			233			exclusiva Impranil	
RKJ99812.1 (596)	K20035	dmdC; 3-(methylthio)propanoyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.-]	507			1.695	2.506
RKJ99800.1 (355)			270			2.036	1.521
RKJ99797.1 (323)			323			6.327	7.385
RKJ99769.1 (439)	K15509	hpsN; sulfopropanediol 3-dehydrogenase [EC:1.1.1.308]	366			41.142	29.557
RKJ99768.1 (253)			146			exclusiva Impranil	
RKJ99767.1 (346)			181			exclusiva Impranil	
RKJ99766.1 (330)			200			0.000	26.822
RKJ99765.1 (338)			139			46.012	0.000
RKJ99764.1 (232)			154			exclusiva Impranil	
RKJ99763.1 (261)	K02510	hpaI; 4-hydroxy-2-oxoheptanedioate aldolase [EC:4.1.2.52]	118	K12660	7	exclusiva Impranil	
RKJ99757.1 (310)	K03522	fixB; electron transfer flavoprotein alpha subunit	335			2.118	3.131
RKJ99740.1 (331)			187			2.616	3.238
RKJ99705.1 (682)	K01965	PCCA; propionyl-CoA carboxylase alpha chain [EC:6.4.1.3]	570			2.062	1.885

RKJ99702.1 (713)	K01847	MUT; methylmalonyl-CoA mutase [EC:5.4.99.2]	636			3.340	7.207
RKJ99691.1 (400)	K14267	dapC; N-succinyldiaminopimelate aminotransferase [EC:2.6.1.17]	447			3.946	3.524
RKJ99690.1 (274)	K00674	dapD; 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase [EC:2.3.1.117]	235			2.570	3.527
RKJ99689.1 (387)	K02670	pilU; twitching motility protein PilU	320			0.000	2.270
RKJ99688.1 (392)	K01439	dapE; succinyl-diaminopimelate desuccinylase [EC:3.5.1.18]	310			2.015	2.392
RKJ99687.1 (306)	K07320	prmB; ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase [EC:2.1.1.298]	208			exclusiva Impranil	
RKJ99665.1 (294)			164	K00020	17	1.990	2.655
RKJ99657.1 (322)			189			1.768	2.144
RKJ99652.1 (609)	K00382	DLD; dihydrolipoamide dehydrogenase [EC:1.8.1.4]	497			2.728	2.995
RKJ99650.1 (898)	K00163	aceE; pyruvate dehydrogenase E1 component [EC:1.2.4.1]	791			2.789	2.479
RKJ99646.1 (677)	K01414	prlC; oligopeptidase A [EC:3.4.24.70]	560			1.734	2.442
RKJ99644.1 (229)	K01807	rpiA; ribose 5-phosphate isomerase A [EC:5.3.1.6]	181			3.432	3.087
RKJ99629.1 (133)	K04488	iscU; nitrogen fixation protein NifU and related proteins	169			exclusiva Impranil	
RKJ99628.1 (406)	K04487	iscS; cysteine desulfurase [EC:2.8.1.7]	381			3.237	3.358
RKJ99611.1 (256)			167			0.990	2.239
RKJ99610.1 (394)	K00626	E2.3.1.9; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	338			1.044	2.041
RKJ99604.1 (377)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	300			exclusiva Impranil	
RKJ99597.1 (383)	K14287	ybdL; methionine transaminase [EC:2.6.1.88]	326			3.691	4.003
RKJ99572.1 (239)			216			1.007	2.864
RKJ99559.1 (423)	K00928	lysC; aspartate kinase [EC:2.7.2.4]	368			2.344	3.550
RKJ99555.1 (458)	K01883	CARS; cysteinyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.16]	386			1.263	2.165
RKJ99509.1 (302)			231			1.351	2.181
RKJ99506.1 (373)	K14652	ribBA; 3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase / GTP cyclohydrolase II [EC:4.1.99.12 3.5.4.25]	457			1.698	2.547
RKJ99496.1 (668)	K02298	cyoB; cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I [EC:7.1.1.3]	784			0.000	6.846
RKJ99484.1 (674)			105	K00698	1	4.359	0.486
RKJ99477.1 (263)	K03519	coxM; aerobic carbon-monoxide dehydrogenase medium subunit [EC:1.2.5.3]	175			2.671	0.000
RKJ99476.1 (790)	K03520	coxL; aerobic carbon-monoxide dehydrogenase large subunit [EC:1.2.5.3]	667			exclusiva Impranil	
RKJ99474.1 (449)	K00383	GSR; glutathione reductase (NADPH) [EC:1.8.1.7]	355			3.253	4.353
RKJ99473.1 (330)			203			exclusiva Impranil	
RKJ99435.1 (609)	K06207	typA; GTP-binding protein	556			2.041	4.159
RKJ99433.1 (126)	K02834	rbfA; ribosome-binding factor A	140			2.945	0.000

RKJ99431.1 (494)	K02600	nusA; N utilization substance protein A	443			1.976	2.177
RKJ99423.1 (414)	K00600	glyA; glycine hydroxymethyltransferase [EC:2.1.2.1]	377			3.083	2.571
RKJ99420.1 (151)			173			1.436	2.116
RKJ99414.1 (314)	K01011	TST; thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase [EC:2.8.1.1 2.8.1.2]	241			2.183	1.948
RKJ99411.1 (509)	K07793	tctA; putative tricarboxylic transport membrane protein	406			2.277	2.021
RKJ99409.1 (319)	K07795	tctC; putative tricarboxylic transport membrane protein	317			3.110	4.439
RKJ99399.1 (864)	K20455	acnD; 2-methylcitrate dehydratase (2-methyl-trans-aconitate forming) [EC:4.2.1.117]	1006			0.000	23.410
RKJ99398.1 (392)	K09788	prpF; 2-methylaconitate isomerase [EC:5.3.3.-]	420			0.000	14.193
RKJ99397.1 (286)			224				exclusiva Impranil
RKJ99387.1 (338)	K07119	uncharacterized protein	399			4.187	8.438
RKJ99385.1 (263)	K00046	idnO; gluconate 5-dehydrogenase [EC:1.1.1.69]	221			4.833	6.100
RKJ99376.1 (561)	K02945	RP-S1; small subunit ribosomal protein S1	533			1.057	2.070
RKJ99360.1 (371)	K10680	nemA; N-ethylmaleimide reductase [EC:1.-.-.-]	406			1.110	2.353
RKJ99359.1 (202)	K00799	GST; glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	165			2.216	2.324
RKJ99345.1 (470)	K00102	LDHD; D-lactate dehydrogenase (cytochrome) [EC:1.1.2.4]	492			0.949	2.200
RKJ99343.1 (140)	K19222	menI; 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA hydrolase [EC:3.1.2.28]	133			0.664	2.220
RKJ99331.1 (328)			169			1.637	2.437
RKJ99311.1 (622)	K01596	E4.1.1.32; phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) [EC:4.1.1.32]	753			1.630	2.073
RKJ99310.1 (399)	K01754	E4.3.1.19; threonine dehydratase [EC:4.3.1.19]	311			0.330	2.002
RKJ99296.1 (387)	K00249	ACADM; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.7]	264			2.954	4.110
RKJ99294.1 (321)			201				exclusiva Impranil
RKJ99277.1 (334)			289				exclusiva Impranil
RKJ99273.1 (330)			194				exclusiva Impranil
RKJ99272.1 (151)			34	K02614	1	1.522	3.340
RKJ99271.1 (336)			209				exclusiva Impranil
RKJ99270.1 (328)			232			0.000	8.401
RKJ99269.1 (380)			116	K00249	84		exclusiva Impranil
RKJ99268.1 (515)			229	K00666	43		exclusiva Impranil
RKJ99267.1 (392)	K00632	fadA; acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	213	K00626	73	43.228	77.370
RKJ99266.1 (255)			171				exclusiva Impranil

RKJ99265.1 (332)			209			exclusiva Impranil
RKJ99264.1 (268)			160			exclusiva Impranil
RKJ99262.1 (369)	K01796	E5.1.99.4; alpha-methylacyl-CoA racemase [EC:5.1.99.4]	152			exclusiva Impranil
RKJ99252.1 (287)	K01644	citE; citrate lyase subunit beta / citryl-CoA lyase [EC:4.1.3.34]	146			exclusiva Impranil
RKJ99251.1 (331)			218			2.895 0.000
RKJ99239.1 (341)			161			exclusiva Impranil
RKJ99228.1 (327)			227			2.236 3.193
RKJ99165.1 (329)			90			exclusiva Impranil
RKJ99154.1 (369)	K11472	glcE; glycolate oxidase FAD binding subunit	229			0.000 3.003
RKJ99136.1 (352)	K00459	ncd2; nitronate monooxygenase [EC:1.13.12.16]	179			2.497 3.553
RKJ99056.1 (481)	K02434	gatB; aspartyl-tRNA(Asn)/glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B [EC:6.3.5.6 6.3.5.7]	500			2.639 3.983
RKJ99053.1 (496)	K02433	gatA; aspartyl-tRNA(Asn)/glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A [EC:6.3.5.6 6.3.5.7]	552			2.025 0.796
RKJ99027.1 (399)	K03543	emrA; membrane fusion protein, multidrug efflux system	259			exclusiva Impranil
RKJ99009.1 (157)	K02992	RP-S7; small subunit ribosomal protein S7	147			1.760 4.156
RKJ99008.1 (702)	K02355	fusA; elongation factor G	641			1.150 2.225
RKJ99006.1 (103)	K02946	RP-S10; small subunit ribosomal protein S10	143			2.322 9.006
RKJ99003.1 (104)	K02892	RP-L23; large subunit ribosomal protein L23	87			0.939 2.728
RKJ99004.1 (206)	K02926	RP-L4; large subunit ribosomal protein L4	271			1.003 2.271
RKJ99005.1 (224)	K02906	RP-L3; large subunit ribosomal protein L3	283			2.229 2.344
RKJ99002.1 (274)	K02886	RP-L2; large subunit ribosomal protein L2	251			9.812 23.066
RKJ99001.1 (91)	K02965	RP-S19; small subunit ribosomal protein S19	127			0.776 3.291
RKJ98996.1 (89)	K02961	RP-S17; small subunit ribosomal protein S17	105			0.000 4.110
RKJ98997.1 (65)	K02904	RP-L29; large subunit ribosomal protein L29	65			1.985 2.023
RKJ98998.1 (138)	K02878	RP-L16; large subunit ribosomal protein L16	191			3.316 0.000
RKJ98992.1 (167)			130			0.910 3.165
RKJ98987.1 (230)	K03801	lipB; lipoyl(octanoyl) transferase [EC:2.3.1.181]	245			0.000 2.468
RKJ98966.1 (206)	K03577	acrR; TetR/AcrR family transcriptional regulator, acrAB operon repressor	111			0.000 7.962
RKJ98965.1 (396)	K02358	tuf; elongation factor Tu	378			2.657 2.255
RKJ98960.1 (168)	K02864	RP-L10; large subunit ribosomal protein L10	185			0.607 2.480
RKJ98959.1 (126)	K02935	RP-L7; large subunit ribosomal protein L7/L12	85			1.216 27.366
RKJ98951.1 (407)			201	K07749	44	exclusiva Impranil

RKJ98950.1 (248)	K00059	fabG; 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]	122			exclusiva Impranil
RKJ98949.1 (386)	K01796	E5.1.99.4; alpha-methylacyl-CoA racemase [EC:5.1.99.4]	146			exclusiva Impranil
RKJ98948.1 (309)			80			1.423 2.395
RKJ98947.1 (326)			144			exclusiva Impranil
RKJ98946.1 (152)			65			exclusiva Impranil
RKJ98945.1 (417)			208			exclusiva Impranil
RKJ98936.1 (378)	K02670	pilU; twitching motility protein PilU	356			exclusiva Impranil
RKJ98934.1 (347)	K02669	pilT; twitching motility protein PilT	335			1.504 2.307
RKJ98932.1 (376)			351			3.074 2.137
RKJ98933.1 (240)	K06997	yggS; PLP dependent protein	209			3.421 5.921
RKJ98894.1 (128)	K02884	RP-L19; large subunit ribosomal protein L19	155			5.060 0.000
RKJ98892.1 (84)	K02959	RP-S16; small subunit ribosomal protein S16	87			4.510 5.695
RKJ98869.1 (316)	K00384	trxB; thioredoxin reductase (NADPH) [EC:1.8.1.9]	284			2.657 2.892
RKJ98860.1 (393)			360			9.561 17.882
RKJ98859.1 (371)			294			13.256 14.660
RKJ98858.1 (348)	K11753	ribF; riboflavin kinase / FMN adenylyltransferase [EC:2.7.1.26 2.7.7.2]	284			1.020 2.865
RKJ98854.1 (337)	K02055	ABC.SP.S; putative spermidine/putrescine transport system substrate-binding protein	251			1.164 3.774
RKJ98846.1 (321)			161			exclusiva Impranil
RKJ98841.1 (328)	K00344	qor; NADPH2:quinone reductase [EC:1.6.5.5]	285			4.654 4.886
RKJ98837.1 (276)	K00059	fabG; 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]	199			1.066 2.199
RKJ98818.1 (370)	K02001	proW; glycine betaine/proline transport system permease protein	292			2.384 1.604
RKJ98802.1 (317)	K01092	E3.1.3.25; myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase [EC:3.1.3.25]	230			0.000 10.323
RKJ98801.1 (204)			165			1.475 2.118
RKJ98779.1 (408)	K13038	coaBC; phosphopantothenoylecysteine decarboxylase / phosphopantothenate---cysteine ligase [EC:4.1.1.36 6.3.2.5]	334			2.146 1.304
RKJ98768.1 (384)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate- binding protein	204			exclusiva Impranil
RKJ98754.1 (328)	K04083	hslO; molecular chaperone Hsp33	357			1.149 2.097
RKJ98743.1 (321)			255			1.957 3.314
RKJ98732.1 (447)	K00262	E1.4.1.4; glutamate dehydrogenase (NADP+) [EC:1.4.1.4]	400			2.154 2.119
RKJ98727.1 (669)	K00341	nuoL; NADH-quinone oxidoreductase subunit L [EC:7.1.1.2]	555			exclusiva Impranil
RKJ98725.1 (222)	K00339	nuoJ; NADH-quinone oxidoreductase subunit J [EC:7.1.1.2]	184			0.728 2.303

RKJ98723.1 (358)	K00337	nuoH; NADH-quinone oxidoreductase subunit H [EC:7.1.1.2]	422			1.191	3.523
RKJ98724.1 (170)	K00338	nuoI; NADH-quinone oxidoreductase subunit I [EC:7.1.1.2]	146			2.985	1.000
RKJ98715.1 (334)			215	K00344	51	2.382	1.096
RKJ98680.1 (1780)			684			3.510	2.953
RKJ98669.1 (245)	K00989	rph; ribonuclease PH [EC:2.7.7.56]	272			3.897	2.795
RKJ98664.1 (298)	K00858	ppnK; NAD+ kinase [EC:2.7.1.23]	229			0.636	1.476
RKJ98654.1 (208)	K02897	RP-L25; large subunit ribosomal protein L25	166			0.754	2.175
RKJ98650.1 (572)			156			exclusiva Impranil	
RKJ98643.1 (496)	K02035	ABC.PE.S; peptide/nickel transport system substrate-binding protein	509			3.273	1.999
RKJ98585.1 (579)	K02652	pilB; type IV pilus assembly protein PilB	488			1.238	3.212
RKJ98559.1 (259)	K02500	hisF; imidazole glycerol-phosphate synthase subunit HisF [EC:4.3.2.10]	231			2.979	0.950
RKJ98560.1 (129)	K01496	hisI; phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase [EC:3.5.4.19]	165			10.277	0.000
RKJ98558.1 (338)	K01784	galE; UDP-glucose 4-epimerase [EC:5.1.3.2]	248			0.879	2.074
RKJ98549.1 (247)	K01814	hisA; phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase [EC:5.3.1.16]	223			0.589	2.076
RKJ98546.1 (372)	K00817	hisC; histidinol-phosphate aminotransferase [EC:2.6.1.9]	263			3.810	5.618
RKJ98544.1 (438)	K00013	hisD; histidinol dehydrogenase [EC:1.1.1.23]	512			2.201	1.261
RKJ98520.1 (492)	K00266	gltD; glutamate synthase (NADPH) small chain [EC:1.4.1.13]	423			exclusiva Impranil	
RKJ98510.1 (515)			128			0.000	2.107
RKJ98507.1 (227)	K02664	pilO; type IV pilus assembly protein PilO	164			2.150	1.374
RKJ98503.1 (109)	K06202	cyaY; CyaY protein	118			0.000	3.709
RKJ98501.1 (429)	K01586	lysA; diaminopimelate decarboxylase [EC:4.1.1.20]	335			1.956	2.018
RKJ98498.1 (332)	K07147	msrP; methionine sulfoxide reductase catalytic subunit [EC:1.8.-.-]	315			1.495	2.776
RKJ98490.1 (548)	K04077	groEL; chaperonin GroEL	629			1.821	2.333
RKJ98474.1 (316)	K00616	E2.2.1.2; transaldolase [EC:2.2.1.2]	268			4.144	1.889
RKJ98475.1 (531)	K01810	GPI; glucose-6-phosphate isomerase [EC:5.3.1.9]	523			1.048	2.176
RKJ98465.1 (346)			199			2.012	1.335
RKJ98445.1 (684)	K02355	fusA; elongation factor G	474			exclusiva Impranil	
RKJ98435.1 (239)			129			2.031	0.706
RKJ98434.1 (502)			391	K01897	45	1.008	2.275
RKJ98424.1 (401)	K01586	lysA; diaminopimelate decarboxylase [EC:4.1.1.20]	274			2.469	0.331
RKJ98417.1 (630)			192			5.920	7.085
RKJ98410.1 (383)	K01791	wecB; UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolysing) [EC:5.1.3.14]	241			0.936	2.060

RKJ98399.1 (520)			275			0.000	4.824
RKJ98388.1 (332)	K05516	cbpA; curved DNA-binding protein	204			2.064	0.000
RKJ98377.1 (142)	K02871	RP-L13; large subunit ribosomal protein L13	185			1.198	2.533
RKJ98378.1 (130)	K02996	RP-S9; small subunit ribosomal protein S9	174			1.418	3.518
RKJ98368.1 (245)	K10004	gltL; glutamate/aspartate transport system ATP-binding protein [EC:7.4.2.1]	232			3.116	1.292
RKJ98366.1 (250)	K10003	gltJ; glutamate/aspartate transport system permease protein	290			0.000	7.457
RKJ98361.1 (343)			363			1.352	2.672
RKJ98359.1 (141)	K10806	yciA; acyl-CoA thioesterase YciA [EC:3.1.2.-]	110			1.710	2.917
RKJ98357.1 (258)			255			1.963	3.922
RKJ98355.1 (397)	K00632	fadA; acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	334			4.206	5.504
RKJ98354.1 (800)	K07516	fadN; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]	675			3.993	5.318
RKJ98352.1 (598)			545			2.757	3.641
RKJ98343.1 (387)	K20444	rfbC; O-antigen biosynthesis protein [EC:2.4.1.-]	178			5.040	0.000
RKJ98326.1 (296)	K00973	E2.7.7.24; glucose-1-phosphate thymidyltransferase [EC:2.7.7.24]	244			2.888	2.195
RKJ98313.1 (465)	K00382	DLD; dihydrolipoamide dehydrogenase [EC:1.8.1.4]	339			0.900	2.735
RKJ98305.1 (295)	K06189	corC; magnesium and cobalt transporter	219			1.618	2.723
RKJ98296.1 (227)	K07336	PKHD-type hydroxylase [EC:1.14.11.-]	170			1.475	3.165
RKJ98244.1 (494)	K01241	amn; AMP nucleosidase [EC:3.2.2.4]	605			3.863	0.000
RKJ98243.1 (570)			271				exclusiva Impranil
RKJ98237.1 (282)	K00074	paaH; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	250			2.686	2.869
RKJ98223.1 (437)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	334			2.565	2.747
RKJ98220.1 (329)			240			1.066	2.264
RKJ98221.1 (415)	K01912	paaK; phenylacetate-CoA ligase [EC:6.2.1.30]	467			2.526	2.621
RKJ98218.1 (338)			316			10.230	11.988
RKJ98210.1 (291)	K01644	citE; citrate lyase subunit beta / citryl-CoA lyase [EC:4.1.3.34]	127			1.717	2.079
RKJ98200.1 (329)	K16171	faaH; fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase [EC:3.7.1.2]	285			3.015	1.277
RKJ97462.1 (331)							exclusiva Impranil
RKJ97424.1 (553)	K14448	mcd; (2S)-methylsuccinyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.12]	283			1.579	2.154
RKJ97409.1 (349)	K06917	selU; tRNA 2-selenouridine synthase [EC:2.9.1.-]	250				exclusiva Impranil
RKJ97373.1 (481)	K02407	fliD; flagellar hook-associated protein 2	249			2.934	0.000
RKJ97372.1 (489)	K02406	fliC; flagellin	258			2.028	1.313
RKJ97368.1 (491)	K02406	fliC; flagellin	251			5.719	7.195

RKJ97365.1 (128)	K03413	cheY; two-component system, chemotaxis family, chemotaxis protein CheY	108			4.919	0.000
RKJ97346.1 (660)	K02396	flgK; flagellar hook-associated protein 1 FlgK	397				exclusiva Impranil
RKJ97339.1 (323)	K01754	E4.3.1.19; threonine dehydratase [EC:4.3.1.19]	222			2.168	1.457
RKJ97332.1 (326)			147			1.678	3.044
RKJ97327.1 (372)	K01599	hemE; uroporphyrinogen decarboxylase [EC:4.1.1.37]	320			1.620	2.178
RKJ97322.1 (395)	K00626	E2.3.1.9; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	325			0.000	3.823
RKJ97318.1 (393)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	300			0.000	23.616
RKJ97285.1 (329)			214			2.059	0.934
RKJ97284.1 (488)	K22879	hpyO; FAD-dependent urate hydroxylase [EC:1.14.13.113]	350			0.978	2.235
RKJ97278.1 (129)	K02879	RP-L17; large subunit ribosomal protein L17	151			0.627	3.474
RKJ97274.1 (121)	K02952	RP-S13; small subunit ribosomal protein S13	115			0.895	3.934
RKJ97269.1 (121)	K02881	RP-L18; large subunit ribosomal protein L18	123			0.786	20.933
RKJ97266.1 (101)	K02954	RP-S14; small subunit ribosomal protein S14	122			2.993	5.864
RKJ97259.1 (279)	K00286	proC; pyrroline-5-carboxylate reductase [EC:1.5.1.2]	177			0.812	2.022
RKJ97246.1 (266)	K01609	trpC; indole-3-glycerol phosphate synthase [EC:4.1.1.48]	287			1.366	2.064
RKJ97223.1 (374)	K06048	gshA; glutamate---cysteine ligase / carboxylate-amine ligase [EC:6.3.2.2 6.3.-.]	451			1.914	2.491
RKJ97222.1 (328)	K00946	thiL; thiamine-monophosphate kinase [EC:2.7.4.16]	304			1.526	2.006
RKJ97210.1 (396)	K00925	ackA; acetate kinase [EC:2.7.2.1]	390			0.000	3.232
RKJ97207.1 (542)	K05874	tsr; methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	214				exclusiva Impranil
RKJ97199.1 (146)			79	K01075	4	0.000	2.683
RKJ97193.1 (567)	K01887	RARS; arginyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.19]	485			3.738	2.324
RKJ97180.1 (369)	K03412	cheB; two-component system, chemotaxis family, protein-glutamate methylesterase/glutaminase [EC:3.1.1.61 3.5.1.44]	414			2.091	1.497
RKJ97177.1 (160)	K03408	cheW; purine-binding chemotaxis protein CheW	166				exclusiva Impranil
RKJ97175.1 (120)	K03413	cheY; two-component system, chemotaxis family, chemotaxis protein CheY	123			3.906	4.038
RKJ97156.1 (266)	K00208	fabI; enoyl-[acyl-carrier protein] reductase I [EC:1.3.1.9 1.3.1.10]	239			2.094	2.582
RKJ97155.1 (607)	K13893	yejA; microcin C transport system substrate-binding protein	654			2.287	0.000
RKJ97146.1 (327)			231			0.000	4.940
RKJ97142.1 (475)	K00382	DLD; dihydrolipoamide dehydrogenase [EC:1.8.1.4]	416			0.000	2.455
RKJ97099.1 (320)	K01424	E3.5.1.1; L-asparaginase [EC:3.5.1.1]	233			2.911	0.000
RKJ97091.1 (193)	K04564	SOD2; superoxide dismutase, Fe-Mn family [EC:1.15.1.1]	165	K03601	6	3.652	5.388

RKJ97065.1 (1339)	K01952	purL; phosphoribosylformylglycinamide synthase [EC:6.3.5.3]	1099			2.259	1.928
RKJ97058.1 (210)	K07734	paiB; transcriptional regulator	145				exclusiva Impranil
RKJ97051.1 (462)	K01840	manB; phosphomannomutase [EC:5.4.2.8]	403			2.881	3.107
RKJ97026.1 (402)	K06001	trpB; tryptophan synthase beta chain [EC:4.2.1.20]	356			2.895	2.086
RKJ97024.1 (295)	K00020	mmsB; 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [EC:1.1.1.31]	210			2.860	2.779
RKJ97022.1 (388)			339			2.044	2.019
RKJ97020.1 (505)	K00140	mmsA; malonate-semialdehyde dehydrogenase (acetylating) / methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.18 1.2.1.27]	463			1.433	2.394
RKJ97011.1 (409)	K01760	metC; cysteine-S-conjugate beta-lyase [EC:4.4.1.13]	305			0.958	2.351
RKJ97008.1 (240)	K02003	ABC.CD.A; putative ABC transport system ATP-binding protein	177			4.019	3.150
RKJ96981.1 (119)	K02887	RP-L20; large subunit ribosomal protein L20	150			0.913	3.396
RKJ96963.1 (298)	K00796	folP; dihydropteroate synthase [EC:2.5.1.15]	191			2.072	0.368
RKJ96943.1 (591)	K01474	hyuB; N-methylhydantoinase B [EC:3.5.2.14]	147	K01469	7		exclusiva Impranil
RKJ96942.1 (675)	K01473	hyuA; N-methylhydantoinase A [EC:3.5.2.14]	226				exclusiva Impranil
RKJ96938.1 (1093)	K16898	addA; ATP-dependent helicase/nuclease subunit A [EC:3.1.-.- 3.6.4.12]	562				exclusiva Impranil
RKJ96937.1 (293)	K06911	uncharacterized protein	170			0.771	4.790
RKJ96865.1 (324)			150				exclusiva Impranil
RKJ96843.1 (422)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	310			1.626	3.870
RKJ96838.1 (327)	K21395	viaO; TRAP-type transport system periplasmic protein	58				exclusiva Impranil
RKJ96829.1 (319)			332			2.617	2.477
RKJ96828.1 (250)	K03521	fixA; electron transfer flavoprotein beta subunit	218			2.231	2.649
RKJ96827.1 (310)	K03522	fixB; electron transfer flavoprotein alpha subunit	357			2.325	2.611
RKJ96809.1 (564)			373	K07455	48	1.109	2.143
RKJ96748.1 (103)			67			0.000	2.463
RKJ96741.1 (298)	K00856	E2.7.1.20; adenosine kinase [EC:2.7.1.20]	306			2.899	3.519
RKJ96728.1 (239)	K03981	dsbC; thiol:disulfide interchange protein DsbC [EC:5.3.4.1]	182			1.705	2.736
RKJ96714.1 (359)	K02371	fabK; enoyl-[acyl-carrier protein] reductase II [EC:1.3.1.9]	35			2.109	0.000
RKJ96697.1 (335)			233				exclusiva Impranil
RKJ96689.1 (134)	K02657	pilG; twitching motility two-component system response regulator PilG	160				exclusiva Impranil
RKJ96684.1 (208)	K07735	algH; putative transcriptional regulator	160				exclusiva Impranil
RKJ96682.1 (178)	K02825	pyrR; pyrimidine operon attenuation protein / uracil phosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.9]	121			0.920	2.939

RKJ96601.1 (231)	K01031	pcaI; 3-oxoadipate CoA-transferase, alpha subunit [EC:2.8.3.6]	241			3.144	7.922
RKJ96600.1 (214)	K01032	pcaJ; 3-oxoadipate CoA-transferase, beta subunit [EC:2.8.3.6]	222			0.000	5.125
RKJ96598.1 (241)			159				exclusiva Impranil
RKJ96599.1 (400)			273	K00632	34	3.292	6.698
RKJ96597.1 (330)			216			3.586	5.229
RKJ96575.1 (387)	K02275	coxB; cytochrome c oxidase subunit II [EC:1.9.3.1]	289			2.087	3.471
RKJ96574.1 (544)	K02274	coxA; cytochrome c oxidase subunit I [EC:1.9.3.1]	653				exclusiva Impranil
RKJ96562.1 (355)	K13953	adhP; alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	193	K00001	18	1.289	2.457
RKJ96561.1 (360)			190			2.687	3.322
RKJ96560.1 (245)	K02030	ABC.PA.S; polar amino acid transport system substrate-binding protein	192			4.252	8.949
RKJ96559.1 (881)	K01681	ACO; aconitate hydratase [EC:4.2.1.3]	785				exclusiva Impranil
RKJ96558.1 (323)			174			0.000	6.324
RKJ96557.1 (329)			167				exclusiva Impranil
RKJ96549.1 (452)	K07263	pqqL; zinc protease [EC:3.4.24.-]	321			3.812	3.473
RKJ96546.1 (104)			67			1.279	3.519
RKJ96538.1 (247)	K01834	PGAM; 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.11]	267			2.279	3.282
RKJ96535.1 (328)	K00057	gpsA; glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) [EC:1.1.1.94]	226			0.595	3.924
RKJ96532.1 (294)	K00606	panB; 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase [EC:2.1.2.11]	236			0.944	2.204
RKJ96531.1 (293)	K00767	nadC; nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating) [EC:2.4.2.19]	192			2.194	1.071
RKJ96530.1 (374)	K03517	nadA; quinolinate synthase [EC:2.5.1.72]	434			0.555	2.934
RKJ96523.1 (353)	K02529	lacl; LacI family transcriptional regulator	113				exclusiva Impranil
RKJ96484.1 (206)	K00124	fdoH; formate dehydrogenase iron-sulfur subunit	195				exclusiva Impranil
RKJ96482.1 (398)	K00127	fdol; formate dehydrogenase subunit gamma	243				exclusiva Impranil
RKJ96453.1 (391)							exclusiva Impranil
RKJ96443.1 (563)	K01687	ilvD; dihydroxy-acid dehydratase [EC:4.2.1.9]	642			2.517	0.000
RKJ96434.1 (517)	K18661	matB; malonyl-CoA/methylmalonyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.-]	610			1.762	2.079
RKJ96427.1 (304)	K00406	ccoP; cytochrome c oxidase cbb3-type subunit III	252				exclusiva Impranil
RKJ96414.1 (194)	K02231	cobP; adenosylcobinamide kinase / adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase [EC:2.7.1.156 2.7.7.62]	129			0.000	5.856

RKJ96413.1 (299)	K02016	ABC.FEV.S; iron complex transport system substrate-binding protein	181			4.888	2.196
RKJ96399.1 (410)	K14260	alaA; alanine-synthesizing transaminase [EC:2.6.1.66 2.6.1.2]	381			2.138	1.955
RKJ96390.1 (158)	K03635	MOCS2B; molybdopterin synthase catalytic subunit [EC:2.8.1.12]	129			1.983	2.449
RKJ96384.1 (537)			285			exclusiva	Impranil
RKJ96381.1 (1244)	K02674	pilY1; type IV pilus assembly protein PilY1	174			exclusiva	Impranil
RKJ96374.1 (352)	K00768	E2.4.2.21; nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.21]	234			0.651	2.100
RKJ96356.1 (486)	K01755	argH; argininosuccinate lyase [EC:4.3.2.1]	418			1.027	2.049
RKJ96330.1 (346)	K04773	sppA; protease IV [EC:3.4.21.-]	238			exclusiva	Impranil
RKJ96323.1 (317)	K00645	fabD; [acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase [EC:2.3.1.39]	322			3.770	3.142
RKJ96320.1 (414)	K09458	fabF; 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II [EC:2.3.1.179]	372			3.579	3.300
RKJ96302.1 (372)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	296			1.369	2.015
RKJ96276.1 (422)	K01696	trpB; tryptophan synthase beta chain [EC:4.2.1.20]	550			1.488	3.792
RKJ96272.1 (370)	K00133	asd; aspartate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.11]	314			4.391	3.969
RKJ96259.1 (456)	K01667	tnaA; tryptophanase [EC:4.1.99.1]	376			2.365	0.985
RKJ96254.1 (124)	K02990	RP-S6; small subunit ribosomal protein S6	133			3.247	5.302
RKJ96237.1 (591)	K06016	pydC; beta-ureidopropionase / N-carbamoyl-L-amino-acid hydrolase [EC:3.5.1.6 3.5.1.87]	492			4.745	2.413
RKJ96238.1 (417)			339			3.938	4.757
RKJ96236.1 (319)			373			0.000	3.738
RKJ96220.1 (351)	K13979	yahK; uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein [EC:1.-.-.]	288			9.707	0.000
RKJ96169.1 (429)	K01892	HARS; histidyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.21]	343			1.323	2.194
RKJ96160.1 (458)	K01939	purA; adenylosuccinate synthase [EC:6.3.4.4]	589			2.774	2.709
RKJ95716.1 (237)	K09761	rsmE; 16S rRNA (uracil1498-N3)-methyltransferase [EC:2.1.1.193]	199			exclusiva	Impranil
RKJ95712.1 (328)			230			13.066	4.941
RKJ95705.1 (114)			73			0.283	2.354
RKJ95685.1 (197)			26	K06006	1	0.000	6.814
RKJ95682.1 (266)	K01692	paaF; enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17]	91			exclusiva	Impranil
RKJ95680.1 (321)			180			exclusiva	Impranil
RKJ95676.1 (330)			198			exclusiva	Impranil
RKJ95674.1 (250)			102	K01715	8	exclusiva	Impranil
RKJ95673.1 (327)			120			exclusiva	Impranil

RKJ95641.1 (516)	K13889	gsiB; glutathione transport system substrate-binding protein	350			1.417	2.553
RKJ95633.1 (295)			201			4.181	3.674
RKJ95626.1 (190)	K03270	kdsC; 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase (KDO 8-P phosphatase) [EC:3.1.3.45]	132			1.246	3.140
RKJ95623.1 (148)			38			2.624	3.355
RKJ95617.1 (487)			412			3.635	2.706
RKJ95605.1 (471)	K03771	surA; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SurA [EC:5.2.1.8]	271			2.005	2.024
RKJ95579.1 (539)	K00681	ggt; gamma-glutamyltranspeptidase / glutathione hydrolase [EC:2.3.2.2 3.4.19.13]	532				exclusiva Impranil
RKJ95544.1 (325)			285			1.017	2.845
RKJ95534.1 (177)	K03111	ssb; single-strand DNA-binding protein	108			2.331	3.023
RKJ95496.1 (459)	K01756	purB; adenylosuccinate lyase [EC:4.3.2.2]	398			1.552	2.324
RKJ95462.1 (345)	K02012	afuA; iron(III) transport system substrate-binding protein	233				exclusiva Impranil
RKJ95459.1 (376)	K03430	phnW; 2-aminoethylphosphonate-pyruvate transaminase [EC:2.6.1.37]	330			2.579	1.607
RKJ95456.1 (342)			129			2.290	3.433
RKJ95438.1 (129)			113				exclusiva Impranil
RKJ95437.1 (253)	K00059	fabG; 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]	185			3.128	4.421
RKJ95436.1 (232)	K11209	yghU; GSH-dependent disulfide-bond oxidoreductase [EC:1.8.4.-]	191			1.291	2.804
RKJ95397.1 (354)	K01624	FBA; fructose-bisphosphate aldolase, class II [EC:4.1.2.13]	319			1.921	3.398
RKJ95392.1 (255)	K01243	mtnN; adenosylhomocysteine nucleosidase [EC:3.2.2.9]	171			0.000	3.197
RKJ95385.1 (519)			165			5.322	2.301
RKJ95374.1 (139)	K03711	fur; Fur family transcriptional regulator, ferric uptake regulator	124			2.419	2.779
RKJ95228.1 (90)	K03530	hupB; DNA-binding protein HU-beta	76			0.872	2.449
RKJ95204.1 (258)	K01142	E3.1.11.2; exodeoxyribonuclease III [EC:3.1.11.2]	294			1.381	3.189
RKJ95189.1 (423)			194			6.395	4.310
RKJ95141.1 (302)	K06889	uncharacterized protein	163			0.000	3.014
RKJ95103.1 (490)			337	K00130	25		exclusiva Impranil
RKJ95094.1 (249)	K00059	fabG; 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]	142				exclusiva Impranil
RKJ95087.1 (388)	K00249	ACADM; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.7]	277				exclusiva Impranil
RKJ95085.1 (314)	K03522	fixB; electron transfer flavoprotein alpha subunit	332			2.165	2.994
RKJ95084.1 (282)	K09709	meh; 3-methylfumaryl-CoA hydratase [EC:4.2.1.153]	188			1.640	2.419
RKJ95082.1 (281)	K01644	citE; citrate lyase subunit beta / citryl-CoA lyase [EC:4.1.3.34]	122			0.000	2.042
RKJ95061.1 (254)	K01995	livG; branched-chain amino acid transport system ATP-binding protein	203				exclusiva Impranil

RKJ95060.1 (235)	K01996	livF; branched-chain amino acid transport system ATP-binding protein	177			exclusiva Impranil
RKJ95059.1 (388)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	244			exclusiva Impranil
RKJ95058.1 (566)	K00666	ACSF2; fatty-acyl-CoA synthase [EC:6.2.1.-]	546			exclusiva Impranil
RKJ95057.1 (408)	K00249	ACADM; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.7]	173			exclusiva Impranil
RKJ95056.1 (257)	K00046	idnO; gluconate 5-dehydrogenase [EC:1.1.1.69]	192			exclusiva Impranil
RKJ95052.1 (209)			114			4.651 14.203
RKJ95011.1 (114)			30			0.000 3.262
RKJ94965.1 (309)	K01749	hemC; hydroxymethylbilane synthase [EC:2.5.1.61]	283			1.969 2.787
RKJ94961.1 (158)	K03594	bfr; bacterioferritin [EC:1.16.3.1]	160			5.311 2.783
RKJ94950.1 (184)	K02356	efp; elongation factor P	174			1.897 2.497
RKJ94947.1 (406)	K07749	frc; formyl-CoA transferase [EC:2.8.3.16]	160			exclusiva Impranil
RKJ94946.1 (323)	K01640	E4.1.3.4; hydroxymethylglutaryl-CoA lyase [EC:4.1.3.4]	328			exclusiva Impranil
RKJ94944.1 (327)			235			2.691 7.781
RKJ94940.1 (321)	K02051	ABC.SN.S; NitT/TauT family transport system substrate-binding protein	243			8.686 0.000
RKJ94936.1 (528)	K01745	hutH; histidine ammonia-lyase [EC:4.3.1.3]	536			2.607 0.000
RKJ94925.1 (273)	K01458	hutG; N-formylglutamate deformylase [EC:3.5.1.68]	287			exclusiva Impranil
RKJ94916.1 (363)	K07246	ttuC; tartrate dehydrogenase/decarboxylase / D-malate dehydrogenase [EC:1.1.1.93 4.1.1.73 1.1.1.83]	445			1.486 2.029
RKJ94714.1 (400)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	327			1.389 2.097
RKJ94699.1 (612)	K00248	ACADS; butyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.1]	155			exclusiva Impranil
RKJ94693.1 (699)	K07516	fadN; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]	601			3.861 6.731
RKJ94694.1 (391)	K00626	E2.3.1.9; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	341			6.678 7.396
RKJ94695.1 (300)			167	K10005	24	1.748 2.267
RKJ94688.1 (411)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	334			9.180 9.882
RKJ94683.1 (92)	K05527	boIA; BoIA family transcriptional regulator, general stress-responsive regulator	67			0.944 2.561
RKJ94671.1 (287)	K06966	ppnN; pyrimidine/purine-5'-nucleotide nucleosidase [EC:3.2.2.10 3.2.2.-]	224			4.253 4.886
RKJ94672.1 (595)			337			exclusiva Impranil
RKJ94669.1 (532)	K09760	rnuC; DNA recombination protein RnuC	198			exclusiva Impranil
RKJ94666.1 (399)	K00763	pncB; nicotinate phosphoribosyltransferase [EC:6.3.4.21]	467			2.665 0.000

RKJ94659.1 (467)	K01885	EARS; glutamyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.17]	389			3.091	3.911
RKJ94658.1 (404)	K10764	metZ; O-succinylhomoserine sulfhydrylase [EC:2.5.1.-]	321			3.122	3.602
RKJ94649.1 (168)	K10856	acxC; acetone carboxylase, gamma subunit [EC:6.4.1.6]	148			exclusiva	Impranil
RKJ94648.1 (774)	K10854	acxB; acetone carboxylase, alpha subunit [EC:6.4.1.6]	760			exclusiva	Impranil
RKJ94647.1 (714)	K10855	acxA; acetone carboxylase, beta subunit [EC:6.4.1.6]	584			exclusiva	Impranil
RKJ94642.1 (161)	K09767	yajQ; cyclic-di-GMP-binding protein	138			0.967	2.085
RKJ94635.1 (353)			417			2.185	2.043
RKJ94632.1 (442)			254			6.337	7.048
RKJ94631.1 (310)			199			2.593	5.444
RKJ94627.1 (335)	K03841	FBP; fructose-1,6-bisphosphatase I [EC:3.1.3.11]	436			1.818	4.315
RKJ94617.1 (391)	K00099	dxr; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase [EC:1.1.1.267]	307			4.079	0.626
RKJ94614.1 (186)	K02838	frr; ribosome recycling factor	165			0.000	4.235
RKJ94592.1 (297)			106			exclusiva	Impranil
RKJ94568.1 (322)			232			0.657	2.236
RKJ94556.1 (650)	K00681	ggt; gamma-glutamyltranspeptidase / glutathione hydrolase [EC:2.3.2.2 3.4.19.13]	548			exclusiva	Impranil
RKJ94513.1 (314)			191	K00058	17	1.261	2.890
RKJ94507.1 (359)	K01738	cysK; cysteine synthase [EC:2.5.1.47]	285			0.787	2.248
RKJ94495.1 (275)	K05772	tupA; tungstate transport system substrate-binding protein	203			1.836	2.307
RKJ94480.1 (327)			163			exclusiva	Impranil
RKJ94479.1 (397)			412			0.000	2.523
RKJ94476.1 (101)			68			1.393	2.535
RKJ94474.1 (463)	K14441	rimO; ribosomal protein S12 methylthiotransferase [EC:2.8.4.4]	402			0.000	3.118
RKJ94469.1 (260)	K00019	E1.1.1.30; 3-hydroxybutyrate dehydrogenase [EC:1.1.1.30]	225			2.340	2.631
RKJ94457.1 (294)	K01061	E3.1.1.45; carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	210			2.573	3.587
RKJ94441.1 (325)	K00364	E1.7.1.7; GMP reductase [EC:1.7.1.7]	302			1.936	2.641
RKJ94260.1 (506)	K00074	paaH; 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.157]	392			4.218	4.463
RKJ94238.1 (622)	K15461	mnmC; tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridine biosynthesis bifunctional protein [EC:2.1.1.61 1.5.-.-]	307			exclusiva	Impranil
RKJ94235.1 (131)			69				
RKJ94233.1 (310)	K00957	cysD; sulfate adenylyltransferase subunit 2 [EC:2.7.7.4]	405			2.514	1.607
RKJ94230.1 (350)	K00384	trxB; thioredoxin reductase (NADPH) [EC:1.8.1.9]	196			0.000	2.979
RKJ94219.1 (363)			307			exclusiva	

						Impranil
RKJ94218.1 (413)	K00249	ACADM; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.7]	262			0.000 3.405
RKJ94217.1 (1331)	K13821	putA; RHH-type transcriptional regulator, proline utilization regulon repressor / proline dehydrogenase / delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [EC:1.5.5.2 1.2.1.88]	842			2.926 0.062
RKJ94215.1 (270)			214			0.858 3.460
RKJ94213.1 (555)	K01649	leuA; 2-isopropylmalate synthase [EC:2.3.3.13]	614			1.368 2.424
RKJ94211.1 (184)			160	K01759	19	exclusiva Impranil
RKJ94209.1 (337)	K16171	faaH; fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase [EC:3.7.1.2]	263			2.317 2.943
RKJ94196.1 (552)	K01950	E6.3.5.1; NAD+ synthase (glutamine-hydrolysing) [EC:6.3.5.1]	430			1.977 2.087
RKJ94191.1 (170)	K03408	cheW; purine-binding chemotaxis protein CheW	101			3.196 3.052
RKJ94181.1 (477)	K00128	ALDH; aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3]	550			2.131 2.956
RKJ94166.1 (440)	K03641	tolB; TolB protein	349			15.873 15.621
RKJ94165.1 (593)	K11085	msbA; ATP-binding cassette, subfamily B, bacterial MsbA [EC:3.6.3.-]	420			exclusiva Impranil
RKJ94151.1 (312)	K06980	ygfZ; tRNA-modifying protein YgfZ	272			2.002 0.964
RKJ94119.1 (220)			133	K09017	12	exclusiva Impranil
RKJ94118.1 (236)	K00573	E2.1.1.77; protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase [EC:2.1.1.77]	161			1.401 2.524
RKJ94020.1 (221)	K01673	cynT; carbonic anhydrase [EC:4.2.1.1]	237			1.775 2.247
RKJ94013.1 (233)			159			0.000 40.185
RKJ93999.1 (399)	K01999	livK; branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	149			3.978 2.370
RKJ93991.1 (673)	K01968	E6.4.1.4A; 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha subunit [EC:6.4.1.4]	520			2.286 1.936
RKJ93964.1 (705)	K07516	fadN; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]	529			4.747 8.730
RKJ94694.1 (391)	K00626	E2.3.1.9; acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]	341			8.349 13.336
RKJ93959.1 (408)			421			25.003 33.523
RKJ93960.1 (266)			187			5.143 8.474
RKJ93961.1 (376)			249			6.019 11.239
RKJ93962.1 (398)			328			7.501 10.021
RKJ93958.1 (331)			291			9.857 20.863
RKJ93957.1 (324)	K00459	ncd2; nitronate monooxygenase [EC:1.13.12.16]	284			7.123 10.569
RKJ93852.1 (426)	K00147	proA; glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.41]	372			2.258 3.936

Anexo V. Artículo de investigación generado durante los estudios de Doctorado

Biodegradation
<https://doi.org/10.1007/s10532-022-09989-8>

ORIGINAL PAPER



Concerted action of extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities during Impranil biodegradation by *Alicyclophilus denitrificans* BQ1

Jacqueline Fuentes-Jaime · Martín Vargas-Suárez ·
M. Javier Cruz-Gómez · Herminia Loza-Tavera

Received: 14 February 2022 / Accepted: 9 May 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract The concerted action of commercial esterases, proteases and amidases has been demonstrated to be relevant in polyurethane (PU) degradation by in vitro experiments. However, the spatial and temporal dynamics of these activities during PU biodegradation by PU-degrading bacteria have not been addressed. Here, we examined the capability of *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 to biodegrade the polyester (PS)-PU Impranil, analyzed the temporal and spatial coordination between the extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities, and their independent and combined effects on Impranil biodegradation. *A. denitrificans* BQ1 grew in Impranil, and its clearing was correlated with the cleavage of ester and urethane groups since early times, with decrements of some Impranil compounds and the appearance of biodegradation products. While extracellular esterase was active at early times with its maximum at 18 h, urethanase appeared at this time and increased up to the end of the analysis

(48 h), with the cytoplasmic activities behaving similarly but with lower levels than the extracellular ones. Both enzymatic activities exhibited distinct substrate specificity depending on their cellular localization and cultivation times, suggesting they cleave differentially located groups. As the urethane cleavage occurred since early times, when no urethane-cleaving activity was detected, different proteins should be acting at early and late times. In vitro experiments with independent or combined cellular protein fractions supported the previous deduction and confirmed the concerted action of extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities. A two-stage process for Impranil degradation by *A. denitrificans* BQ1 is proposed.

Keywords *Alicyclophilus* · Polyester-polyurethane · Biodegradation · Esterase · Urethane-cleaving activity · Concerted enzymatic activities

J. Fuentes-Jaime · M. Vargas-Suárez · H. Loza-Tavera (✉)
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, Ave.
Universidad 3000. Col. UNAM, 04510 Ciudad de México,
México
e-mail: hlozat@unam.mx

M. J. Cruz-Gómez
Departamento de Ingeniería Química, Facultad
de Química, Universidad Nacional Autónoma de
México, Ave. Universidad 3000. Col. UNAM,
04510 Ciudad de México, México

Introduction

Inadequate disposal of plastic wastes in landfills and marine ecosystems has generated severe environmental pollution (Ali et al. 2021; Ru et al. 2020; Singh et al. 2022). Polyurethane (PU) is a plastic polymer introduced to nature approximately 65 years ago. Because of its highly versatile chemical structure, no efficient technology for PU waste recycling has been developed. Searching for biodegradation strategies

for PU waste treatment, bacteria, fungi, and microbial communities capable of attacking PU have been identified (Faccia et al. 2021; Gaytán et al. 2020; Magnin et al. 2020; Ru et al. 2020). In polyester (PS)-PU structure, the ester ($R-C(=O)-O-R'$) is the most abundant and susceptible group to be cleaved, and different analytical techniques have demonstrated its attack by esterases or lipases (Reviewed in Howard 2011; Magnin et al. 2020; Ru et al. 2020). Esterases and lipases involved in PU degradation have been identified, including those containing the distinctive serine hydrolase motif $Gly-X^1-Ser-X^2-Gly$, as the esterase Puda from *Comamonas acidovorans* TB-35 (Nomura et al. 1998); the extracellular lipase Pula from *Pseudomonas fluorescens* (Vega et al. 1999); and the extracellular esterase PueA and extracellular esterase/lipase PueB from *Pseudomonas chlororaphis* (Howard et al. 2001; Stern and Howard, 2000). Besides, several polyester hydrolases from actinomycetes such as TfCut2, Tcur1278, and Tcur0390, and the LC-cutinase, identified from a leaf-branch compost metagenome, have also been reported to attack the ester moiety of Impranil and two other thermoplastic PUs (Schmidt et al. 2017; Sulaiman et al. 2012). PU also contains the characteristic and recalcitrant urethane or carbamate group ($R-NH-C(=O)-O-R'$) and, although several works have reported urethane-cleaving enzymes acting over carbamate and phenyl urea groups in pesticides (Jiang et al. 2021; Sun et al. 2019; Yun et al. 2017; Zhang et al. 2018, 2020), few proteins cleaving urethane groups in PU have been described. An inducible urethane hydrolase from *Rhodococcus equi* TB-60 (Akutsu-Shigeno et al. 2006) and a recombinant polyamidase from *Nocardia farcinica* fused to a polymer binding module of a polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Alcaligenes faecalis* (Gamerith et al. 2016) have been shown to cleave the urethane bond in PU substrates. A carboxyl ester hydrolase (CE_Ubrb) that modifies the PS-PU coating Impranil and cleaves the carbamate insecticide Fenobucarb (Ufarté et al. 2017), the commercial subtilisin acting on poly(amide-urethane) (Huang and Roby 1986), and papain acting on a segmented polyether urethane (Biomer®) (Phua et al. 1987) have also been reported to attack PU-carbamate groups.

The concerted action of esterases and urethane-cleaving enzymes in PU degradation has been analyzed in vitro using commercial esterases and

proteases/amidases. The hydrolytic activities of several enzymes were tested on two PU types, finding that a binary mixture containing porcine liver esterase (Sigma Aldrich) and DSM (Cognis) or pellicit FS (Cognis) proteases showed better degradation than the esterase alone (Ozsagiroglu et al. 2012). Besides, from a collection of 50 hydrolases (Protéus, France), a screening based on Impranil®DLN-SD clearing and hydrolysis of butyl N-(4-toluenesulfonyl) carbamate, selected the most active enzymes, the esterase E3576, and the amidase E4143. The synergistic effect of these two enzymes on polycaprolactone polyol-based thermoplastic PU degradation was reported (Magnin et al. 2019). These results indicate that the cooperative activities of esterases and proteases/amidases are fundamental for improving the PU biodegradation process.

On the contrary, little is known about the collaboration and spatial and temporal dynamics of esterase and urethane-cleaving activities during PU biodegradation by PU-degrading bacteria, which have evolved to use PU as the sole carbon source. During bacterial PU biodegradation in vivo, the concerted action of esterase and urethane-cleaving activities should be essential for a successful process. In this work, we addressed this subject by studying *Alicyclophilus denitrificans* BQ1, a betaproteobacteria capable of growing in the commercial PS-PU coating Hydroform®, as the only carbon source (Oceguera-Cervantes et al. 2007). Here, we analyze the degradative activity of *A. denitrificans* BQ1 over Impranil, and the esterase and urethane-cleaving activities in extracellular and cytoplasmic protein fractions during BQ1 growth, finding that these enzymatic activities are displayed in a time- and space-specific manner and exhibit distinct substrate specificity, suggesting functional groups' cleavage at different chemical structural compositions. Interestingly, as the urethane cleavage occurred early, when no urethane-cleaving activity was detected, different urethane-cleaving proteins should act at early and late cultivation times. Furthermore, the early urethane-cleaving activity and the concerted action of esterase and urethanase activities were also detected by in vitro Impranil biodegradation experiments with independent or combined protein fractions confirming the initial observations. Based on these results, we propose a temporal/spatial model for Impranil biodegradation, showing the

enzymatic dynamics that bacteria display during PU biodegradation and setting the biochemical bases for improving the approaches to develop new biotechnological strategies aimed at the biodegradation of PU waste.

Materials and methods

Bacterial strain, Impranil culture medium, and growth quantification

Alicyclophilus denitrificans BQ1, selected by its ability to grow in a PS-PU coating (Hydroform®) as the only carbon source (Oceguera-Cervantes et al. 2007), was studied in this work. The culture medium was a mineral salt medium (MM) (in mmol l⁻¹: KH₂PO₄, 14.7; K₂HPO₄, 40.2; NH₄NO₃, 12.5; MgSO₄·7H₂O, 0.4; ZnSO₄·7H₂O, 0.0035; CuSO₄·7H₂O, 0.0004; FeSO₄·7H₂O, 0.036; MnSO₄·6H₂O, 0.0077; pH 7) (Nakajima-Kambe et al. 1995) with Impranil@DLN W 50 (MM-Impranil) as the only carbon source. All chemical reagents used for the culture medium were ACS grade, from J.T. Baker® Chemical Co. Impranil is a commercial coating formulated as a colloidal water-based PU dispersion, made from polyhexane/neopentyl adipate polyester and hexamethylene diisocyanate (HMDI) (Howard et al. 2012). The preinoculum was set as previously described by Oceguera-Cervantes et al. (2007) with the following modification: LB broth grown cells were collected, washed twice (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7), and used to inoculate MM-Impranil to reach 0.02 OD_{600nm}. Cultures were incubated at 37 °C and 200 rpm, and non-inoculated MM-Impranil flasks, incubated at the same conditions, were set as abiotic controls. Because of flocculi formation during cultivation, bacterial growth was quantified by measuring total protein. For that, cells were harvested by centrifugation at 6741 × g (rotor SS-34, Sorvall RC5C PLUS), 4 °C for 20 min, washed twice with, resuspended in 1 ml of phosphate buffer, and lysed on ice with a sonicator (Vibra Cell VCX 750, Sonics & Materials Inc.) (six cycles, 15 s pulse/15 s pause, 21% amplitude). The Bradford method (Bradford, 1976) used bovine serum albumin as a standard for protein quantification. At least three biological replicates were measured for each experiment.

Scanning electron microscopy (SEM)

After 12 h fixation in 0.1 M phosphate buffer with 3% glutaraldehyde, samples from BQ1 cultures from 6 and 24 h, as well as from non-inoculated MM-Impranil, were washed three times with 0.1 M phosphate buffer, followed by rinses with distilled water, then dehydrated in 30%, 50%, 70%, 90%, and 100% ethanol solutions, for 10 min each. Subsequently, they were dried at room temperature. The specimens were covered with gold and examined with a Jeol JSM-5900-LV SEM.

Impranil clearing quantification

Cumulative Impranil clearing was quantified over a 48 h time-course analysis from non-inoculated and inoculated with *A. denitrificans* BQ1 MM-Impranil cultures. For that, OD_{600nm} was recorded in a UV-VIS Ultrospec 2000 spectrophotometer (Pharmacia-Biotech), and the concentration of Impranil was calculated based on a standard curve set with different Impranil concentrations. Impranil clearing specific activity of the culture (degraded Impranil) was calculated based on protein concentration measured in the extracellular fraction in time-course analyses. Impranil clearing specific activities were also measured in extracellular protein (ECP) and cytoplasmic protein (CP) fractions, prepared as described below. Samples taken at different cultivation times were quantified at OD_{600nm} and 37 °C in an Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc.). Impranil (1.25 mg ml⁻¹) was used as the substrate in 200 µL reaction mixtures containing 10 g protein, 50 mM phosphate buffer, pH 7. Absorbance was recorded every 10 min for 60 min; only the data in linearity were used to calculate enzymatic activity. In negative controls, the proteins were replaced with buffer. The amount of Impranil degraded was quantified based on a standard curve as indicated above.

Analysis of Impranil biodegradation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Samples taken every 6 h during 48 h were analyzed by FTIR to examine the BQ1 activity on Impranil chemical groups. In order to observe the 3324 cm⁻¹ signal corresponding to the amine, N-H stretch, the

analyses were performed in dried samples. For that, 2 ml of supernatant were collected in Eppendorf tubes and centrifuged for 1 min at $4200\times g$; then, the supernatant was recovered and allowed to evaporate to dryness at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. FTIR spectra were acquired with a 400 Perkin Elmer spectrometer (Waltham, USA) in attenuated total reflection mode from 4000 to 400 cm^{-1} . According to McCarthy et al. (1997) and Pergal et al. (2013), functional groups in the spectra were assigned. For comparison, abiotic controls were similarly analyzed. Four biological replicates were analyzed for each experimental condition. For the GC–MS analysis, 50 ml cultures of BQ1 growing in MM-Impranil, incubated for 6, 12, 18, and 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 200 rpm, were centrifuged at $8631\times g$ (rotor JA-14, Avanti JXN-26, Beckman Coulter) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. Non-inoculated MM-Impranil (time 0) was similarly treated and considered the abiotic control. Supernatants were filtered through $0.45\text{ }\mu\text{m}$ pore size Millipore membranes, and the filtrates were extracted in LC-18 cartridges (Supelco) at a flow rate of 2 ml min^{-1} , eluted with 2 ml methanol-chloroform (1:1, v/v), and concentrated to 0.5 ml. Samples were injected in an Agilent gas chromatograph system (7890B, Santa Clara, CA, United States) using two 5% phenyl-methylpolysiloxane columns ($15\text{ m}\times 250\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$). The oven program initial temperature was $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (held for 3 min), with increases of $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per min up to $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (held for 15 min). Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1 ml min^{-1} . An Agilent Quadrupole Mass Analyzer (5977A MSD, Santa Clara, CA, United States) with 1459 EMV, electronic ionization energy, and 30–550 amu mass range scan was used. The scan rate was 20 spec/s. Data acquisition was performed with the Enhanced MassHunter software system. Mass spectra were compared to the National Institute of Standards and Technology (NIST) database (2002 Library). Compounds with mass spectral similarity values close to 700 or higher were considered the same compound as the library hit.

Preparation of extracellular and cytoplasmic protein fractions

Extracellular (ECP) and cytoplasmic (CP) proteins obtained from MM-Impranil cultures at different times were analyzed. ECP from cell-free supernatants were obtained from 100 ml cultures centrifuged

at $8631\times g$ (rotor JA-14, Avanti JXN-26, Beckman Coulter) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min to eliminate Impranil debris. Protein concentration was conducted in a stirred ultrafiltration cell 8400 (Amicon) device, and the concentrated proteins were washed with phosphate buffer, pH 7. CP were obtained from the supernatants of sonicated bacterial cells centrifuged at $20,800\times g$ (Eppendorf centrifuge 5417C) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 25 min and quantified.

Enzymatic assays and substrate specificity of esterase and urethanase activities

Enzymatic assays for esterase and urethanase activities were measured spectrophotometrically at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ECP and CP fractions. Esterase activity was quantified at $\text{OD}_{405\text{nm}}$ in an Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc.), using *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA) as substrate, based on Deshpande et al. (1984) with slight modifications: the 200 μl reaction mixture contained 10 μg protein, 5 mM *p*-NPA in acetonitrile, and 50 mM phosphate buffer, pH 7. The amount of *p*-nitrophenol (*p*-NP) was determined every 30 s for 3 min based on a standard curve generated with different concentrations of *p*-NP. Negative controls were set using the same mixture reaction except that protein was replaced with phosphate buffer. One esterase unit (U) corresponds to one μmol of *p*-NP min^{-1} . Urethanase activity was assayed at $\text{OD}_{636\text{nm}}$ in an Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc.) by quantifying ammonium ions produced by substrate hydrolysis as described for urease activity (Witte and Medina-Escobar 2001) but using ethyl carbamate (urethane) as substrate. Reaction mixtures of 40 μl contained 10 μg protein, 50 mM urethane, 50 mM phosphate buffer pH 7 were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were taken every 60 s for 4 min. Subsequently, 100 μl of deionized water, 20 μl of phenol nitroprusside reagent (0.7 M phenol, 1 mM sodium pentacyanonitrosylferrate), and 40 μl of hypochloride reagent (NaOH 370 mM, NaOCl 13 mM, pH 12) were added and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min until color development. Ammonium produced was calculated based on a standard curve generated similarly using different ammonium chloride concentrations. Controls for spontaneous substrate hydrolysis were set in assays with no proteins. Negative controls were set in assays with no substrate, and measurements were performed in at least three

biological replicates for each experiment. One urethase unit corresponds to one μmol of NH_4 min^{-1} .

ECP and CP obtained from 12 and 36 h BQ1 cultures in MM-Impranil were used for substrate specificity analysis. Enzymatic activities quantification assays were performed in a 200 μl total volume with 50 mM phosphate buffer pH 7 in a 96-well plate. Esterase activity was quantified as described above using the following substrates (2 mM each): *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA), *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB), and *p*-nitrophenyl caprylate (*p*-NPC). Lipase activity was performed as reported by Oguntimein et al. (1992) using 6 mM of *p*-nitrophenyl laurate (*p*-NPL) or *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) dissolved in isopropanol and emulsified by sonication. *Aspergillus oryzae* lipase (0.1 U) (Sigma Aldrich, Cat. Num. 62,285) was used as a positive control for esterase and lipase activities. One unit of lipase activity was defined as the activity that releases one μmol of *p*-NP min^{-1} . Urease and urethase activities were quantified by ammonia released, as mentioned above, using 50 mM of urea, ethyl carbamate, and butyl carbamate, dissolved in deionized water, and phenyl carbamate dissolved in isopropanol. As a positive control, 0.25 U of *Canavalia ensiformis* urease (Sigma Aldrich, Cat. Num. U-1500) was used.

Impranil biodegradation in vitro by independent and combined extracellular and cytoplasmic protein fractions

ECP and CP fractions from BQ1 grown in MM-Impranil at 12, 18, and 36 h were used in vitro, alone or in combination, to analyze Impranil polymer cleaving by FTIR spectroscopy. Impranil clearing, esterase, and urethase activities were measured before the assays to confirm that proteins were active. Two types of experiments were set. In the first set of experiments, the independent effects of ECP and CP from 12 or 36 h were analyzed by adding 60 μg of protein to Eppendorf tubes containing 1.25 mg ml^{-1} Impranil, in 50 mM phosphate buffer pH 7, in 200 μl final volume, and incubated for 6 h at 37 °C. The second set of experiments analyzed the sequential effects of protein fractions on Impranil degradation. For that, 100 μg of 12 h ECP were added to each of two Eppendorf tubes containing Impranil in the assay medium and were incubated for 12 h at 37 °C. After that, 100 μg of 18 h ECP were added to one tube.

Simultaneously, 100 μg of 12 h CP were added to each of two Eppendorf tubes containing Impranil and incubated for 12 h at 37 °C; then, CP from 18 h cultivation time were added to only one of the tubes. The four tubes were incubated for another 12 h at 37 °C. After the incubation time, all the reactions were evaporated up to dryness at 37 °C. As controls, similar assays were carried out with proteins denatured at 95 °C for 25 min, in which Impranil clearing, esterase, and urethase activities were inactivated. Additional controls were set in assays with no proteins. All samples were analyzed as described to obtain FTIR spectra. Four biological replicates were performed for each experiment.

Strain availability

Alicyclophilus denitrificans BQ1 was deposited in the Culture Collection at Cepario Facultad de Química, UNAM, World Data Centre for Microorganisms CFQ100, under the accession number: CFQ-B-290.

Results

Growth and degradative activity of *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 on Impranil

To define the best cell growth condition, *A. denitrificans* BQ1 was cultured at three different Impranil concentrations (1.25, 2.5, and 5 mg ml^{-1}) in time-course experiments for 48 h. In all the cultivation times, pH was around 7.0 with minimal fluctuations. At 1.25 mg ml^{-1} and 2.5 mg ml^{-1} , the exponential phase was observed up to 18 h and the stationary phase from 24 to 48 h; at 5 mg ml^{-1} , little growth was observed; thus, no phases were identified. At the end of the study, 1.25 mg ml^{-1} Impranil produced the highest growth (29 $\mu\text{g protein ml}^{-1}$), while 2.5 and 5 mg ml^{-1} Impranil produced 14 and 3 $\mu\text{g protein ml}^{-1}$, respectively (Fig. 1a). Growth rates were 0.136 h^{-1} , 0.110 h^{-1} , and 0.025 h^{-1} in 1.25, 2.5 and 5 mg ml^{-1} Impranil, respectively. Based on these results, all the following analyses were performed in MM-Impranil at 1.25 mg ml^{-1} . Impranil clearing in the culture medium increased from 33 to 67% from 12 to 18 h, attained 80% at 24 h, and reached 85% at the end of the stationary phase (48 h) (Fig. 1b). The highest Impranil clearing specific activity (12.34 mg

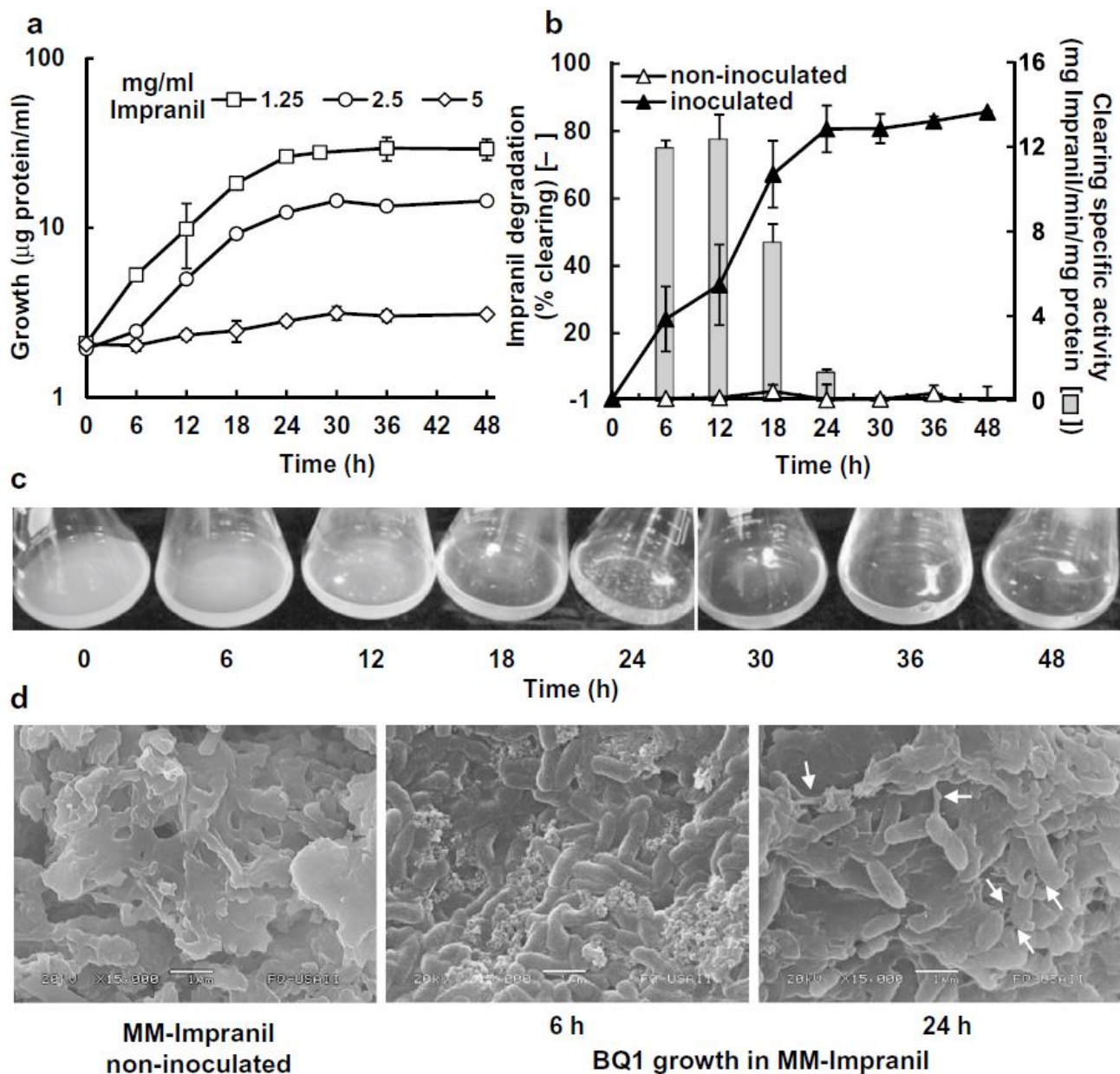


Fig. 1 Growth of *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 in MM-Impranil and Impranil clearing. **a** *A. denitrificans* BQ1 growth at different Impranil concentrations. **b** Impranil clearing in BQ1 inoculated and non-inoculated MM-Impranil and clearing specific activity measured in BQ1 cultures at different incubation times. The data are means from three biological repli-

mates. Bars represent standard deviation. **c** Appearance of MM-Impranil clearing and flocculi formation during the cultivation time. **d** Scanning electron microscopy images from BQ1 growing in MM-Impranil at lag (6 h) and stationary (24 h) phases. Arrows point at fibers emerging from bacterial cells

Impranil $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) was reached at 12 h; it strongly decreased at 24 h (1.325 mg Impranil $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) and became very low (below 0.33 mg Impranil $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$). Impranil clearing was not observed in non-inoculated cultures incubated at the same conditions (Fig. 1b). BQ1

growth at 6 h was planktonic, whereas, at 12 h, cells grew as small aggregates that became larger floccules at subsequent cultivation times (Fig. 1c). SEM analysis in a non-inoculated medium showed large polymer pieces with rough surfaces. At 6 h culture, BQ1 rod-shaped cells, 1.0–2.0 μm in length, interacted

with smaller, although still rough, polymer particles. At 24 h, the rod-shaped cells were in close interaction and immersed in a mixture of biofilm and smooth masses of polymer, with protruding fibers connecting them (Fig. 1d). Polysaccharides were detected in the supernatant (data not shown), but their nature was not examined.

To demonstrate that Impranil clearing resulted from polymer biodegradation, we analyzed the structural modifications that *A. denitrificans* BQ1 generated to the polymer. The Impranil PS-PU chemical structure is unknown. Howard et al. (2012) reported a general Impranil composition (Fig. 2a), and a potential chemical structure was suggested by Biffinger et al. (2015). However, based on a typical PS-PU step-growth polymerization reaction (Wang et al. 2019), a random process occurring in sequential reactions, we reasoned that during the first step, neopentyl, 1,6-hexanediol, and adipic acid would be combined to produce different diol types. Subsequently, when the diols reacted with HMDI, urethane groups flanked by different aliphatic chains would be formed, generating diverse chemical structural compositions around the urethane groups (Fig. 2b). Considering the proposed variations in the polymer chemical structure will be essential to explain the observed results discussed later. To detect BQ1 activity on Impranil we analyzed the dried medium supernatants from time-course experiments by FTIR spectroscopy (Fig. 2c). FTIR spectra from abiotic controls incubated at 0 or 48 h did not show significant changes (data not shown); thus, experimental FTIR spectra were compared to 0 h treatment. The intense N–H stretch (3324 cm^{-1}) signal decreased at 6 and 12 h, increased at 18 and 24 h, and decreased again after 30 h. A remarkable decrease of the C=O stretching vibrations (1730 cm^{-1}) from the ester/urethane groups was observed since the 6 h of culture. The urea/urethane N–H bending plus C–N stretch signal (1560 cm^{-1}) slightly decreased at 18 h, but the C–N stretching (1260 cm^{-1}) and the urethane C–O–C stretch (1047 cm^{-1}) decreased since the 6 h of culture with changes at different cultivation times. Decreases in aliphatic CH_2 signals (1400 and 1460 cm^{-1}) revealed the consumption of aliphatic chains by BQ1 since 6 h of growth.

The time course GC–MS analyses produced chromatograms where changes in the signals' intensity were observed at the different studied times (Fig. 3a). In

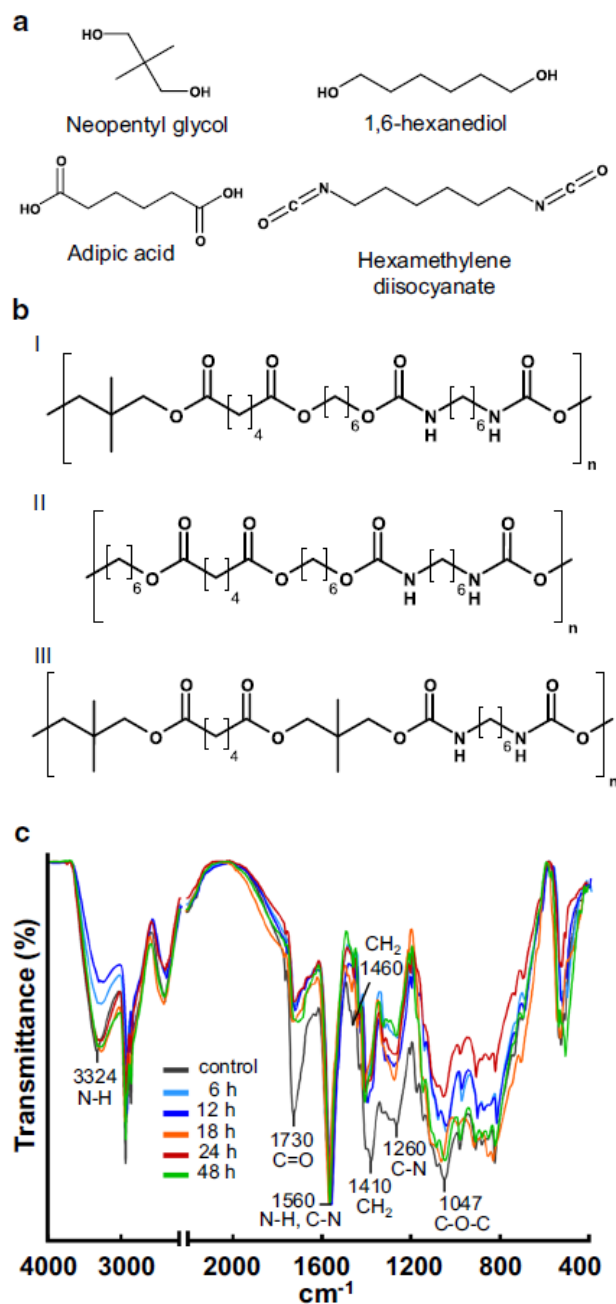


Fig. 2 Idealized chemical structures for PS-PU polymer Impranil and FTIR spectroscopy of Impranil biodegradation by *A. denitrificans* BQ1. **a** Starting materials for Impranil PS-PU polymer based on the composition reported by Howard et al. (2012) and some of the compounds identified by GC–MS in this work. **b** PU step-growth polymerization produces different combinations of diols. These diols will react with hexamethylene diisocyanate generating different structural polymer units (I, II, and III) that would combine, forming the whole polymer. Thus, different chemical structural compositions will be flanking the isocyanate group. **c** FTIR spectra of MM-Impranil supernatants collected from non-inoculated (control) and inoculated with *A. denitrificans* BQ1 cultures incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 200 rpm for different cultivation times. The representative spectra of four biological replicates are shown

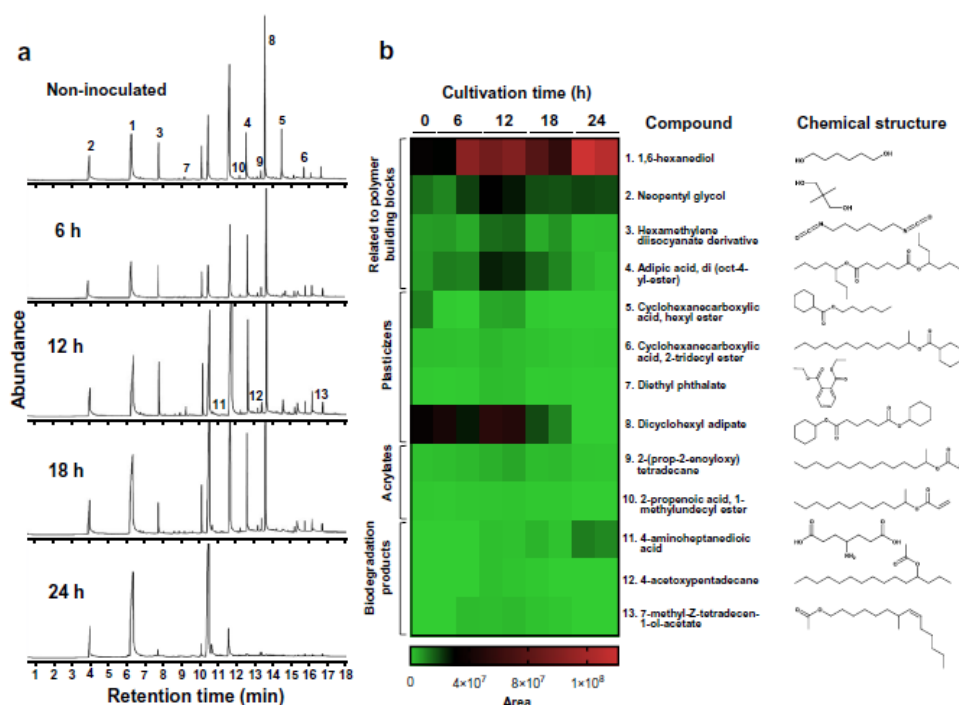


Fig. 3 Time course GC–MS analyses of Impranil degradation by *A. denitrificans* BQ1. Cell-free supernatants were extracted with methanol:chloroform from non-inoculated (time 0) (abiotic control) and inoculated cultures incubated at 37 °C and 200 rpm at different cultivation times. **a** Representative chromatograms from the different analyzed times. Numbers in the

chromatograms' signals correspond to numbers in the heatmap compound. **b** Heatmap depicting the area of the signals corresponding to the different identified compounds and their formulas at the indicated times. Compounds were identified by comparison to the NIST Mass Spectrometry Data Center (2002 library). Two replicates were analyzed at each time

them, several compounds associated with the Impranil polymer precursors (Fig. 2a) (Howard et al. 2012) were identified; 1,6-hexanediol (1) (numbers in parenthesis correspond to numbers in the chromatograms signals in Fig. 3a and the compounds in Fig. 3b), and neopentyl glycol (2) increased after 24 h of *A. denitrificans* BQ1 growth, while HMDI derivative (3), and an adipic acid-related compound (4), decreased (Fig. 3b). Several compounds, structurally related to plasticizers (Godwin 2017; Wypych 2004), such as cyclohexanecarboxylic acid hexyl ester (5), cyclohexanecarboxylic acid 2-tridecyl ester (6), diethyl phthalate (7), and dicyclohexyl adipate (8), and others used in plastics manufacture (Mosley, 2017), such as 2-(prop-2-enoyloxy)tetradecane (9) and 2-propenoic acid, 1-methylundecyl ester (10) were identified in the non-inoculated MM-Impranil control and diminished at 24 h of *A. denitrificans* BQ1 growth (Fig. 3b). Three biodegradation products, 4-aminoheptanedioic acid (11), a dicarboxylic acid that can result from urethane cleavage, and 4-acetoxypentadecane (12), and 7-methyl-Z-tetradecen-1-ol-acetate (13) that seem derived from plasticizers appeared between 6 and

12 h of culture. The three of them increased throughout the cultivation time, and at 24 h, compound 11 continued increasing, but compounds 12 and 13 disappeared (Fig. 3b). Notably, the appearance compound 11 evidenced *A. denitrificans* BQ1 enzymatic activity on the urethane group. At least six other signals were not identified, although most of the ones observed in the control diminished or disappeared at 24 h of cultivation (Fig. 3a). Compounds 1 to 4 and others similar to 5, 6, and 8 had been previously reported in MM-Impranil (Álvarez-Barragán et al. 2016).

Impranil clearing and esterase and urethane-cleaving activities in extracellular and cytoplasmic protein fractions

Impranil clearing activity of ECP and CP fractions was analyzed in vitro. Extracellular clearing specific activity reached its maximum at 12 h (0.26 mg Impranil min⁻¹ mg protein⁻¹), decreased at 18 h to less than half (0.10 mg Impranil min⁻¹ mg protein⁻¹), and remained low up to

the end of the analysis (around $0.05 \text{ mg Impranil min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$). CP showed a similar behavior as ECP, but its maximal clearing activity was at 12 h ($0.06 \text{ mg Impranil min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$), and after that time, it decreased and remained around $0.03 \text{ mg Impranil min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ up to the end of the analysis. Although both protein fractions cleared Impranil, ECP at its highest level (12 h) showed more than four times more extensive specific clearing activity than CP (Fig. 4a). Nevertheless, even though the ECP Impranil clearing activity at 12 h was the largest in this experiment, it was 47-times lower than the specific activity directly quantified in the supernatants of the *A. denitrificans* BQ1 inoculated cultures at the same cultivation time ($12.34 \text{ mg Impranil min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) (Fig. 1b).

Because the changes in Impranil clearing produced by the action of the BQ1 cells revealed the cleavage of ester and urethane groups (Fig. 2c), esterase and urethane-cleaving activities were analyzed in the ECP and CP fractions in time-course experiments. In most of the analyzed times, esterase specific activity was higher in the extracellular than in the cytoplasmic fraction (Fig. 4b). In the ECP fraction, esterase activity reached its maximum at 18 h ($1.42 \text{ } \mu\text{moles } p\text{-NP min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$), decreased 80% at 24 h ($0.28 \text{ } \mu\text{moles } p\text{-NP min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$), and exhibited fluctuations around this value up to the end of the analysis. On the other hand, cytoplasmic esterase showed its highest activity at 12 h ($0.97 \text{ } \mu\text{moles } p\text{-NP min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) and decreased 60% ($0.36 \text{ } \mu\text{moles } p\text{-NP min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) at 18 h, fluctuating around this value up to the end of the analysis (Fig. 4b). Surprisingly, urethane-cleaving activity, measured in the assays with ethyl carbamate as substrate, was not detected at 6 or 12 h of cultivation in any fraction. However, it was detected at 18 h and was almost two times higher in ECP ($0.13 \text{ } \mu\text{moles ammonium min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) than in CP. It increased up to the end of the analysis reaching its highest activity at 48 h in ECP ($0.31 \text{ } \mu\text{moles ammonium min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) and 36 h in CP ($0.21 \text{ } \mu\text{moles ammonium min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) (Fig. 4c).

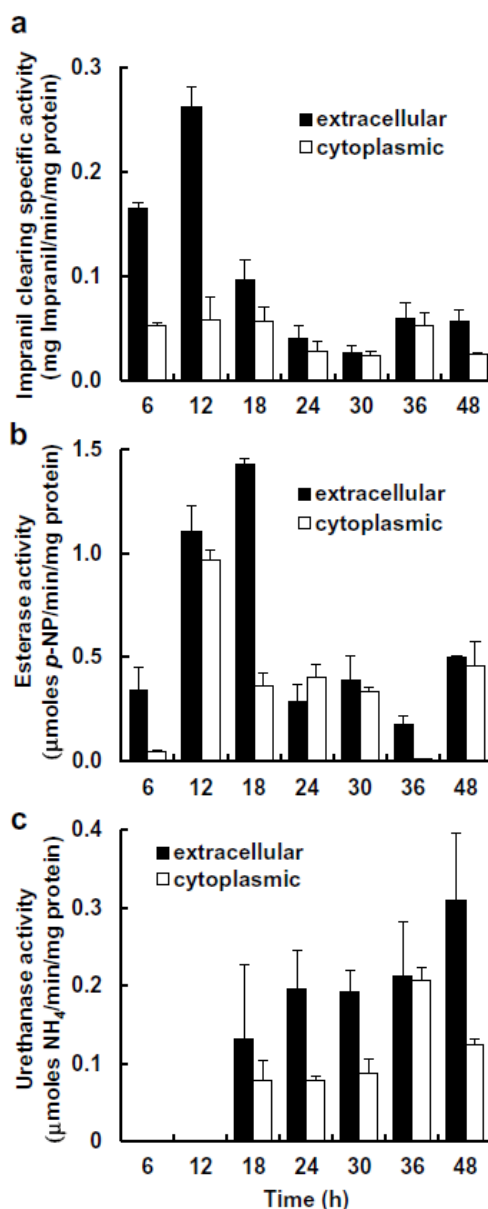


Fig. 4 In vitro Impranil clearing and esterase and urethanasase activities of extracellular and cytoplasmic protein fractions from *A. denitrificans* BQ1 cultured in MM-Impranil (1.25 mg ml^{-1}). Extracellular and cytoplasmic proteins were obtained at the indicated times. Reactions were assayed with $10 \text{ } \mu\text{g}$ protein. **a** Clearing was measured in in vitro reactions using 1.25 mg ml^{-1} Impranil at 600 nm . **b** Esterase activity was assayed with $5 \text{ mM } p\text{-NPA}$ as substrate and measured at 405 nm . **c** Urethanasase activity was determined with 50 mM urethane as substrate and measured at 636 nm . Bars represent standard deviation from three biological replicates

Substrate specificity of extracellular and cytoplasmic esterases and urethane-cleaving activity

Esterase and urethane-cleaving enzyme substrate specificities from 12 and 36 h ECP and CP fractions were analyzed (Table 1). Both fractions from 12 h and ECP fraction from 36 h hydrolyzed *p*-NPA and *p*-NPB, but 36 h CP fraction only hydrolyzed *p*-NPB. All the fractions showed higher activities for *p*-NPB than for *p*-NPA. No hydrolytic activity over *p*-NPC, *p*-NPL, or *p*-NPP, *i.e.*, no lipase activity, was displayed by any fraction. Urethane-cleaving activity was not detected in any protein fraction from 12 h cultures, confirming previous results (Fig. 4c). However, both 36 h ECP and CP fractions showed the same urethanase activity on ethyl carbamate (0.21 $\mu\text{moles ammonium min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), and only the CP fraction was active on butyl carbamate (0.09 $\mu\text{moles ammonium min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$). No protein fraction could hydrolyze urea or phenyl carbamate (Table 1).

Independent and combined effects of extracellular and cytoplasmic proteins on Impranil biodegradation

To dissect the effects that esterase and urethane-cleaving activities of the ECP and CP fractions cause on Impranil, *in vitro* experiments were performed and analyzed by FTIR spectroscopy. For that, two sets of

experiments were designed. In the first set, designed for analyzing the individual enzymatic effects that ECP or CP have on the PU polymer, Impranil was exposed to 12 h or 36 h protein fractions (60 $\mu\text{g protein}$) for 6 h. Controls with denatured or no proteins showed similar results, with no significant changes in the FTIR signals (data not shown). Both ECP and CP 12 h fractions showed high esterase and no urethanase activities; meanwhile, both fractions of 36 h showed low esterase and high urethanase activities (Fig. 4). FTIR analysis showed that 12 h ECP induced considerable decrements in the ester/urethane C=O signal (1730 cm^{-1}) and the urethane C–N stretching (1260 cm^{-1}) and a considerable increment in the N–H stretch (3324 cm^{-1}), whereas the 12 h CP only produced a slight decrease in the C=O signal (Fig. 5a). The 36 h fractions produced slightly different effects than the 12 h fractions. Decrements at the ester/urethane C=O (1730 cm^{-1}) and the urethane C–N stretching (1260 cm^{-1}) in the 36 h ECP were minor than the ones observed in the 12 h ECP; both 36 h fractions generated increments at the N–H stretch (3324 cm^{-1}) while at 12 h they were generated only by the ECP fraction; also, the CP fraction produced a reduction in the C–O–C (1047 cm^{-1}) signal (Fig. 5b). These results show the different effects the extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities display on the PU structure and confirm

Table 1 Substrate specificity of esterases and urethanases from *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 grown in MM-Impranil

Tested substrates for	12 h Culture U/mg protein (10^{-3})		36 h Culture U/mg protein (10^{-3})		^a Controls U/mg protein (10^{-3})
	Extracellular	Cytoplasmic	Extracellular	Cytoplasmic	
<i>Esterase</i>					
<i>p</i> -NPA	27 \pm 6	14 \pm 2	17 \pm 5	^b ND	3417 \pm 52
<i>p</i> -NPB	47 \pm 9	22 \pm 9	38 \pm 3	26 \pm 7	4699 \pm 60
<i>p</i> -NPC	ND	ND	ND	ND	7735 \pm 269
<i>p</i> -NPL	ND	ND	ND	ND	3100 \pm 232
<i>p</i> -NPP	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Urethanase</i>					
Urea	ND	ND	ND	ND	33,775 \pm 815
Ethyl carbamate	ND	ND	213 \pm 69	206 \pm 16	81 \pm 23
Butyl carbamate	ND	ND	ND	89 \pm 11	ND
Phenyl carbamate	ND	ND	ND	ND	ND

^aControl for esterase activity: *Aspergillus oryzae* lipase (0.1 U); control for urease activity: *Canavalia ensiformis* urease (0.25 U)

^bND not detected. MM-Impranil: Mineral medium with 1.25 mg ml^{-1} Impranil. Data are means of three biological replicates

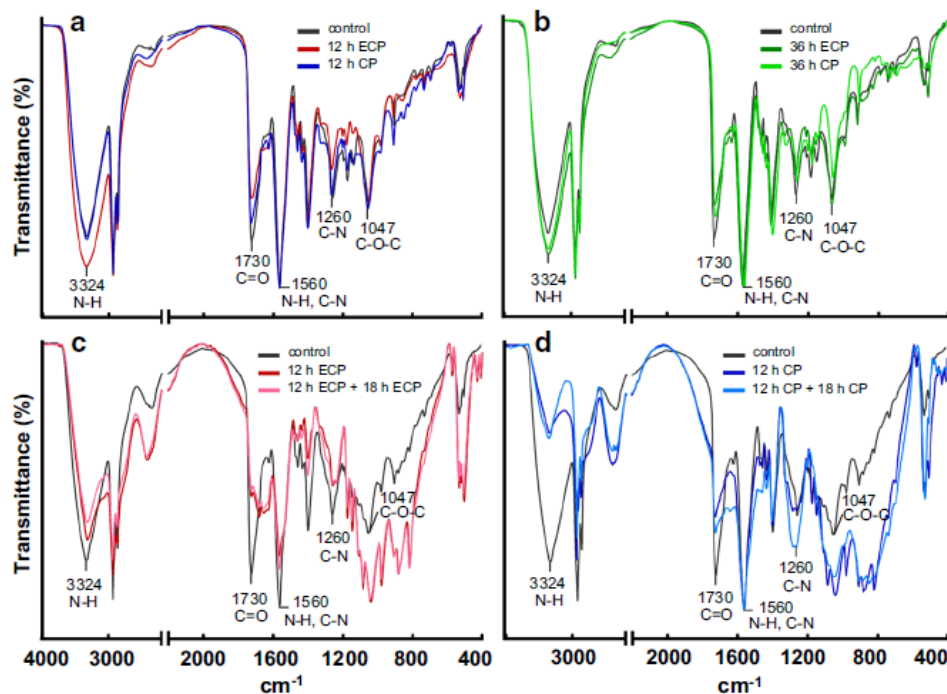


Fig. 5 FTIR spectroscopy analyses of Impranil biodegradation in vitro by extracellular (ECP) and cytoplasmic (CP) proteins of *A. denitrificans* BQ1. Proteins from BQ1 cultures growing in MM-Impranil (1.25 mg mL^{-1}) at 12, 18, and 36 h were collected and concentrated. Impranil (1.25 mg mL^{-1}) resuspended in phosphate buffer pH 7 was used in all the FTIR assays. In the first set of experiments, each analysis was carried out by adding $60 \mu\text{g}$ of protein and incubating for 6 h at 37°C ; **a** 12 h extracellular proteins (ECP) and 12 h cytoplasmic proteins

(CP); **b** 36 h ECP and 36 h CP. In the second set of experiments, $100 \mu\text{g}$ of protein was added to each in vitro assay and incubated for 12 h at 37°C , and after that, if applicable, the second protein fraction was added; **c** 12 h ECP and 12 h ECP plus 18 h ECP; **d** 12 h CP and 12 h CP plus 18 h CP. Controls were set with heat-denatured proteins at the same conditions of each experimental set. Representative spectra from four biological replicates are shown

that at 12 h, there is an extracellular enzymatic activity that cleaves the urethane bond to produce amines, even though no urethanase activity was detected in the in vitro enzymatic assays.

In the second set of experiments, we examined the effects of the esterase activity followed by urethane-cleaving activity over Impranil. In each experiment, Impranil was exposed to the ECP or CP 12 h fractions that displayed high esterase activity, followed by the 18 h fractions that exhibited high urethanase activity. Experiments were set with $100 \mu\text{g}$ 12 h ECP or CP proteins incubated for 24 h; and in parallel, the same proteins were incubated for 12 h and correspondingly added with $100 \mu\text{g}$ 18 h ECP or CP and incubated for 12 more hours for a total of 24 h incubation. The incubation with 12 h ECP for 24 h caused a substantial reduction and widening of the C=O signal (1730 cm^{-1}), decreases at the urethane C–N stretching (1260 cm^{-1}), N–H stretch (3324 cm^{-1}), urea/urethane

NH bending plus C–N stretch (1560 cm^{-1}) signal, an effect that had not been observed in previous experiments, and decreased the 1410 y 1460 cm^{-1} signals for CH_2 . Also, a high increase in the C–O–C signal (1047 cm^{-1}) was observed (Fig. 5c). The polymer's larger affection may be because of the more significant amount of protein and longer times used for the experiment. These results also confirmed that at 12 h, the ECP showed an intense urethane-cleaving activity even though no urethanase activity was detected in the in vitro enzymatic assays. The addition of the 18 h ECP, followed by a further 12 h incubation, did not produce any extra effect (Fig. 5c), suggesting an inhibitory effect over the urethane cleaving activity of the ECP fraction. On the other hand, the incubation of Impranil with the 12 h CP fraction produced a sharp decrement in the C=O (1730 cm^{-1}) signal, a high increment in the urethane C–O–C (1047 cm^{-1}), and a substantial reduction in the N–H stretch (3324 cm^{-1})

(Fig. 5d). The addition of 18 h CP, followed by a further 12 h incubation, induced increments in the urethane C–N stretching (1260 cm^{-1}) (Fig. 5d). These results demonstrate that esterase and urethane-cleaving activities displayed in different fractions and cultivation times generate different structural modifications on Impranil, either individually or concertedly, suggesting the participation of different proteins with similar activities but distinct specificities.

Discussion

Different *Alicyclophilus denitrificans* strains can biodegrade various organic pollutants, PU coatings (Hydroform® and PolyLack®) and foams, suggesting this genus could be helpful for xenobiotics bioremediation (reviewed in Solís-González and Loza-Tavera, 2019). However, the underlying biochemical mechanisms for PU degradation remain unknown. To fill this gap, we investigated the temporal and spatial esterase and urethane-cleaving activities that *A. denitrificans* BQ1 displays for degrading the PS-PU Impranil. Impranil has been a model substrate for studying PU microbial biodegradation because of the easy clearing monitoring during the process (Blake et al. 1998; Pathirana and Seal 1984; Russel et al. 2011). Here, we performed all the experiments in mineral medium with Impranil at 1.25 mg ml^{-1} , which produced the best *A. denitrificans* BQ1 growth (Fig. 1a). The most extensive clearing coincided with the most significant decrements in the ester C=O and the urethane C–N and C–O–C signals detected in culture supernatants (Fig. 2c) with its maximum at the beginning of the stationary phase (24 h) (Fig. 1b). The urethane-cleaving reaction was also revealed by the fluctuating changes in the amine signal observed at different times throughout the temporal analysis (Fig. 2c). These changes suggest that amines were continuously generated by polymer biofragmentation and assimilated by BQ1 during its growth in Impranil. Polymer biofragmentation, also named depolymerization, has been defined as the lytic phenomenon necessary for the subsequent assimilation of polymer components. Biofragmentation and assimilation are processes concerning the different degrees of polymers' biodegradation, and they precede mineralization, which is the ultimate polymer' transformation (Ali et al. 2021; Lucas et al. 2008). Amine increments

due to urethane hydrolysis of solid PU polymers were observed during the cultivation of *Pseudomonas* sp. DBFIQ-P36 (Spontón et al. 2013), *Alicyclophilus* sp. BQ8 (Pérez-Lara et al. 2016), and in the analysis of the *Rhodococcus hoaggi* TB-60 urethanase when hydrolyzing toluene-2,4-dicarbamic acid dibutyl ester, a PU related compound (Akutsu-Shigeno et al. 2006). Therefore, our results show that, besides the cleavage of the more susceptible ester groups, the recalcitrant urethane groups were also cleaved by *A. denitrificans* BQ1. Sustaining the FTIR results, the GC–MS analysis revealed that the Impranil polymer building blocks were released from the polymer fluctuating throughout the cultivation time; some of them with tendencies to increase (compounds 1, 2), suggesting they were little or not assimilated or to reduce (compounds 3, 4), indicating they were assimilated by the bacteria. Moreover, most of the plasticizer-type compounds were partially or entirely metabolized, and some degradation compounds appeared and decreased or disappeared at the final analyses (24 h), indicating that *A. denitrificans* BQ1 can metabolize these compounds. Hence, in addition to the PU polymer, the plasticizers would be another carbon source available for BQ1 growth in Impranil. In fact, several bacteria capable of degrading phthalate-type plasticizers have been reported (Liang et al. 2008) (Fig. 3). These findings evidence the metabolic capacity of *A. denitrificans* BQ1 to degrade the PS-PU polymer and some plasticizers detected in the coating.

The analyses of *A. denitrificans* BQ1 extracellular and cytosolic esterase and urethane-cleaving activities (Fig. 4) and the effects these protein fractions alone or combined produced on the PS-PU Impranil (Fig. 5) revealed a concerted action that allows an effective attack to the polymer. Based on these results, we hypothesized a two-stage process that spatially and temporally integrates the concerted action of esterase and urethane-cleaving activities participating in Impranil biodegradation (Fig. 6). At the first stage (0–18 h), which corresponds to the active growing phase, the high esterase activity in the extracellular fraction cleaves Impranil PS-PU ester bonds fragmenting the polymer to shorter chains with carboxylates or alcohols at their ends. Even though lipase has been reported to be more effective than esterase in Impranil biodegradation (Biffinger et al. 2015), BQ1 esterase activities—extracellular and cytoplasmic—hydrolyzed short-chain but not

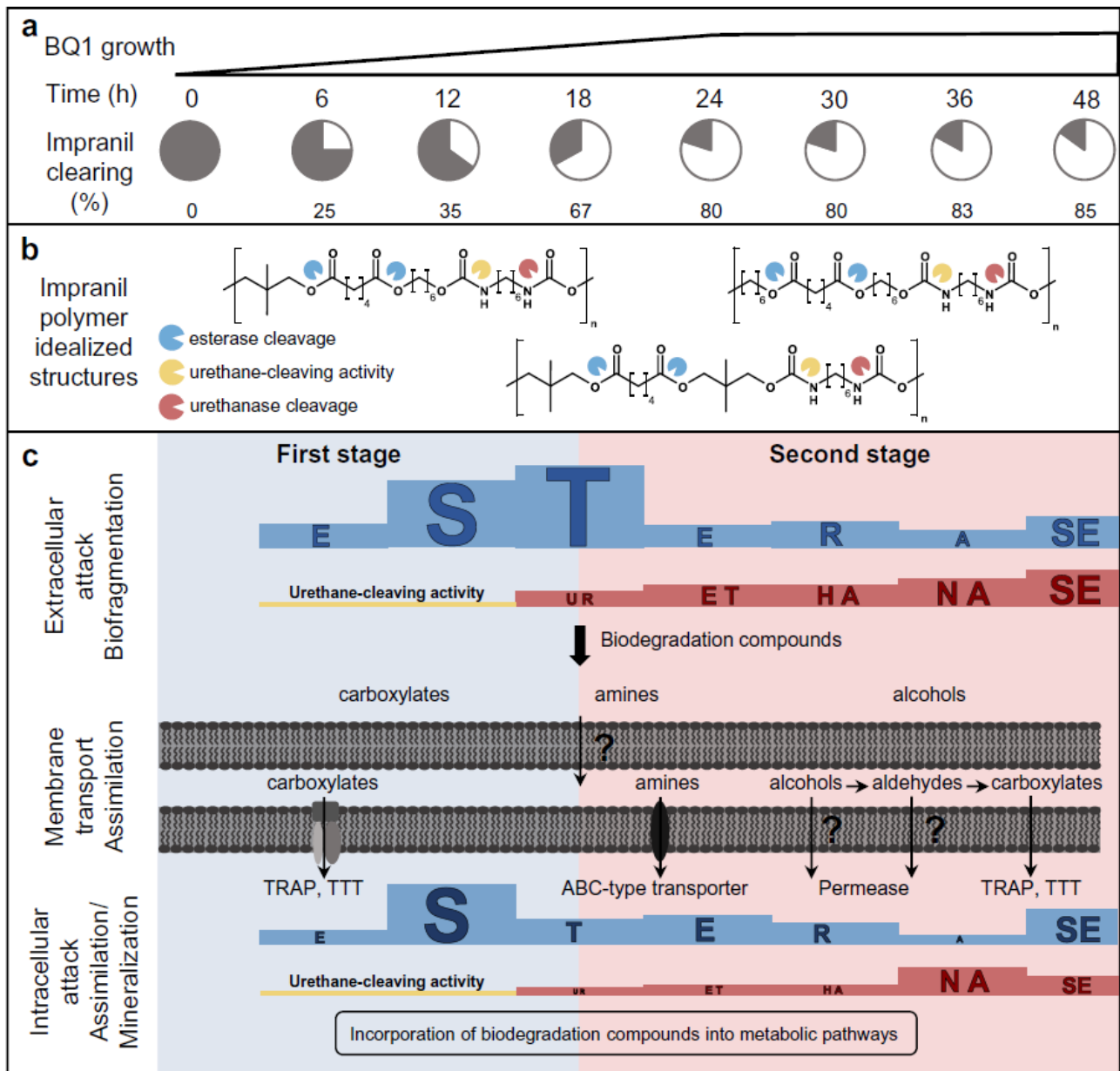


Fig. 6 Model for the concerted action of esterase and urethane-cleaving activities of *A. denitrificans* BQ1 during Impranil degradation. **a** BQ1 thrives in Impranil, reaching its maximum growth and Impranil clearing at 24 h. **b** Impranil is a colloidal water-based PS-PU dispersion made of poly hexane/neopentyl adipate polyester and hexamethylene diisocyanate. By step-growth polymerization, these compounds can randomly react, producing different kinds of polymer segments where the urethane groups would be flanked by distinct functional groups, providing specific chemical structural compositions to be attacked by enzymatic activities. **c** BQ1 concertedly displays esterase and urethane-cleaving proteins (activity levels depicted by the heights of the blue and red bars and the letter size) expressed at two stages. In the first stage (0–18 h) (light-blue background), extracellular esterases and unidentified urethane-cleaving enzymes hydrolyze the ester bonds and urethane groups at specific sites. These cleavages generate alco-

hols, amines, and carboxylates, producing small polymer fragments. In the second stage (18–48 h) (light-red background), extracellular urethanases hydrolyze the urethane groups at different chemical structural compositions than those cleaved by the early time urethane-cleaving enzymes, generating the corresponding amines and alcohols. The alcohols, carboxylates, and amines generated during the biodegradation process would go across the outer membrane by unknown mechanisms, reaching the periplasm. There, the carboxylates and amines would cross the inner membrane via tripartite tricarboxylate transporters (TTT) and ABC-type transporters, respectively, to reach the cytoplasm. In the cytoplasm, the molecules that still have internal ester and urethane groups will be cleaved by cytoplasmic esterases and urethane-cleaving enzymes to produce smaller molecules metabolized by the correspondent biochemical pathways, accomplishing the PS-PU mineralization

long-chain substrates; thus, no lipase activity was displayed. Coincident with this observation, in *Acinetobacter gernerii* P7, an Impranil degrading esterase showed better hydrolyzing activity on short-chain substrates as *p*-nitrophenyl-acetate, *p*-nitrophenyl-propionate (with higher activity), and *p*-nitrophenyl-butyrate, but no activity was detected on long-chain substrates such as *p*-nitrophenyl-caproate or *p*-nitrophenyl-caprylate (Howard et al. 2012). After the BQ1 extracellular esterase action, it can be suggested that the produced carboxylates are internalized into the cell either by tripartite-ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters, tripartite tricarboxylate transporters (TTT), or both. TRAP transporters internalize different organic anions and C4-dicarboxylates, while TTT introduce C6-di or tricarboxylates into the cell. Each transporter type is formed by two transmembrane proteins and a periplasmic high-affinity substrate-binding protein (SBP) (reviewed by Rosa et al. 2018). Interestingly, from the seven *A. denitrificans* genomes annotated so far, the strain BQ1 has the highest number of TTT SBPs encoding genes (164). The higher number of TTT SBPs genes may provide BQ1 with more versatility for recognizing and internalizing different carboxylates for being metabolized in the cytoplasm. On the other hand, alcohols, the other product of ester cleavage, can be oxidized to the corresponding aldehydes and carboxylates by dehydrogenases in the periplasmic space (Cuenca et al. 2016; Kawai 2010), and possibly internalized by TRAP, TTT, or permeases (Kawai 2010). The carboxylates and alcohols resulting from oxidation are internalized into bacteria cells for further assimilation in the cytoplasm (Ali et al. 2021; Lucas et al. 2008).

Since decrements in the urethane signals were observed at early bacterial growing times in the culture supernatants (Fig. 2c), we expected to detect extracellular urethanase activity, but this activity was observed neither at 6 nor 12 h of cultivation times (Fig. 4c). Hence, because a 36 h urethanase activity was able to cleave substrates having free carbamoyl groups (Table 1), but no urethane-cleaving activity was revealed before 18 h, we reasoned that, other proteins different than those acting at 36 h, performed the urethane cleavage observed in the FTIR analysis at early times. These urethane-cleaving enzymes should act at specific urethane groups flanked by distinctive chemical structures. The different PU chemical structures are conceivable based on the step-growth

polymerization reactions, which generates urethane groups embedded in different structural units forming miscellaneous PS-PU polymer segments (Fig. 2b). These specific structural compositions are the targets where the urethane-cleaving enzymes would selectively act. The early-time urethane-cleaving enzyme (before 18 h) should be a non-canonical esterase or urethanase with the capacity to cleave the ester or amide bond at the carbamate groups. The urethane hydrolase from *R. hoaggi* TB-60 showed activity over carbamate derivatives related to PU polymers (toluene-2,4-dicarbamic acid dibutyl ester; methylene bisphenyl dicarbamic acid dibutyl ester, hexamethylene dicarbamic acid dibutyl ester), anilides, amides, and even esters, but its activity was low on ethyl- and butyl carbamates having a free carbamoyl group (Akutsu-Shigeno et al. 2006). Coincident with this type of non-canonical urethane-cleaving enzymes, the EstA8 esterase from *Acinetobacter* sp. strain no. 6, which shows the amidase signature G-[GAV]-S-[GS](2)-G-x-[GSAE]-[GSAVYCT]-x-[LIVMT]-[GSA]-x-(6)-[GSAT]-x-[GA]-x-[DE]x-[GA]-x-S-[LIVM]-R-x-P-[GSACTL] (Expasy. PROSITE. <https://prosite.expasy.org/doc/PS00571>) hydrolyzes both *p*-nitrophenyl esters and *p*-nitroanilides (Wei et al. 2003). Besides, an Impranil cleaving carboxyl ester hydrolase isolated from a rumen metagenome attacks the carbamate group of the Fenobucarb insecticide (Ufarté et al. 2017). As a matter of fact, four genes with homology (score > 130, identity > 32%, query cover > 95%) to the *R. hoaggi* TB-60 urethane hydrolase were identified in the *A. denitrificans* BQ1 genome (CE154_002430, CE154_010035, CE154_012165, CE154_005235), supporting the hypothesis that BQ1 expresses a non-canonical urethane-cleaving enzyme with capabilities as those of *R. hoaggi* TB-60 urethane hydrolase. The urethane cleavage produces carboxylic acids and aliphatic amines. Confirming the cleavage of the Impranil urethane groups, the nitrogen-containing biodegradation product 4-aminoheptanedioic acid (compound 11) was identified after 12 h of culture, when the urethanase activity was not yet detected, and remained high up to the end of the analysis (Fig. 4a, b). Furthermore, the amines released during the urethane-cleaving process, detected by changes in the FTIR amine signal, can be transported into the cell by ABC-type transporters. In *Pseudomonas putida* strain U, the PeaH protein is an ABC transporter that introduces propyl-,

butyl- and pentyl-amine into the cells (Luengo and Olivera, 2020). Three genes (CE154_001345, CE154_020915, CE154_006925) encoding proteins with homology (score > 190, identity \geq 30%, query cover > 75%) to *PeaH* were identified in the *A. denitrificans* BQ1 genome, suggesting that this strain has aliphatic amines' internalization capacity.

A second stage in the Impranil biodegradation process by *A. denitrificans* BQ1 can be identified starting at 18 h when the urethanase activity arose (Fig. 4b, c). After its highest activity at 18 h, esterase abruptly decreased at 24 h, reaching very low levels, while the urethanase activity continued increasing up to the end of the analysis (48 h). Hence, from 18 h onwards, high urethanase activity should cleave urethane groups embedded at different polymer structural compositions than those recognized by the early-time urethane-cleaving activity. The emergence of the urethanase activity at 18 h indicates an inducible expression of the gene encoding this protein, similar to the one observed for the *Rhodococcus hoaggi* TB-60 urethane hydrolase, which was strongly induced in the presence of acetanilide (Akutsu-Shigeno et al. 2006). At this second stage, the biofragmented PU products resulting from ester and urethane cleavages continue entering the cell for further transformations by cytoplasmic enzymes to be subsequently assimilated as biomass. Because the resulting fragments may still contain ester and urethane groups, cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities would still be needed for cleaving these groups inside the cells. However, they would display different substrate specificity than the extracellular ones. Evidence for this difference was observed in the enzymatic analysis performed at 36 h, in which distinct substrate specificities of cytoplasmic esterase and urethanase activities were observed compared to the extracellular ones (Table 1).

The different kinds and effects of the extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving proteins participating in the degradation of the Impranil PS-PU was confirmed by in vitro experiments with isolated or combined protein fractions from different cultivation times. The 12 h ECP decreased the urethane C–N and increased the amine N–H signals, whereas the 12 h CP did not modify them (Fig. 5a), indicating that early cytoplasmic activities do not act over the intact Impranil. Similarly, the experiments with combined fractions showed that the 12 h CP plus

18 h CP increased the C–N signal (Fig. 5d), demonstrating that the presence of the urethane-cleaving activity was decisive in inducing changes in the urethane groups of the intact polymer. Moreover, the 12 h CP and the 12 h CP plus 18 h CP strongly diminished the amine signals, suggesting that enzymes for amine utilization were present in the CP fraction (Fig. 5d). On the other hand, the absence of additional changes on the urethane signals in the 12 h ECP plus 18 h ECP (Fig. 5c) suggests that previous enzymatic activities were required to attack the PS-PU or that the degradation products accumulated during the in vitro assay could cause enzyme inhibition. Analyzing the last possibility, in the whole bacterial cultures, the former products would be actively consumed by the microbial cells, preventing product inhibition of the extracellular enzymes keeping them at work. Finally, the concerted action between extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities during Impranil biodegradation is also observed in the higher Impranil clearing activity detected in the whole-cell BQ1 cultures, compared to the ones displayed by the independent ECP or CP fractions.

Conclusions

The present research demonstrates that *Alicyclophilus denitrificans* BQ1 can degrade the PS-PU Impranil by displaying extracellular and cytoplasmic esterase and urethane-cleaving activities in a spatially and temporarily regulated manner, exerting a concerted degradative action. Distinct types of esterase and urethane-cleaving activities were detected at different cultivation times and cellular compartments during *A. denitrificans* BQ1 growth, suggesting a more complex biochemical scenario displayed during Impranil degradation than anticipated. These findings provide new insights into PU-degrading enzymes' biochemistry and help develop biotechnological strategies for degrading PS-PU waste.

Acknowledgements J-FJ acknowledges Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for her scholarship for Ph.D. studies at Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM and DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN223317) for a partial scholarship at the end of her studies. We thank Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM for the technical support provided by Ch. Marisela Gutiérrez Franco in the FTIR experiments, and

Dr. Ayixon Sánchez Reyes from Instituto de Biotecnología, UNAM for his advice with the bioinformatic analysis.

Author Contributions JF-J and HL-T conceived and designed the research. JF-J and MV-S conducted experiments. MJC-G discussed GC-MS results and proposed PU theoretical formula. All authors analyzed data. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was funded by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México grants IN223317 and IN227620, Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant 5000-9117, and Programa Presupuestario F003 "Programas Nacionales Estratégicos de Ciencia, Tecnología y Vinculación con los sectores Social, Público y Privado", Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, grant 101737.

Data availability Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Ethical approval This article does not contain any studies performed with humans or animals.

References

- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T (2006) Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:422–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0071-1>
- Ali SS, Elsamahy T, Koutra E, Kornaros M, El-Sheekh M, Abdelkarim EA, Zhu D, Sun J (2021) Degradation of conventional plastic wastes in the environment: a review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *Sci Total Environ* 771:144719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144719>
- Álvarez-Barragán J, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, González-Hernández R, Aguilar-Osorio G, Loza-Tavera H (2016) Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Appl Environ Microbiol* 82:5225–5235. <https://doi.org/10.1128/AEM.01344-16>
- Biffinger JC, Barlow DE, Cockrell AL, Cusick KD, Hervey WJ, Fitzgerald LA, Nadeau LJ, Hung CS, Crookes-Goodson WJ, Russell JN (2015) The applicability of impranil® DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes. *Polym Degrad Stab* 120:178–185. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.020>
- Blake RC, Norton WN, Howard GT (1998) Adherence and growth of a *Bacillus* species on an insoluble polyester polyurethane. *Int Biodeterior Biodegrad* 42:63–73. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00048-1)
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- del Cuenca MS, Roca A, Molina-Santiago C, Duque E, Armengaud J, Gómez-García MR, Ramos JL (2016) Understanding butanol tolerance and assimilation in *Pseudomonas putida* BIRD-1: an integrated omics approach. *Microb Biotechnol* 9:100–115. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12328>
- Deshpande MV, Eriksson KE, Göran Pettersson L (1984) An assay for selective determination of exo-1,4,- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal Biochem* 138:481–487. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90843-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90843-1)
- Expasy PROSITE. <https://prosite.expasy.org/doc/PS00571>. Accessed Jan 23rd, 2022
- Faccia PA, Pardini FM, Agnello AC, Amalvy JI, Del Panno MT (2021) Degradability of poly(ether-urethanes) and poly(ether-urethane)/acrylic hybrids by bacterial consortia of soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 160:105205. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105205>
- Gamerith C, Herrero Acero E, Pellis A, Ortner A, Vielnascher R, Luschnig D, Zartl B, Haernvall K, Zitzenbacher S, Strohmeier G, Hoff O, Steinkellner G, Gruber K, Ribitsch D, Guebitz GM (2016) Improving enzymatic polyurethane hydrolysis by tuning enzyme sorption. *Polym Degrad Stab* 132:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.02.025>
- Gaytán I, Sánchez-Reyes A, Burelo M, Vargas-Suárez M, Liachko I, Press M, Sullivan S, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H (2020) Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis. *Front Microbiol* 10:2986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02986>
- Godwin AD (2017) Plasticizers. In: Kutz M (ed) *Plastics Design Library, Applied Plastics Engineering Handbook*, 2nd edn. William Andrew Publishing, New York, pp 533–553
- Howard GT (2011) Microbial degradation of polyurethane. *Recent Dev Polym Recycl* 661:215–238
- Howard GT, Crother B, Vicknair J (2001) Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (pueB) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeterior Biodegrad* 47:141–149. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00042-7)
- Howard GT, Norton WN, Burks T (2012) Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation* 23:561–573. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9533-6>

- Huang SJ, Roby MS (1986) Poly (amide-urethanes). *J Bioact Compat Polym* 1:61–71. <https://doi.org/10.1177/088391158600100106>
- Jiang W, Zhang C, Gao Q, Zhang M, Qiu J, Yan XHQ (2021) Carbamate C-N hydrolase gene *ameH* responsible for the detoxification step of methomyl degradation in *Aminobacter aminovorans* strain MDW-2. *Appl Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02005-20>
- Kawai F (2010) The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1743–1759. <https://doi.org/10.1271/bbb.100394>
- Liang DW, Zhang T, Fang HH, He J (2008) Phthalates biodegradation in the environment. *Appl Environ Microbiol* 80(2):183–198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
- Lucas N, Bienaime C, Belloy C, Queuneudec M, Silvestre F, Nava-Saucedo JE (2008) Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere* 73(4):429–442. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
- Luengo JM, Olivera ER (2020) Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 22:1174–1192. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14912>
- Magnin A, Pollet E, Perrin R, Ullmann C, Persillon C, Phalip V, Avérous L (2019) Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. *Waste Manag* 85:141–150. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.12.024>
- Magnin A, Pollet E, Phalip V, Avérous L (2020) Evaluation of biological degradation of polyurethanes. *Biotechnol Adv* 39:107457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107457>
- McCarthy SJ, Meijs GF, Mitchell N, Gunatillake PA, Heath G, Brandwood A, Schindhelm K (1997) *In-vivo* degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. *Biomaterials* 18:1387–1409. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00083-5)
- Mosley AP (2017) Acrylic plastics. *Brydson's plastics materials*, 8th edn. Elsevier Ltd, Amsterdam, pp 441–456. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00016-5>
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T (1995) Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol Lett* 129:39–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00131-N](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00131-N)
- Nomura N, Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nakahara T (1998) Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *J Ferment Bioeng* 86:339–345. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(99\)89001-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(99)89001-1)
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños-Núñez S, Cruz-Gómez MJ, Wacher C, Loza-Tavera H (2007) Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and *N*-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol* 73:6214–6223. <https://doi.org/10.1128/AEM.01230-07>
- Oguntimein G, Kordel M, Schmid R (1992) Thermodynamic properties of lipases. *Fat Sci Technol* 94:345–348. <https://doi.org/10.1002/lipi.19920940907>
- Ozsagiroglu E, Iyisan B, Guvenilir YA (2012) Biodegradation and characterization studies of different kinds of polyurethanes with several enzyme solutions. *Polish J Environ Stud* 21:1777–1782
- Pathirana RA, Seal KJ (1984b) Studies on polyurethane deteriorating fungi. Part 2. An examination of their enzyme activities. *Int Biodeter* 20(4):229–36
- Pérez-Lara LF, Vargas-Suárez M, López-Castillo NN, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H (2016) Preliminary study on the biodegradation of adipate/phthalate polyester polyurethanes of commercial-type by *Alicyclophilus* sp. BQ8. *J Appl Polym Sci* 133:1–9. <https://doi.org/10.1002/app.42992>
- Pergal MV, Džunuzović JV, Poreba R, Micić D, Stefanov P, Pezo L, Špirková M (2013) Surface and thermomechanical characterization of polyurethane networks based on poly(dimethylsiloxane) and hyperbranched polyester. *Express Polym Lett* 7:806–820. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2013.78>
- Phua SK, Castillo E, Anderson JM, Hiltner A (1987) Biodegradation of a polyurethane *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 21:231–246. <https://doi.org/10.1002/jbm.820210207>
- Rosa LT, Bianconi ME, Thomas GH, Kelly DJ (2018) Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters and tripartite tricarboxylate transporters (TTT): from uptake to pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol* 8:1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00033>
- Ru J, Huo Y, Yang Y (2020) Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Front Microbiol* 11:1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzier KW, Hickman DS, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Núñez SJ, Santiago M, Townes MA, Vishnevetsky M, Williams NE, Vargas MPN, Boulanger LA, Bascom-Slack C, Strobel SA (2011) Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol* 77:6076–6084. <https://doi.org/10.1128/AEM.00521-11>
- Schmidt J, Wei R, Oeser T, Silva e. LAD, Breite D, Schulze A, Zimmermann W (2017) Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases. *Polymers* 9:65. <https://doi.org/10.3390/polym9020065>
- Singh JJ, Bansal S, Sonthalia A, Rai AK, Singh SP (2022) Biodegradation of plastics for sustainable environment. *Bioresour Technol* 347:126697. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126697>
- Solís-González CJ, Loza-Tavera H (2019) *Alicyclophilus*: current knowledge and potential for bioremediation of xenobiotics. *J Appl Microbiol* 126:1643–1656. <https://doi.org/10.1111/jam.14207>
- Spontón M, Casis N, Mazo P, Raud B, Simonetta A, Ríos L, Estenoz D (2013) Biodegradation study by *Pseudomonas* sp. of flexible polyurethane foams derived from castor oil. *Int Biodeterior Biodegrad* 85:85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.019>
- Stern RV, Howard GT (2000) The polyester polyurethanease gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a

- lipase. *FEMS Microbiol Lett* 185:163–168. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00094-X)
- Sulaiman S, Yamato S, Kanaya E, Kim JJ, Koga Y, Takano K, Kanaya S (2012) Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Appl Environ Microbiol* 78(5):1556–1562. <https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11>
- Sun L, Gao X, Chen W, Huang K, Bai N, Lyu W, Liu H (2019) Characterization of the protham biodegradation pathway in *Starkeya* sp. strain YW6 and cloning of a novel amidase gene *mmH*. *J Agric Food Chem* 67:4193–4199. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06928>
- Ufarté L, Laville E, Duquesne S, Morgavi D, Robe P, Klopp C, Rizzo A, Pizzut-Serin S, Potocki-Veronese G (2017) Discovery of carbamate degrading enzymes by functional metagenomics. *PLoS ONE* 12:1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189201>
- Vega RE, Main T, Howard GT (1999) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. *Int Biodeterior Biodegrad* 43:49–55. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00068-7)
- Wang M, Guo L, Sun H (2019) Manufacture of biomaterials. *Encycl Biomed Eng*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11027-X>
- Wei YL, Kurihara T, Suzuki T, Esaki N (2003) A novel esterase from a psychrotrophic bacterium, *Acinetobacter* sp. strain no. 6, that belongs to the amidase signature family. *J Mol Catal B Enzym* 23:357–365. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00099-7)
- 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 Biochem* 290:102–107. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4933>
- Wypych G (2004) Plasticizers use and selection for specific polymers. In: Wypych G (ed) *Handbook of plasticizers*, 1st edn. ChemTec Publishing, Toronto, pp 273–379
- Yun H, Liang B, Qiu J, Zhang L, Zhao Y, Jiang J, Wang A (2017) Functional characterization of a novel amidase involved in biotransformation of triclocarban and its dehalogenated congeners in *Ochrobactrum* sp. TCC-2. *Environ Sci Technol* 51:291–300. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04885>
- Zhang L, Hang P, Hu Q, Chen XL, Zhou XY, Chen K, Jiang JD (2018) Degradation of phenylurea herbicides by a novel bacterial consortium containing synergistically catabolic species and functionally complementary hydrolases. *J Agric Food Chem* 66:12479–12489. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03703>
- Zhang L, Hang P, Zhou X, Dai C, He Z, Jiang J (2020) Mineralization of the herbicide swep by a two-strain consortium and characterization of a new amidase for hydrolyzing swep. *Microb Cell Fact* 19:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1276-9>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.