

## EFFECTO DE LA ADICIÓN DE PROTEASAS EN LA DETOXIFICACIÓN DE PASTAS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*)

Rafael Jimenez Ocampo <sup>a</sup>, Martha F. Martín del Campo Solís <sup>b</sup>, M. Angeles Camacho Ruiz <sup>b</sup>, Juan C. Mateos Díaz <sup>b</sup>, Rosa M. Camacho Ruiz <sup>b</sup>, Jorge A. Rodríguez González <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Durango-Mezquital Km. 4.5, Domicilio, Durango, Durango, 34170, MÉXICO.

<sup>b</sup> Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Av. Normalistas #800 Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, 44270, MÉXICO. \*email: [jrodriguez@ciatej.mx](mailto:jrodriguez@ciatej.mx)

### Resumen

La pasta de higuierilla tiene un alto contenido proteico siendo un excelente candidato para sustituir algunas pastas en la alimentación de ganado, sin embargo, contiene varias toxinas proteicas, siendo la más toxica la Ricina A, la cual al ser ingerida en altas cantidades pueden causar la muerte ganado. Debido a que las toxinas de esta pasta son de origen proteico, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de diferentes proteasas comerciales en la disminución de dichas toxinas. En un primer ensayo se emplearon 3 proteasas comerciales (Pancreatina, Papaína y Savinase) con el fin de degradar la aglutinina RCA<sub>120</sub> de *R. communis* obteniendo una disminución significativa en todos los casos, logrando una reducción del 98.8% con la proteasa comercial Savinase. Posteriormente, la proteasa Savinase fue empleada al 1% a dos humedades diferentes con el fin de estudiar la disminución de toxinas en la pasta de higuierilla durante una incubación de 72h. La humedad al 40% en la pasta contribuyó a una disminución del 62% de toxinas probablemente debido a la inestabilidad de las mismas y a la presencia de proteasas endógenas de la planta, mientras que al adicionar la Savinase en las mismas condiciones, se logró una disminución del 81% de toxinas (en mg equivalentes de RCA<sub>120</sub>), evidenciando una disminución importante de toxinas en la pasta de higuierilla.

### Introducción

La semilla de castor (*Ricinus communis*) consiste aproximadamente en 50% de aceite haciéndolo un excelente candidato para la producción de biodiesel y biolubricante. Durante este proceso, se genera un subproducto denominado pasta de higuierilla que es comúnmente empleada como fertilizante [1]. Esta pasta tiene un alto contenido de proteína y fibra, sin embargo, contiene toxinas proteicas que limitan su uso como complemento en la alimentación de ganado. Se han empleado diferentes técnicas biológicas para la detoxificación de la pasta de higuierilla, entre ellas la fermentación en medio sólido (FMS) con hongos filamentosos [2] en donde probablemente algunas de su proteasas pudieran contribuir a la disminución de estas toxinas, sin embargo, al momento no se ha reportado la adición de proteasas a la pasta para su detoxificación. El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la adición de proteasas para la disminución de toxinas proteicas similares a la aglutinina RCA<sub>120</sub> (Ricina A, entre otras) presentes en la pasta de higuierilla.

### Metodología

**Proteasas.** El extracto de páncreas porcino (Pancreatina, Sigma P7545), extracto de latex de papaya (Papaína, Sigma P3375) y una proteasa comercial recombinante proveniente de *Bacillus subtilis* (Savinase Ultra 16L, Novozymes) fueron empleadas en las condiciones recomendadas por el proveedor.

**Cuantificación de toxinas.** La extracción de proteínas totales se realizó de acuerdo a lo reportado por [3]. Se empleó como estándar la aglutinina RCA<sub>120</sub> de *Ricinus communis* (Sigma L7886) que presente una homología de secuencia en aminoácidos del 85% con la Ricina A (proteína de mayor toxicidad presente en la pasta). La cuantificación de toxinas se realizó mediante un ensayo de ELISA utilizando un anticuerpo primario de conejo anti-RCA<sub>120</sub> y como anticuerpo secundario uno de cabra anti-conejo IgG acoplado a la peroxidasa de rábano y revelado después de 20 min de incubación con el sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) (Sigma T0440); la reacción fue parada mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (x-Mark, Biorad).

**Detección de la toxina por Western-blot.**

Se depositaron marcadores coloreados (Kaleidoscope, Biorad) y 2 µg de muestra por pozo del gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se realizó la electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Una vez que las proteínas migraron en el gel, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF. Lo anterior se realizó empleando el equipo transblot turbo (Biorad), durante 10 min a las condiciones especificadas por el proveedor. La membrana se incubó con los mismos anticuerpos y revelada al igual que con la técnica de ELISA. Una vez que las bandas de RCA<sub>120</sub> (66-70 kDa) fueron visibles, la reacción de revelación fue parada mediante la remoción de la solución de revelado y la adición de agua destilada.

**Condiciones de proteólisis de la RCA<sub>120</sub> y la pasta de higuierilla.** Las 3 proteasas comerciales fueron probadas en las condiciones (pH, T y concentración) que recomienda cada proveedor durante 1h y se comparó contra un testigo negativo la misma toxina (RCA<sub>120</sub>) en las mismas condiciones en ausencia de cada proteasa. La mejor proteasa (Savinase) fue probada al 1% (p/p) en la pasta de higuierilla diferentes humedades (40 y 80%) incubado durante 72h a 55 °C, con un tampón Tris-HCl (Sigma) 25 mM pH 8.5 a las humedades reportadas.

**Resultados**

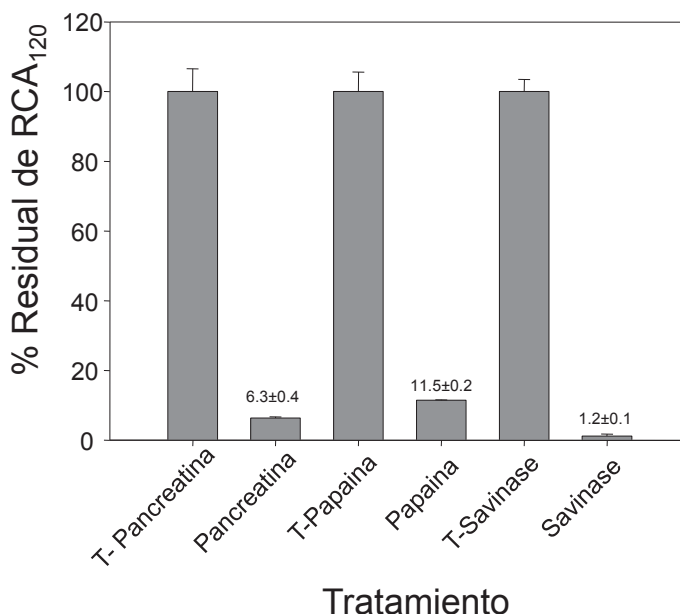


Figura 1. Proteólisis de la aglutinina RCA<sub>120</sub> de *Ricinus communis* empleando 3 proteasas comerciales durante una incubación de 1 h cuantificada por ELISA. T: muestra incubada en las mismas condiciones de ensayo sin adición de proteasa.

En la Figura 1 se muestra la cantidad residual de toxina RCA<sub>120</sub> al ser incubada con las diferentes enzimas comerciales, siendo la Savinase con la que se obtuvo el mayor grado de detoxificación obteniendo un 1.2±0.1% de RCA<sub>120</sub> residual (98.8±0.1% de detoxificación), mientras que con la pancreatina y papaína se logró detoxificar en un 93.7±0.4 y 88.5±0.2%, respectivamente.

Para verificar si era visible un poco de RCA<sub>120</sub> en su forma intacta durante las incubaciones anteriores, se realizó una técnica de análisis por Western blot (Figura 2) que tiene el mismo principio del ELISA empleando los mismos anticuerpos, solo que permite identificar la banda correspondiente al peso de la RCA<sub>120</sub>. Esta proteína fue separada por electroforesis y de esta manera se pudo determinar de manera cualitativa si todavía existía algún rastro de la RCA<sub>120</sub> después de los tratamientos enzimáticos y se comparó contra un tratamiento térmico a 80 y 90 °C. En la Figura 2, se puede apreciar una banda que fue revelada por arriba de los 75 kDa respecto a la migración de los marcadores moleculares la cual se encuentra cerca del peso molecular esperado ≈60 KDa para una subunidad de RCA<sub>120</sub>.

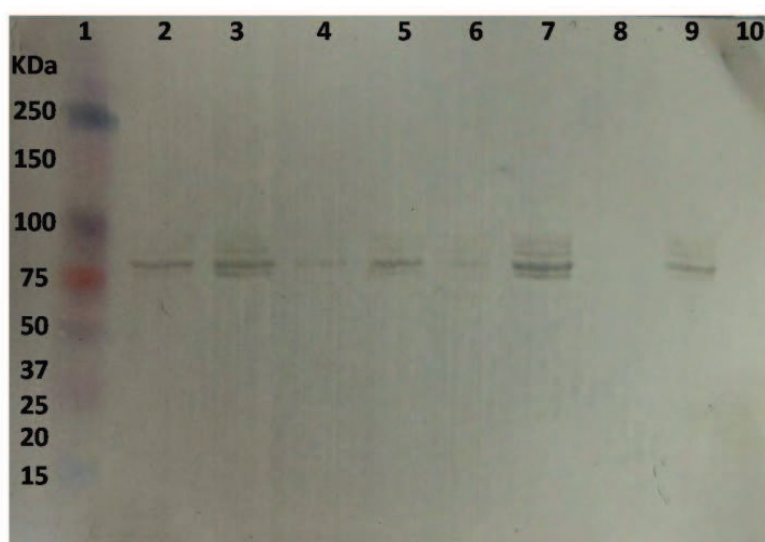


Figura 2. Análisis por Western blot de la RCA<sub>120</sub> tratada con temperatura y proteasas. Carriles: 1: Marcadores moleculares Kaleidoscope (Biorad); 2: RCA<sub>120</sub>; 3: RCA<sub>120</sub> a 80°C; 4: RCA<sub>120</sub> a 90°C. 5: T- RCA<sub>120</sub> + buffer pancreatina; 6: RCA<sub>120</sub> + pancreatina; 7: T- RCA<sub>120</sub> + buffer papaína; 8: RCA<sub>120</sub> + papaína; 9: T- RCA<sub>120</sub> + buffer savinase; 10: RCA<sub>120</sub> + savinase. Se depositó el mismo volumen en cada carril que correspondía a 2 µg de RCA<sub>120</sub> inicial.

Con el tratamiento a 80°C se observó una banda con intensidad muy similar a la toxina no tratada y a 90°C se observó una banda de menor intensidad indicando que en estas condiciones la temperatura puede comenzar a tener un efecto en la degradación de la RCA<sub>120</sub>. Respecto a los tratamientos enzimáticos, se puede apreciar la presencia de la banda de interés en ausencia de enzimas y solamente para el caso de la pancreatina se puede apreciar una ligera banda del mismo peso molecular esperado. Para los otros dos casos (savinase y papaína) no se observó la banda indicando que probablemente ya no exista RCA<sub>120</sub> en su forma intacta o que la cantidad presente es muy baja para visualizarla, lo cual coincide con los resultados obtenidos con la técnica de ELISA (Figura 1) ya que con estas la savinase y la papaína se logro detoxificar en un 98.8±0.1 y un 93.7±0.4%, respectivamente.

Debido a los resultados anteriores, la enzima Savinase fue empleada para la detoxificación de la pasta de higerilla (Figura 3) a diferentes humedades, donde se observa que simplemente al incubar la pasta a

una humedad del 40% y 80% se logra una disminución importante de toxinas de alrededor del 62 y 71%, respectivamente, pero al adicionar la enzima en esas condiciones se logró llegar hasta un 81-82% de detoxificación de la pasta de higuierilla.

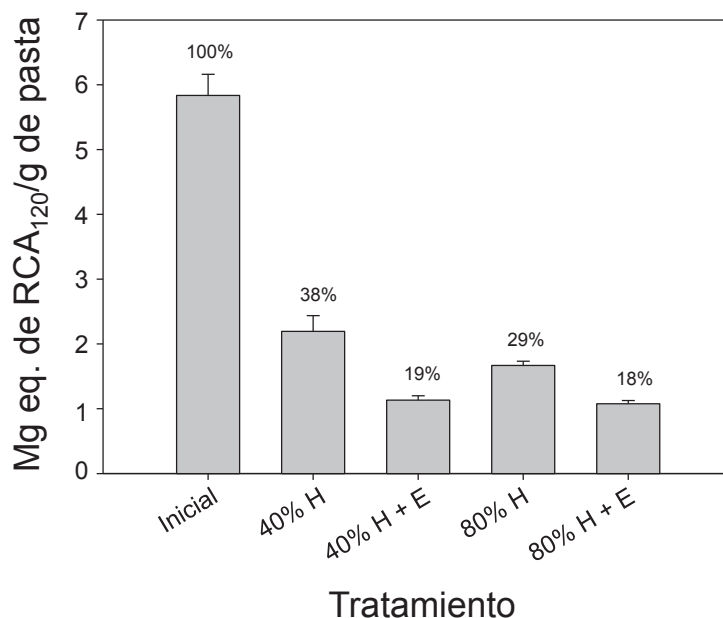


Figura 3. Detoxificación de la pasta de higuierilla midiendo los mg equivalentes de RCA<sub>120</sub> por gramo de pasta a diferentes condiciones cuantificadas por ELISA. H: % de humedad; E: adición de la enzima Savinase de Novozymes.

## Conclusiones

Se logró evidenciar la proteólisis de RCA<sub>120</sub> por diferentes enzimas comerciales, identificando a la enzima comercial Savinase como el mejor candidato a emplear en la detoxificación de pasta de higuierilla. Se logró una importante detoxificación de la pasta de higuierilla al incubarla a humedades del 40 y del 80% (55 °C durante 72 horas), quizás debido a la presencia de proteasas endógenas de la misma pasta y la inestabilidad de las toxinas a las condiciones del tratamiento, mientras que al adicionar la proteasa Savinase en estas mismas condiciones, se logró aumentar la detoxificación global de la pasta de higuierilla en un 81-82%.

## Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por SAGARPA al proyecto “Estrategias para dar valor agregado a las pastas residuales de la producción de biocombustibles (Jatropha e Higuierilla)”. M.F. Martin del Campo y M.A. Camacho agradecen al CONACYT por el financiamiento de su beca doctoral.

## Referencias

1. Akhtar M. and Alam M. Utilization of waste materials in nematode control: a review. *Bioresource Technology*, 45: p 1-7, 1993.
2. Brand D., Pandey A., Roussos S. and Soccol C. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2): p 127-130, 2000.
3. Baldoni A., Guerra Araújo A., et al, Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. *The International Journal of Plant Biology*, 1(2): p 61-65, 2010.