

APROVECHAMIENTO DE LA PASTA DE *JATROPHA* PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS DE HONGOS FILAMENTOSOS ENDÓGENOS

Luz Adriana Ruiz Flores^a, Guillermo Flores Cosío^a, M. Ángeles Camacho Ruiz^a, Lorena Amaya Delgado^a, Rafael Jiménez Ocampo^b, Jorge A. Rodríguez González^{a*}

^a 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

^b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Durango-Mezquital Km. 4.5, Domicilio, Durango, Durango, 34170, MÉXICO.

Resumen

En este trabajo se llevó a cabo el aislamiento e identificación morfológica de 9 cepas de hongos filamentosos endógenos de la pasta de *Jatropha curcas* (variedades tóxica y no tóxica); los cuales, fueron cultivados individualmente por fermentación en medio sólido (FMS) en pasta de *Jatropha* tóxica, con la finalidad de evaluar su potencial de síntesis de lipasas. Ensayos zimográficos realizados revelaron la capacidad de síntesis de carboxil éster hidrolasas de todas las cepas cultivadas en este sistema, observándose al menos dos bandas de actividad enzimática en cada extracto. La cuantificación de la actividad lipasa presente en los cultivos reveló que, en general, las cepas aisladas de la *Jatropha* tóxica mostraron mejor adaptación a este residuo, logrando las mayores producciones de dicha enzima. Destacando la actividad obtenida del fermento con la cepa JT2 (identificada molecularmente como *Aspergillus* sp.), que fue de 2 U/g de materia seca al emplear con *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) como sustrato. Los resultados obtenidos sugieren que los hongos aislados de la pasta de *Jatropha* tóxica pueden ser empleados para la producción de lipasas en la misma pasta, evidenciando que los hongos filamentosos endógenos de la variedad tóxica están adaptados a crecer y producir mayor actividad carboxil éster hidrolasa en este residuo.

Introducción

Jatropha curcas es una planta de la familia *Euphorbiaceae*. Se considera que es nativa de México y Centroamérica, donde su cultivo se extendió hacia África y Asia. La popularidad de esta planta va en ascenso debido al uso versátil de su cosecha, al empleo de tecnología simple y a la modesta inversión de capital que requiere [1]. La importancia industrial de *Jatropha curcas* reside en el contenido de aceite de sus semillas, convirtiéndola en fuente asequible de biodiesel, lo cual es una práctica ordinaria en países como India, Tailandia y países del sureste de Asia [2]. Como subproducto de este proceso se generan grandes cantidades de pasta residual. El contenido de nutrientes de la pasta, en especial su alto porcentaje de proteínas en el que los aminoácidos esenciales se encuentran en cantidades similares a los de la harina de soya (a excepción de la lisina) sugiere su empleo como proteína en la formulación de dietas para animales para propósitos de producción [3]. Sin embargo, estudios realizados sobre la harina de *J. curcas* reportan la presencia de componentes antinutricionales [4] y tóxicos [5] que limita su utilización como alimento para animales. Esto es un factor de sumo cuidado en la variedad tóxica, denominada así por la presencia significativa de ésteres de forbol en las semillas, los cuales están en niveles muy bajos o nulos en la variedad no tóxica [6]. Diversos esfuerzos se han realizado para detoxificar la pasta residual de *Jatropha curcas*; se incluyen métodos físicos, químicos, enzimáticos o la combinación de ellos [2,7-11] que han obtenido una remoción importante de los compuestos. Sin embargo, se ha constatado que un método por sí solo no es capaz de obtener las características deseadas en la harina de *J. curcas*. Empleos alternativos de la pasta son necesarios en vías de prevenir la acumulación y mal uso del residuo.

La producción de enzimas mediante FMS a partir de residuos agroindustriales es un enfoque que ha ganado auge en las últimas décadas. Debido al gran contenido de lípidos remanentes presente en la pasta de *Jatropha* (10-15%), ésta ha sido empleada con anterioridad para la inducción y producción de lipasas y estererasas por fermentación en medio sólido empleando hongos de la podredumbre blanca, hongos filamentosos y *Pseudomonas aeruginosa* [12-14] garantizando la disposición y efectividad de la pasta para la producción de lipasas y una concomitante reducción de los agentes antinutricionales y tóxicos. Las lipasas, clasificadas como carboxil éster hidrolasas (EC 3.1.1.3), son capaces de realizar reacciones de hidrólisis, interesterificación, esterificación, alcoholólisis, acidólisis, aminólisis, etc., con aplicaciones biotecnológicas diversas [15]. Dentro de éstas, podemos mencionar la síntesis de biopolímeros, biodiesel, agroquímicos, cosméticos, productos alimenticios y la producción de enantiómeros puros en la industria farmacéutica, entre otros compuestos de alto valor. Un novedoso aspecto de las lipasas es su aplicación en el manejo de residuos. Debido a que la expresión de estas enzimas es inducible por la presencia de lípidos, los residuos de carácter oleoso son medios de cultivo oportunos para microorganismos que producen lipasas. Por lo tanto, la pasta que resulta de la extracción del aceite de las semillas de *Jatropha curcas* puede utilizarse como inductora de lipasas de microorganismos por FMS. Los hongos filamentosos han sido reconocidos en la literatura como excelentes productores de lipasas. En este sentido, el aislamiento de hongos filamentosos endógenos de la pasta de *Jatropha*, y su utilización en la producción de lipasas empleando el residuo como sustrato por FMS ofrecen una excelente oportunidad para el aprovechamiento de la pasta. La Fermentación en Medio Sólido (FMS) se define como el cultivo de microorganismos sobre sólidos húmedos, ya sea en soportes inertes o en sustratos insolubles [2]. El desarrollo de bioprocesos de remediación y detoxificación biológica de residuos agroindustriales ha sido el foco central de atención de la investigación en FMS en los últimos años.

En el presente trabajo se estudió la presencia de hongos filamentosos endógenos de la pasta de *Jatropha curcas* de las variedades tóxica y no tóxica con el fin de obtener cepas afines a la composición del residuo tóxico y evaluar la capacidad de adaptación de las cepas mediante la medición de la actividad lipasa, inducidas por el residual de lípidos presente en la pasta. Para cada cepa se realizó una identificación microscópica, macroscópica y molecular para identificar el género y/o especie; se compara la producción de lipasas entre los hongos endógenos de las pastas tóxica y no tóxica. Mediante un zimograma nos percatamos de la inducción de estererasas/lipasas en cada una de las cepas utilizando como medio de cultivo la el residuo tóxico de *Jatropha*.

Metodología

Aislamiento y fermentación de las cepas por FMS. Se realizó una fermentación espontánea en un matraz Erlenmeyer de 1 L con 100 g de pasta de *J. curcas* con una humedad del 40%. La pasta se incubó a 37°C durante 5 días. Los hongos se aislaron mediante diluciones seriadas que se sembraron en cajas Petri con medio agar rosa de bengala-cloranfenicol a un pH de 7.2 y 37°C. Las colonias aisladas se resembraron en agar papa dextrosa (PDA).

Identificación de las cepas aisladas. Se identificó el posible género de las cepas conforme a su morfología macroscópica y microscópica. La identificación molecular de las especies de hongos se realizó mediante técnicas de biología molecular (PCR-RFLP). Se amplificaron las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal (ADNr) con los primers universales ITS1 e ITS4. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con enzimas de restricción (AluI, HinfI, HaeII, HpaII) y los patrones únicos de bandas para cada especie se compararon con la base de datos del CIATEJ. Las

regiones ITS fueron secuenciadas y comparadas mediante un alineamiento múltiple BLAST con las reportadas en las bases de datos del GenBank.

Ensayos de actividad enzimática. Para evaluar la producción de lipasas de cada cepa se preparó *Jatropha tóxica* en matraces de 125 mL con 15 g de materia seca y una humedad de 40%. Se inoculó con 3×10^7 esporas/g MS, y se cultivó a 40°C durante 48 h. La extracción de las lipasas se efectuó con buffer Tris 2.5 mM pH 7.5 con 0.5% de N-lauroilsarcosine (NLS). La medición de la actividad se realizó en microplaca empleando *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) como sustrato, a 35°C. La velocidad de hidrólisis del sustrato se monitoreó a 410 nm. Una unidad (U) se definió como un μ mol de *p*-nitrofenol liberado por minuto.

Zimogramas. Se preparó un gel de poliacrilamida en condiciones nativas para evaluar el perfil de producción de lipasas/esterasas, y se inyectaron en cada carril los distintos extractos enzimáticos obtenidos. Los geles se sumergieron en una solución de sustrato, *p*-Nitrofenil butirato (p-NPB) al 0.25%, conteniendo rojo de fenol al 0.01% a pH 7.2, hasta detectar la aparición de bandas coloreadas de amarillo, indicando la presencia de la enzima.

Resultados

De la pasta de *Jatropha tóxica* se lograron aislar 6 cepas fúngicas (Fig. 1). De acuerdo a la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas, la cepa JT6 se identificó como un posible *Rhizopus* sp. y el resto se identificaron como posibles *Aspergillus* sp. En lo que respecta a la pasta de *Jatropha* no tóxica sólo se aislaron 3 cepas fúngicas, de las cuales JNT1 y JNT3 se identificaron como posibles *Aspergillus* sp. y la cepa JNT2 como posible *Rhizopus* sp. Estas asignaciones de género que se establecieron por la morfología coincidieron con los resultados del BLAST que se hizo con las secuencias de la región ITS amplificadas. La excepción de coincidencia corresponde a la cepa JT6 de la cual no se pudo constatar el género por vía molecular debido a una aparente degradación del ADN. Los resultados del BLAST para cada cepa se agrupan en la Tabla 1 donde se puede observar que efectivamente la mayoría de las cepas pertenecen al género *Aspergillus*. Las especies que se postulan como candidatos para cada una de las cepas mostraron un 100% de identidad con la región ITS y 0% de brechas dentro de las secuencias analizadas. Los resultados que se obtuvieron por PCR-RFLP (datos no mostrados) no mostraron un resultado consistente con el BLAST de las regiones ITS secuenciadas, lo que podría deberse en gran parte a que la base de datos de CIATEJ en donde pudimos comparar los patrones de bandeo, no es lo suficiente robusta.

Tabla 1. BLAST de la secuencia de la región ITS de los hongos aislados con secuencias reportadas		
Hongo aislado	Posible especie	ID Secuencia
JT1	1. <i>Aspergillus varicolor</i> 2. <i>Emericella nidulans</i>	gb HQ674656.1 gb HQ674655.1
JT2, JT3, JT4 y JNT3	1. <i>Aspergillus oryzae</i> 2. <i>Aspergillus flavus</i> 3. <i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	gb KC466529.1 gb JX292092.1 gb KC964102.1
JT5 y JNT1	1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	gb JX501382.1
JNT2	1. <i>Rhizopus oryzae</i> 2. <i>Rhizopus arrhizus</i>	gb AY803931.1 gb AF543520.1

En la Figura 2 se muestra la actividad lipasa de cada cepa. Destaca la actividad obtenida del fermento con la cepa JT2 la cual es ligeramente superior a 2 U/g MS. De acuerdo a las posibles especies que podrían representar a las cepas aisladas, se observa que en el caso de las cepas JT2, JT3, JT4 que tuvieron una convergencia en posibles especies, pero debido a que tuvieron diferentes producciones de actividad enzimática y aspectos morfológicos, podrían tratarse de especies distintas entre sí y a que su aislamiento se realizó de la variedad tóxica de *Jatropha*, sin embargo debido a que los patrones zimográficos de actividad son muy similares, se sugiere que podría tratarse de la misma especie o especies muy cercanas entre sí. De forma interesante, se aprecia una diferencia en actividad enzimática en las cepas JT5 y JNT1 que se identificaron como *Aspergillus fumigatus* y muestran un patrón de bandeado en zimograma muy similar, por lo que esto podría corroborar el resultado de identificación molecular a pesar que fueron aisladas de diferentes pastas; cabe señalar que *A. fumigatus* es un patógeno muy presente en diversos residuos agro-industriales por lo que su capacidad de crecimiento en ambas pastas era de esperarse.

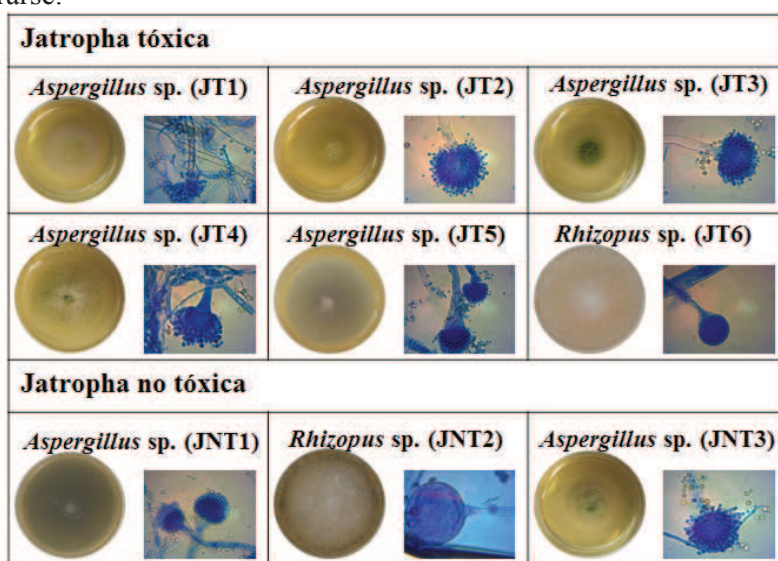


Figura 1.- Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de las pastas de *Jatropha* tóxica (JT) y no tóxica (JNT).

De forma general, las cepas aisladas del residuo tóxico presentan mayor actividad en el sustrato de partida aunque la diferencia entre sus actividades fluctúa significativamente. Sin embargo, al cultivar las cepas aisladas en la pasta de *Jatropha* tóxica, la producción de actividad enzimática fue en general más baja para las cepas aisladas de *Jatropha* no tóxica en comparación con aquellas aisladas del residuo de la variedad tóxica. Esto lleva a la suposición de que el lugar de aislamiento influye en el crecimiento y la capacidad de producción de las enzimas de las cepas, ya que la única diferencia relevante entre las variedades tóxica y no tóxica de *Jatropha* es la presencia de ésteres de forbol. Finalmente, la capacidad de sintetizar más de dos enzimas (lipasas/esterasas) por parte de cada una de las especies aisladas confirma que el residuo de *Jatropha* puede ser aprovechado por diversos hongos filamentosos como soporte/sustrato para la producción de éstas valiosas enzimas, a pesar de su carácter tóxico.

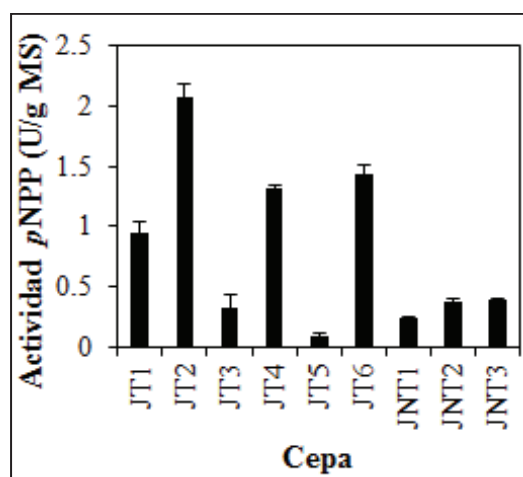


Figura 2.- Actividad lipasa/esterasa presente en los fermentos sólidos de hongos filamentosos, cultivados en *Jatropha tóxica*.

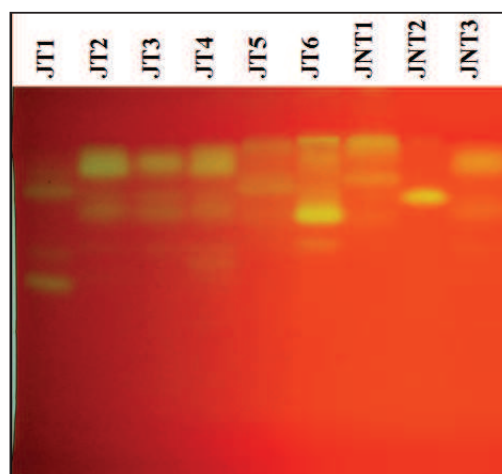


Figura 3.- Zimograma de los extractos enzimáticos revelado con pNPB como sustrato para la reacción.

Conclusiones

A partir de las pastas de *Jatropha tóxica* y no tóxica se aislaron 9 hongos filamentosos, todos con la capacidad de producir lipasas/esterasas sobre el residuo tóxico. Acorde a los resultados, la cepa con mayor producción de actividad lipasa fue JT2 (*Aspergillus* sp.), aislada del residuo tóxico, con aproximadamente 2 U/g MS. Su producción de lipasas y su crecimiento en el residuo tóxico refleja su capacidad de adaptación. A partir de esta evaluación, ésta cepa se convierte en un candidato para futuras fermentaciones donde la meta es la producción de lipasas que permitan aprovechar aún más la naturaleza física y química del residuo para dirigir la síntesis de moléculas de alto valor agregado.

En consecuencia, la pasta de *Jatropha curcas* puede emplearse para la producción de estas enzimas de gran interés industrial, añadiendo al ciclo del cultivo un valor extra que es necesario para sostener su importancia comercial como recurso para la producción de biodiesel.

Agradecimientos

L. Ruiz, G. Flores y A. Camacho agradecen el financiamiento de beca doctoral otorgado por el CONACyT. Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el fondo sectorial SAGARPA-CONACyT a través del proyecto 2011-7-163621.

Referencias

- Francis, G.; Edinger, R.; Becker, K., "A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socioeconomic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations". *Natural Resources Forum*, Vol. 29, No. 1, p. 12-24. 2005
- Saetae, D.; Suntornsuk, W., "Antifungal Activities of Ethanolic Extract from *Jatropha curcas* Seed Cake". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 20, No. 2, p. 319-324. 2010
- Aderibigbe, A. O.; Johnson, C.; Makkar, H. P. S.; Becker, K.; Foidl, N., "Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal", *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 67, No. 2-3, p. 223-243. 1997.
- Makkar, H. P. S.; Becker, K.; Schmook, B., "Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds", *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 52, No. 1, p. 31-36. 1998.

5. Ahmed, W. S., J., "Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil", *European Journal of Scientific Research*, Vol. 31, No. 3, p. 429-436. 2009.
6. He, W.; King, A.J.; Khan, M.A.; Cuevas, J.A.; Ramiaramanana, D.; Graham, I.A.; "Analysis of seed phorbol-ester and curcun content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* from Madagascar and Mexico", *Plant Physiol. Biochem.*, Vol. 49, No. 10, p. 1183-1190. 2011
7. Makkar, H. P. S.; Aderibigbe, A. O.; Becker, K., "Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors", *Food Chemistry*, Vol. 62, No. 2, p. 207-215. 1998
8. Makkar, H.; Maes, J.; De Greyt, W.; Becker, K., "Removal and Degradation of Phorbol Esters during Pre-treatment and Transesterification of *Jatropha curcas* Oil", *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 86, No. 2, p. 173-181. 2009
9. Martinez-Herrera, J.; Siddhuraju, P.; Francis, G.; Davila-Ortiz, G.; Becker, K., "Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico". *Food Chemistry*, Vol. 96, No. 1, p. 80-89. 2006
10. Aregheore, E. M. B., K.; Makkar, H.P.S., "Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats", *S. Pac. J. Nat. Sci.*, Vol. 21, p. 50-56. 2003
11. Rakshit, K. D.; Darukeshwara, J.; Raj, K. R.; Narasimhamurthy, K.; Saibaba, P.; Bhagya, S., "Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats", *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46, No. 12, p. 3621-3625. 2008
12. Joshi, C.; Mathur, P.; Khare, S. K., "Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake", *Bioresource Technology*, Vol. 102, No. 7, p. 4815-4819. 2008
13. de Barros, C. R. M. F., L. M. M.; et al.; "The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake", *Engineering in Life Sciences*, Vol.11, No. 1, p. 107-110. 2011
14. Veerabhadrapa, M. B.; Shivakumar, S. B.; Devappa, S., "Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake por optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 117, No. 2, p. 208-214. 2014
15. Jaeger, K. E., & Eggert, T., "Lipases for biotechnology", *Current opinion in biotechnology*, Vol. 13, No. 4, p. 390-397. 2002.