

DESTOXIFICACIÓN DE OCRATOXINA A MEDIANTE ENZIMAS BACTERIANAS

A. Sánchez-Arroyo^{1,*}, L. Plaza-Vinuesa¹, J. M. Mancheño², J. M. Silván³, A. J. Martínez-Rodríguez³, B. de las Rivas¹, R. Muñoz¹

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC, C/ José Antonio Novais 6, 28040 Madrid

² Instituto de Química Física Blas Cabrera (IQFR), CSIC, C/ Serrano 119, 28006 Madrid

³ Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, C/ Nicolás Cabrera 9, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid

*ana.sanchez@ictan.csic.es

INTRODUCCIÓN

La ocratoxina A (OTA) se encuentra entre las micotoxinas más importantes por su alta prevalencia y toxicidad [1]. Para garantizar la seguridad alimentaria, es necesario reducir la presencia de esta micotoxina a valores tan bajos como sea tecnológicamente posible. La disminución de OTA se puede abordar desde diferentes enfoques, habiéndose descrito para ello métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos biológicos, basados en el uso de microorganismos y/o enzimas, representan la estrategia más prometedora debido a su mayor especificidad, a su posible aplicación en condiciones suaves y a que resultan respetuosos con el medio ambiente [2].

El principal mecanismo de transformación de OTA descrito en bacterias es la hidrólisis de su enlace amida, dando lugar a ocratoxina α y L- β -fenilalanina, ambos compuestos no tóxicos (Figura 1) [2]. Hasta la fecha, las enzimas descritas con esta capacidad se han anotado como carboxipeptidasas o amidohidrolasas. Las carboxipeptidasas descritas han demostrado tener baja eficacia. Sin embargo, se han descrito dos amidohidrolasas capaces de degradar OTA de forma eficaz, una enzima denominada ocratoxinasa de *Aspergillus niger* [3] y una N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *Alcaligenes faecalis* [4].

Este estudio tiene por objetivo la identificación de nuevas enzimas bacterianas eficaces en la degradación de OTA, tomando como punto de partida dos amidohidrolasas descritas con alta capacidad para degradar dicha micotoxina.

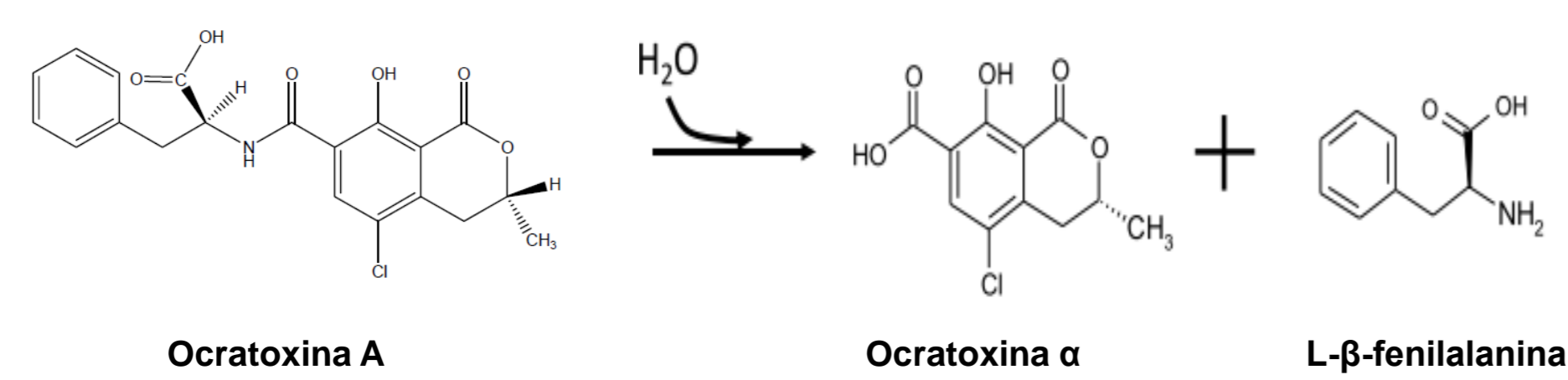
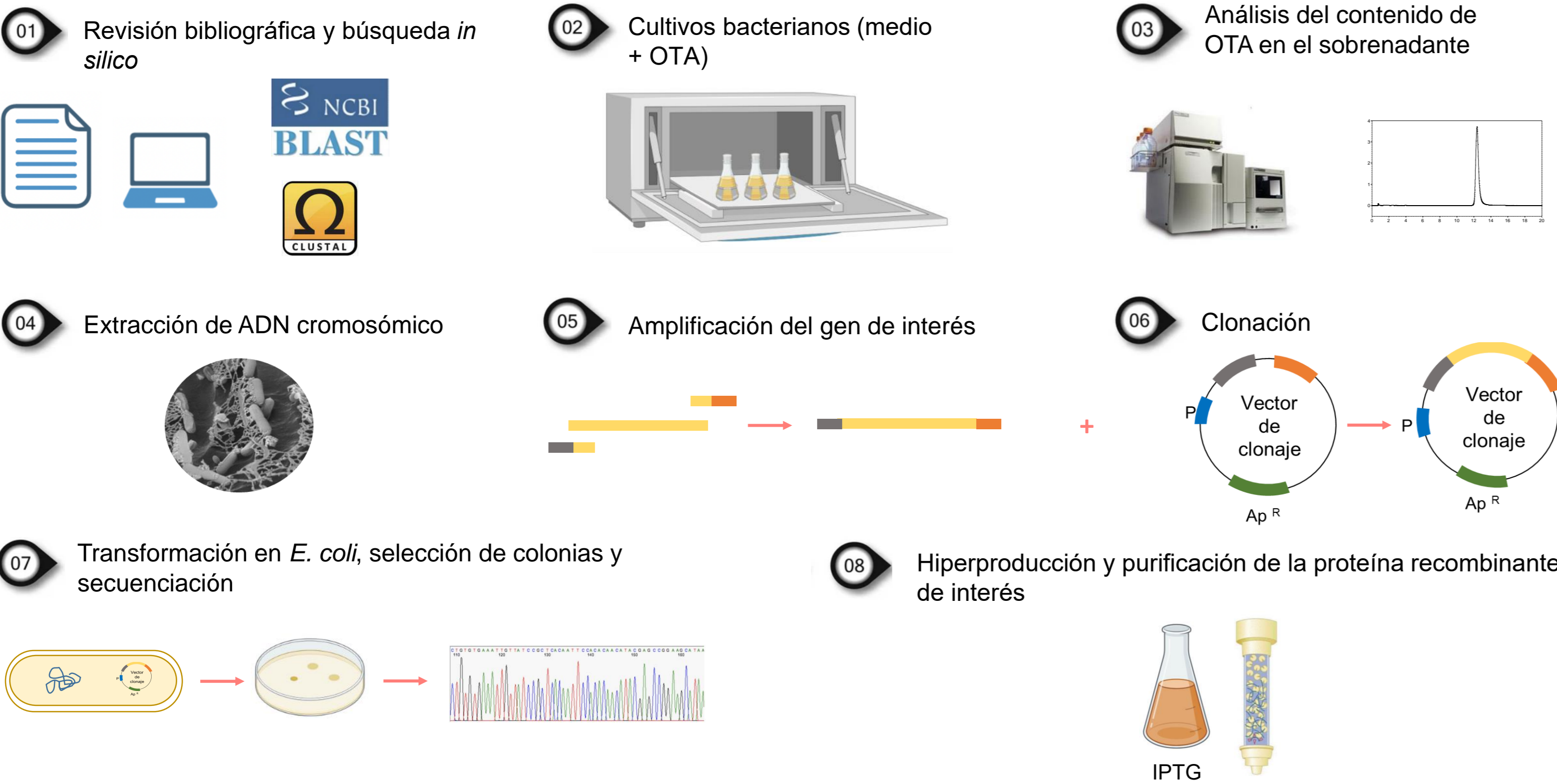


Figura 1. Destoxificación de ocratoxina A mediante la rotura del enlace amida.

MÉTODOS



RESULTADOS

La revisión bibliográfica permitió la identificación de dos enzimas degradadoras eficaces de OTA. Una estrategia común para identificar proteínas con una función similar a una proteína dada es la comparación del grado de similitud de sus secuencias. La búsqueda *in silico* condujo a la identificación de 8 proteínas pertenecientes a cepas tipo de bacterias disponibles comercialmente (Figura 2).

AFA	CNE	SN1	ANI	LCO	SAC	SN2	RWI	SDO	BLI	CNP	Proteína
100	39,68	39,49	12,21	15,12	15	15,94	16,67	13,62	13,25	15,41	AFA
	100	48,07	13,13	17,07	16,51	17,58	16,72	14,05	16,18	16,18	CNE
		100	13,35	16,06	16,92	16,56	17,43	13,68	13,59	15,53	SN1
			100	29,47	29,83	32,57	30,59	30,37	28,79	29,59	ANI
				100	73,71	73,89	39,72	40,37	37,46	32,51	LCO
					100	90,87	41,87	41,00	36,83	32,42	SAC
						100	41,91	40,17	33,58	31,42	SN2
							100	44,32	36,50	33,92	RWI
								100	36,83	33,17	SDO
									100	30,05	BLI
										100	CNP

Figura 2. Matriz de identidad entre las secuencias de la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* (AFA), la ocratoxinasa de *A. niger* (ANI), una amidohidrolasa de *Stenotrophomonas* sp. CW117 [5] (SAC) y las proteínas identificadas en este estudio. BLI (amidohidrolasa de *Brevibacterium linens*), CNE (amidohidrolasa de *Cupriavidus necator*), LCO (amidohidrolasa de *Lyso bacter concretiois*), RWI (amidohidrolasa de *Rhizorhizobium wittichii*), SN1 (amidohidrolasa 1 de *Stenotrophomonas nitritireducens*), SN2 (amidohidrolasa 2 de *S. nitritireducens*), SDO (proteína de *Sphingomonas dokdonensis*), CNP (peptidasa M38 de *C. necator*).

CONCLUSIONES

- La revisión bibliográfica y la búsqueda *in silico* condujo a la identificación de 8 proteínas candidatas para la degradación eficaz de OTA.
- Las proteínas identificadas se clasifican en dos familias de peptidasas de acuerdo a la base de datos MEROPS: familia M20D y familia M38.
- Las proteínas identificadas se clonaron e hiperprodujeron en *E. coli*. Tras su purificación, algunas de las proteínas identificadas mostraron actividad degradadora de OTA.

REFERENCIAS

[1] D. Klingelhoefer, M. Braun, N. Schoeffel, G. M. Oremek, D. Bruggmann, D. A. Groneberg (2020). *Food Control*, 114. doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107230

[2] S. Ndiaye, M. Zhang, M. Fall, N. M. Ayessou, Q. Zhang, P. Li (2022). *Toxins*, 14. doi.org/10.3390/toxins14110729

[3] D. Dobritzsch, H. Wang, G. Schneider, S. Yu (2014). *Biochemical Journal*, 462. doi.org/10.1042/BJ20140382

[4] H. Zhang, Y. Zhang, T. Yin, J. Wang, X. Zhang (2014). *Toxins*, 11. doi.org/10.3390/toxins11090518

[5] H. Luo, G. Wang, N. Chen, Z. Fang, Y. Xiao, M. Zhang, K. Gerelt, Y. Qian, R. Lai, Y. Zhou (2022). *Applied and Environmental Microbiology*, 88. doi.org/10.1128/AEM.01964-21

[6] S. N. Jamdar, V. N. Are, M. Navamani, S. Kumar, V. Nagar, R. D. Makde (2015). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 587. doi.org/10.1016/j.ab.2015.10.003

[7] D.F. Xiang, Y. Patskovsky, C. Xu, A.J. Meyer, J.M. Sauder, S.K. Burley, S.C. Almo, F.M. Raushel (2009). *Biochemistry*, 48. doi.org/10.1021/bi900111q

[8] D.F. Xiang, C. Xu, D. Kumaran, A.C. Brown, J.M. Sauder, S.K. Burley, S. Swaminathan, F.M. Raushel (2009). *Biochemistry*, 48. doi.org/10.1021/bi900453u

[9] A.L. Leitao, F.J. Enguita (2021). *Biomolecules*, 11. doi.org/10.3390/biom11071040

RESULTADOS

De acuerdo con el porcentaje de identidad de secuencia, se observan dos grupos de enzimas: aquellas con mayor similitud a la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* y aquellas con mayor similitud a la ocratoxinasa de *A. niger*. El estudio de las secuencias condujo a su clasificación dentro de dos familias según la base de datos MEROPS. Atendiendo a los dominios y residuos conservados, las proteínas con similitud a la enzima de *A. faecalis* pertenecen a la familia de peptidasas M20D y el segundo grupo, formado por las proteínas similares a la ocratoxinasa de *A. niger*, se incluye en la familia de peptidasas M38 (Figura 3 y 4). Como característica común, ambas familias engloban peptidasas de tipo co-catalítico que presentan dos iones metálicos (comúnmente zinc) por monómero de proteína.

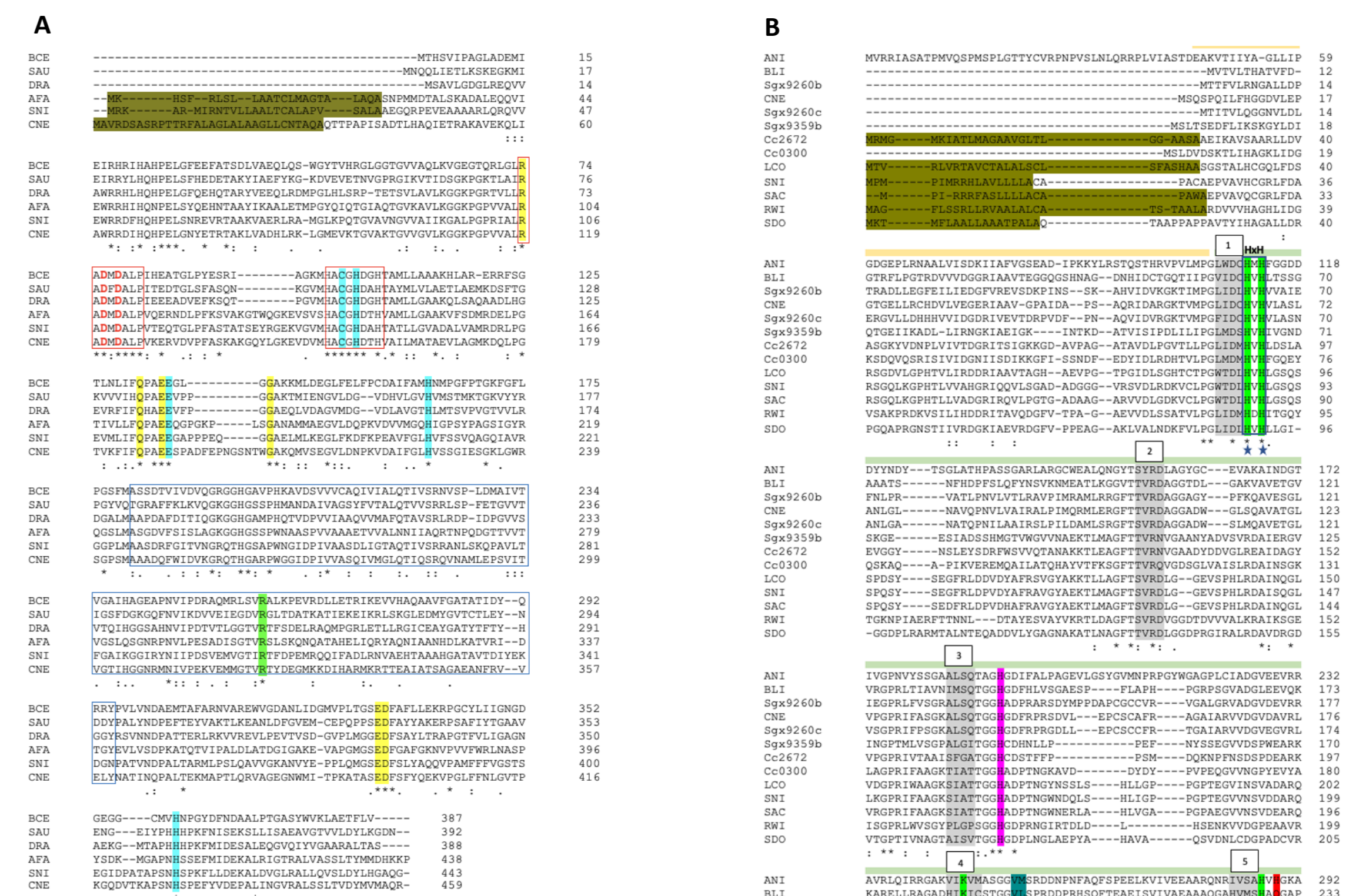


Figura 3. (A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas identificadas en este trabajo similares a la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis*. El nombre de cada secuencia corresponde a la primera letra del género y las dos primeras letras de la especie del microorganismo del que procede. Se incluyen las secuencias de proteínas conocidas clasificadas dentro de la familia M20D de *Burkholderia cepacia* (BCE), *Deinococcus radiodurans* (DRA) y *Staphylococcus aureus* (SAU). En verde oscuro se resaltan los residuos que forman el péptido señal. El dominio de oligomerización está marcado con un recuadro azul. Los recuadros rojos indican dominios conservados. Aparecen resaltados los residuos conservados de las proteínas de la subfamilia M20D. Los residuos de unión a iones metálicos están resaltados en azul, los otros residuos conservados están resaltados en amarillo [6].

(B) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas identificadas en este trabajo similares a la ocratoxinasa de *A. niger*. El nombre de cada secuencia corresponde a la primera letra del género y de la especie del microorganismo del que procede. Se incluyen las secuencias de proteínas conocidas de la misma familia de *Stenotrophomonas acidaminiphila* [5] (SAC) y las proteínas caracterizadas funcionalmente Sgx9260c, Sgx9260b, Sgx935b, Cc2672 y Cc0300 [7,8]. En verde oscuro se resaltan los residuos que forman el péptido señal. El barril β aparece indicado con una barra amarilla y el barril TIM ($(\alpha/\beta)_2$) con una barra verde. Los residuos que conforman las láminas β del barril TIM aparecen resaltados en gris. Los residuos que forman el centro catalítico aparecen resaltados en verde. Las estrellas indican los residuos de unión al metal α y los triángulos los residuos de unión al metal β (más expuesto al solvente). His-191 en ANI, que polariza el grupo carbonilo que va a ser hidrolizado, aparece resaltado en magenta. En amarillo aparecen resaltados todos los aminoácidos cuya participación en la unión al sustrato ha sido descrita [6][7][9].

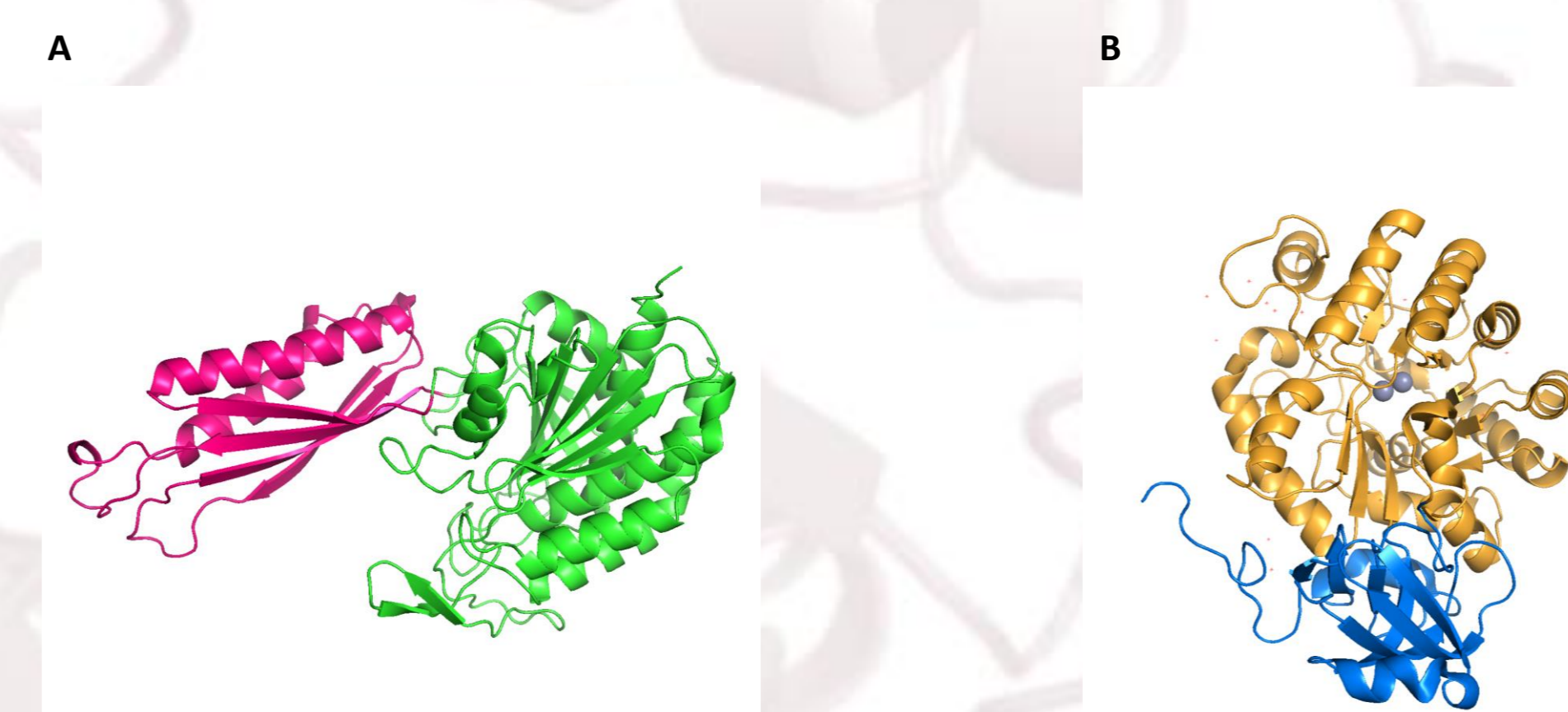


Figura 3. (A) Modelo 3D de una subunidad de la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* construido con el software SWISS-Model de ExPASy (https://swissmodel.expasy.org). En magenta se muestra el dominio de oligomerización que adopta un plegamiento (α/β) y en verde el dominio catalítico que adopta un plegamiento (α/β) sandwich. (B) Estructura 3D de una subunidad de la ocratoxinasa de *A. niger* (PDB: 4c5y). El barril β aparece representado en azul y en amarillo el barril TIM. Las esferas grises representan los dos iones metálicos [3]. Las figuras han sido obtenidas con el software PyMOL versión 2.5.0.

Se clonaron en *Escherichia coli* los genes que codifican las enzimas descritas en la literatura y las enzimas identificadas en este estudio. A continuación, las proteínas recombinantes se hiperprodujeron y purificaron. La incubación con OTA de las 8 proteínas candidatas demostró que algunas de ellas presentan capacidad de degradar la micotoxina eficientemente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación otorgada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y ERDF "Una manera de hacer Europa" a través de los proyectos PID-2021-123291OB-I00. A. Sánchez-Arroyo agradece al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a ESF "Invirtiendo en tu futuro" su contrato de investigación FPI PRE2018-083862.