



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

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.

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.



Ocratoxina A

L-B-fenilalanina Ocratoxina α

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

MÉTODOS





MTHSVIPAGLADEMI	15
MNQQLIETLKSKEGKMI	17
MSAVLGDGLREQVV	14
MKHSFRLSLLAATCLMAGTALAQASNPMMDTALSKADALEQQVI	44
MKKAK-MI KNTVLLAALTCALAPVSALAAEGQKPEVEAAAAKLQKQVV	4 / 60
INVEDORORETTERMINOLINAROLIUWINGRUNDUUT	00
	74
EIRRYLHOHPELSFHEDETAKYIAEFYKG-KDVEVETNVGPRGIKVTIDSGKPGKTLAIR	76
AWRRHLHQHPELGFQEHQTARYVEEQLRDMPGLHLSRP-TETSVLAVLKGGKPGRTVLL	73
EWRRHIHQNPELSYQEHNTAAYIKAALETMPGYQIQTGIAQTGVKAVLKGGKPGPVVAL <mark>R</mark>	104
EWRRDFHQHPELSNREVRTAAKVAERLRA-MGLKPQTGVAVNGVVAIIKGALPGPRIAL <mark>R</mark>	106
AWRRDIHQHPELGNYETRTAKLVADHLRK-LGMEVKTGVAKTGVVGVLKGGKPGPVVAL <mark>R</mark> *: :* :***. * *: :	119
ADMDALPIHEATGLPYESRIAGKMHACGHDGHTAMLLAAAKHLAR-ERRFSG	125
ADFDALPITEDTGLSFASQNKGVMHACGHDAHTAYMLVLAETLAEMKDSFTG	128
ADMDALPIEEEADVEFKSQTPGVMHACCHDGHTAMLLGAAKQLSAQAADLHG	125
ADMDALPVQERNDLPFKSVAKGTWQGKEVSVSHACGHDTHVAMLLGAAKVFSDMRDELPG	164
ADMDALPVTEQTGLPFASTATSEYRGEKVGVMHACGHDAHTATLLGVADALVAMRDRLPG	166
ADMDALFVKERVDVPFASKAKGQYLGKEVDVMHACGHDTHYAILMATAEVLAGMKDQLPG **:****: * .: : * .: : * .: : * .: : *	179
TINLIFOR FEGI	175
KVVVIHOPAEEVPPGGAKTMIENGVLDGVDHVLGVHVMSTMKTGKVYYR	177
EVRFIFQHAEEVFPGGAEQLVDAGVMDGVDLAVGTHLMTSVPVGTVVLR	174
TIVLLF <mark>Q</mark> PA <mark>EE</mark> QGPGKPLS <mark>G</mark> ANAMMAEGVLDQPKVDVVMGQ <mark>H</mark> IGPSYPAGSIGYR	219
EVMLIF <mark>Q</mark> PA <mark>EE</mark> GAPPPEQG <mark>G</mark> AELMLKEGLFKDFKPEAVFGL <mark>H</mark> VFSSVQAGQIAVR	221
TVKFIF <mark>Q</mark> PA <mark>EE</mark> SPADFEPNGSNTW <mark>G</mark> AKQMVSEGVLDNPKVDAIFGL <mark>H</mark> VSSGIESGKLGWR : .:.* *** *** **: :: *::. : * * .	239
	224
PGSYMRSSDIVIVDVQGRGGHGSSPHMANDATVAGSYFVTALOTVVSRRVSP-LDMATV1	234
DGALMAAPDAFDITIQGKGGHGAMPHQTVDPVVIAAQVVMAFQTAVSRLRDP-IDPGVVS	233
QGSLMASGDVFSISLAGKGGHGSSPWNAASPVVAAAETVVALNNIIAQRTNPQDGTTVVT	279
GGPLMAASDRFGITVNGRQTHGSAPWNGIDPIVAASDLIGTAQTIVSRRANLSKQPAVLT	281
SGPSMAAADQFWIDVKGRQTHGARPWGGIDPIVVASQIVMGLQTIQSRQVNAMLEPSVIT * :. :: *: *: *: : :: :: :: :: :: :: :: :: :	299
VGATHAGEAPNVIPDRAOMRLSVRALKPEVRDLLETRIKEVVHAOAAVFGATATIDYO	292
IGSFDGKGQFNVIKDVVEIEGDVRGLTDATKATIEKEIKRLSKGLEDMYGVTCTLEYN	294
VTQIHGGSAHNVIPDTVTLGGTV <mark>R</mark> TFSDELRAQMPGRLETLLRGICEAYGATYTFTYH	291
VGSLQSGNRPNVLPESADISGTV <mark>R</mark> SLSKQNQATAHELIQRYAQNIAANHDLKATVRID	337
FGAIKGGIRYNIIPDSVEMVGTI <mark>R</mark> TFDPEMRQQIFADLRNVAEHTAAAHGATAVTDIYEK	341
VGTIHGGNRMNIVPEKVEMMGTVETYDEGMKKDIHARMKRTTEAIATSAGAEANFRVV	357
RRYPVLVNDAEMTAFARNVAREWVGDANLIDGMVPLTGSEDFAFLLEKRPGCYLIIGNGD	352
DDYPALYNDPEFTEYVAKTLKEANLDFGVEM-CEPQPPS <mark>ED</mark> FAYYAKERPSAFIYTGAAV	353
GGYRSVNNDPATTERLRKVVREVLPEVTVSD-GVPLMGG <mark>ED</mark> FSAYLTRAPGTFVLIGAGN	350
TGYEVLVSDPKATQTVIPALDLATDGIGAKE-VAPGMGS <mark>ED</mark> FGAFGKNVPVVFWRLNASP	396
DGNPATVNDPALTARMLPSLQAVVGKANVYE-PPLQMGS <mark>ED</mark> FSLYAQQVPAMFFFVGSTS	400
ELYNATINQPALTEKMAPTLQRVAGEGNWMI-TPKATASEDFSFYQEKVPGLFFNLGVTP .: *	416
GECCCMUUNDCYDENDAAID#CACVUUVIAF#FIU 207	
ENGEIYPHHPKFNISEKSLISAEAVGTVVLDYLKGDN 392	
AEKGMTAPHHPKFMIDESALEOGVOIYVGAARALTAS 388	
YSDKMGAPNHSSEFMIDEKALRIGTRALVASSLTYMMDHKKP 438	
ECTODATA DENNE COVET DEVALOUCEDATE OVER DATE OVER DATE ACC-	
	<pre></pre>

60c	MVRKIASHIPMVQSPHSEDSITICVRPVSDAUgRREDVISIDEARVIIIIR-GDDIF	59 12
60c	MTTFVLRNGALLDP MSQSPQILFHGGDVLEP	14 17
	MTITVLQGGNVLDL	14
2	MRMGMKIATLMAGAAVGLTLGG-AASAAEIKAVSAARLLDV	40
)	MTVRLVRTAVCTALALSCLSFASHAASGSTALHCGOLFDS	19 40
	MPMPIMRRHLAVLLLLACAPACAEPVAVHCGRLFDA	36
	MPI-RRRFASLLLLACAPAWAEPVAVQCGRLFDA MAGFLSSRLLRVAALALCATS-TAALARDVVVHAGHLIDG	33 39
	MKTMFLAALLAAATPALAQTAAPPAPPAVTYIHAGALLDR	40
	GDGEPLRNAALVISDKIIAFVGSEAD-IPKKYLRSTQSTHRVPVLMPGLWDCHMHFGGDD GTRFLPGTRDVVVDGGRIAAVTEGGOGSHNAGDNHIDCTGOTIPGVDCHVULTSSG	118 70
60b	TRADLLEGFEILIEDGFVREVSDKPINSSKAHVIDVKGKTIMPGLIDI	70
60c	GTGELLRCHDVLVEGERIAAV-GPAIDAPSAQRIDARGKTVMPGLIDGUVHVLASL ERGVLLDHHHVVIDGDRIVEVTDRPVDFPNAQVIDVRGKTVMPGFIDGUVHVLASN	72 70
59b	QTGEIIKADL-LIRNGKIAEIGKINTKD-ATVISIPDLILIPGLMDSLVHIVGND	71
2 D	ASGKYVDNPLVIVTDGRITSIGKKGD-AVPAGATAVDLPGVTLLPGLIDMAVHLDSLA KSDQVQSRISIVIDGNIISDIKKGFI-SSNDFEDYIDLRDHTVLPGLMDM <mark>HVH</mark> FGQEY	97 76
	RSGDVLGPHTVLIRDDRIAAVTAGH-AEVPG-TPGIDLSGHTCTPGWTDIHVHLGSQS RSGOLKGPHTLVVAHGRIOOVLSGAD-ADGGG-VRSVDLRDKVCLPGWTDIHVHLGSOS	96 93
	RSGQLKGPHTLLVADGRIRQVLPGTG-ADAAGARVVDLGDKVCLPGWTDL	90
	VSAKPRDKVSILIHDDRITAVQDGFV-TPA-GAEVVDLSSATVLPGLIDMHDHITGQY PGQAPRGNSTIIVRDGKIAEVRDGFV-PPEAGAKLVALNDKFVLPGLIDI <mark>HVH</mark> LLGI-	95 96
	2	170
	AAATSNFHDPFSLQFYNSVKNMEATLKGGVTTVRDAGGTDLGAKVAVETGV	121
0b	FNLPRVATLPNVLVTLRAVPIMRAMLRRGFTTVRDAGGAGYPFKQAVESGL ANLGLNAVOPNVLVAIRALPIMORMLERGFTTVRDAGGADWGLSOAVATGL	121
0c	ANLGANATQPNILAAIRSLPILDAMLSRGFTSVRDAGGADWSLMQAVETGL	121
9D	SKGEESIADSSHMGTVWGVVNAEKTLMAGFTTVRNVGAANYADVSVRDAIERGV EVGGYNSLEYSDRFWSVVQTANAKKTLEAGFTTVRNVGAADYDDVGLREAIDAGY	125 152
	QSKAQA-PIKVEREMQAILATQHAYVTFKSGFTTVRQVGDSGLVAISLRDAINSGK	131
	SPQSYSEGFRLDPVDYAFRAVGYAEKTLMAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAISQGL	147
	SPQSYSEDFRLDPVDHAFRAVGYAEKTLMAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAINQGL TGKNPIAERFTTNNLDTAYESVAYVKRTLDAGFTSVRDVGGDTDVVVALKRATKSGE	144 152
	-GGDPLRARMTALNTEQADDVLYGAGNAKATLNAGFTTVRDLGGDPRGIRALRDAVDRGD : * *: *: . *: *	155
	L IVGPNVYSSGAALSQTAG <mark>I</mark> GDIFALPAGEVLGSYGVMNPRPGYWGAGPLCIADGVEEVRR	232
0ъ	VKGPRLTIAVNIMSQTGGHGDFHLVSGAESPFLAPHPGRPSGVADGLEEVQK IEGPRLFVSGRALSQTGGHADPRARSDYMPPDAPCGCCVRVGALGRVADGVDEVRR	173 177
0.0	VPGPRIFASGKALSQTGGGGGDFRPRSDVLEPCSCAFRAGAIARVVDGVDAVRL	176
9b	INGPTMLVSGPALGITGG <mark>H</mark> CDHNLLPPEFNYSSEGVVDSPWEARK	170
	VPGPRIVTAAISFGATGGACDSTFFPPSMDQKNPFNSDSPDEARK	197
	VDGPRIWAAGKSIATTGGHADPTNGYNSSLSHLLGPPGPTEGVINSVADARQ	202
	LKGPRIFAAGKSIATTGGHADPTNGWNDQLSHLIGPPGPTEGVVNSVDDARQ VRGPRIFAAGKSIATTGGHADPTNGWNERLAHLVGAPGPAEGVVNSVDEARQ	199
	ISGPRLWVSGYPLGPSGGHGDPRNGIRTDLDLHSENKVVDGPEAAVR VTGPTIVNAGTAISVTGGHGDPLNGLAEPYAHAVAQSVDNLCDGPADCVR : ** : :	199 205
	4 AVRLQIRRGAKVI <mark>K</mark> VMASGG <mark>VM</mark> SRDDNPNFAQFSPEELKVIVEEAARQNRIVSA <mark>H</mark> V <mark>H</mark> GKA	292
0.5	KARELLRAGADHIKICSTGGVISPRDDPRHSQFTEAEISVIVAEAAAQGAHVMSHAGAP	233
CD CD	AVREELQMAADQIRIMASGUASFIDFVGAEGISEDEIRAIVAEAEGAGIIVAAHAIFFA AVREELQKGASQI <mark>K</mark> IMASGG <mark>VA</mark> SPTDPIGNTQYSEDEIRAIVAEAEAAQTYVMA <mark>HAY</mark> TGR	236
0c 9b	AVREEIQKGATQIKIMASGGVASPTDPIANTQYSEDEIRAIVDEAEAANTYVMAHAYTGR MVRKNRKYGADLIKECATGGUNSRNTDVNAKOFTLEEMKAIVDEAHNHGMKVAANA	234
	AVRTLKKYGAQVI <mark>K</mark> ICATGG <mark>VE</mark> SRGNEPGQQQLTYEEMKAVVDEAHMAGIKVAA <mark>HA</mark> GAS	257
	AVRQRYRDGADGIRITVTGGVISVARSGQNPQFTQEEVDAVVSAARDYGMWVAVHA GAE AVRQRYRDGSDVI <mark>K</mark> ITATGG <mark>VI</mark> SYARSGDAPQFRVDEIQAIVDTAKDYGYHVAA HA GEE	240
	AVRORYKEGSDVIKITATGGVISYARSGDAPOFTVDEIKAIVDTAHDYGFRVAAHA GTE AVRORYKEGSDLIKITATGGVISYARSGDAPOFTVDEIKAVVDTARDYGFRVAAHA GTE	259
	IVREMHRDGVDLIKIMPSGG <mark>VL</mark> SIGDDPNVTLMSDAEIKAIVDTAHNLGMRVAA <mark>HA</mark> GQN	259
	ATRRQIGLGAQVIKITATGGVLSNVSGGLGRAFTPEEMKAIVDTAHNLGRKVAAHSAAE .* * **. :*** * *: .:* * * *	265
	6 GIMAAIKAGCKSLE <mark>N</mark> VSYADEEVWELMKEKGILYVATRSV <mark>I</mark> EIFLASNGEG-LVKESW	349
50b	GIKNAVRAGVRSIEHGIYLDDEAIDLMREHGTYLVPTLQAPQAVIKAADAGAG-LPASVV AIARAVRCGVRTIEHGNLIDEETARLVAEHGAVVVPTLVTVAALAS-ECERVC-LPAST	292
50 m	AITRAVRCGVRTIEHGNLVDRAAADEMRKHGAFAVPTLVTYDALAR-DGARLG-LPADSV	294
9b	GIKAAIKAGVDSVEHASFIDDETIDMAIKNNTVLSMIIFV <mark>S</mark> DY <mark>I</mark> LG-EGAKAGIR-EESL	288
)	GIREAVRAGVDTIENASLVDDEGIKLAVQKGAYFSMUIYNTDYTQA-EGKKNGVL-EDNL GMKRAIKAGVDSIENGTFMDLEAMDLMIENGTYYVPTISA <mark>G</mark> EF <mark>V</mark> AE-KSKIDNFFPEIVR	315 299
	GMRRAVEAGVTSIE <mark>H</mark> GTYMSDEVMALMKRKGTWYVP <mark>T</mark> VYA <mark>G</mark> RF <mark>V</mark> AD-KAKIDGYFPDVVR GMKRAVLGGVTSIE <mark>H</mark> GTYMDDEVMRLMKQHGTWYVP <mark>T</mark> FYA <mark>G</mark> RF <mark>V</mark> TD-KAAIDGYFPEVVR	321 318
	GMKRAVQAGVTSIEHGTYMDDEVMRLMKQHGTWYVPTFYAGRFVTE-KAAIDGYFPEVVR AIVRASALGVDSIEHGSEGDAEAYKVMKEHCTWI.VDTI.VADTUVKVAKADDEGIDBGGA	315
	The second secon	
	GTKAALTAGV DTIEH GSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL . * * ::**	323
	GTKAALTAGVDTIEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAV-AQARSGVLPAAVL . * ::** . 8 . 8 . 8 . 8 . 8 . 8 . 8 . 9 . 8 . 9 . 9 . 9 . 9 . 9 . 9 . 9 . 9 . 9 . 9	323 407 351
оь	GTKAALTAGVDTTEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAV-AQARSGVLPAAVL * * ::** A 8 ALQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTOTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DFARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVPHGQNLEEISILA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGAGLQSIEIMKRAGVKMGFGFDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA ALTETVRQAGRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEFEPIDA-EL-LCMLEATBCA	323 407 351 353 352
00b	GTKAALTAGVDTIEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAV-AQARSGVLPAAVL * * ::** A 8 ALQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGAGLQSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA ALIETVRQAGRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVASVQQKGRESLEIYANAGVKMGFGDDLLGEMHEFQSGEFRIRA-EU-LGNLEAIRSA AVASVQQKGRESLEIYANAGVKMGFGDDLLGEMHEFQSGEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA	323 407 351 353 352 350
00b 00c 90b	GTKAALTAGVDTIEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A 8 ALQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGACLQSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA ALTETVRQAGRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVASVQQKGRESLEIYANAGVKMGFGSDLLGEMHDHQAEEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRGAIITFGTDAGIFDHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS RDRDIGEL RENFRKALKAGVKMVYGTDAGIYPHGDNAKQFAVMV-RYGATPLQAIQSA	323 407 351 353 352 350 347 374
00b 90c	GTKAALTAGVDTIEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A ALQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGAGLQSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA ALIETVRQAGRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVASVQXGRESLEIYANAGVKMGFGSDLLGEMHEFQSGEFRIRA-EU-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRRGAIITFGTDAGIFDHGDNAKQFAYMV-EVGMTPLEAIQAS RIDRDIGEL RENFRKALKAGVKMYGTDAGIYPHGDNAKQFAVMV-RYGATPLQAIQSA PAASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGTDAGVQKHGTNWEEFVYLV-EAGVPAAVALOMA	323 407 351 353 352 350 347 374 358 380
00c 90	GTKAALTAGVDTIEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A ALQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGACLSSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA AKIETVRQAGRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVADVHGACLSSIEIMKRAGVKMGFGSDLLGEMHDHQAEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA AKIESVQQKCRESLEIYANAGVKMGFGSDLLGEMHEFQSGEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRRGAIITFGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS RDRDIGEL RENFRKALKAGVKMVYGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMPPLEAIQAS PAASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGTDAGVQKHGTNWKEFVYMV-ENGMPAMKAIQSA PAARIGELIQATAARAYKAGVKMAFGTDAGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAVALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAVALQAA	323 407 351 353 352 350 347 374 358 380 377 374
0b 0c 9b	GTKAALTAGVDTIELGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A 10ALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGACLOSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA AIETVRQACRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEEFRILA-EL-LGNLEAIRSA AVSVQXCRESLEIYANAGVKMGFGSDLLGEMHEFQSGEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRRGAIITFGTDAGIFDHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS RDRDIGEL RENFRKALKAGVKMYGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS RDRDIGEL RENFRKALKAGVKMYGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLQAIQSA PAASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGTDAGVQKHGTNWKEFVYMV-ENGMPAMKAIQSA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGTDAGVQCHGDNAREFVYMV-EAGIPAAVALQMA PAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFYYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFYYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFYMV-EAGIPAAYALQAA KALEVGPITLRNLGAAYKAGVKIAFGTDQGVAPHGTNGKEFALMV-AAGMPMETIRAA PAARAAAAMQDSHRRAYKAGVKAFFGTDSGVSKHGDNGQEFALLVEKVGMTPTEAIRSA * * * * *	323 407 351 353 352 350 347 374 358 380 377 374 378 383
0b 9b	GTKAALTAGVDTTEH GSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A LQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGACLOSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA AIETVRQACRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVASVQQKCRESLEIYANAGVKMGFGSDLLGEMHEFQSGEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRRGAIITFGTDAGIFDHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS R DRDIGEL RENFRKALKAGVKMYGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS R DRDIGEL RENFRKALKAGVKMYGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLQAIQSA PAASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGTDAGVQKHGTNWKEFVYMV-ENGMPAMKAIQSA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYLV-EAGYPAAVALQMA PAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYMV-EAGIPAAYALQAA R AARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYMV-EAGIPAAYALQAA KALEVGPITLNNLGAAYKAGVKAFFGTDSGVSKHGDNGQEFALLVEKVGMTPTEAIRSA * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	323 407 351 353 352 350 347 374 358 380 377 374 378 383 383 466
00c 90c	GTKAALTAGVDTTEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A IQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGT DTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA D'ARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGT DAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGACLQSIEIMKRAGVKMGFGT LLGEAQRLQSDEFIILA-DV-MSPAEVIASA AVADVHGACLQSIEIMKRAGVKMGFGS LLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVASVQQKCRESLEIYANAGVKMGFGS LLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRRGAIITFGT DAGIFDHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS RUDRDIGEL RENFFKALKAGVKMYGT DAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS RASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGT DAGVQKHGTNWKEFVYMV-ENGMPAMKAIQSA PAASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGT DAGVQHGDNAREFVYLV-EAGIPAAVALQMA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGWAPHGTNGKEFAIMV-AAGMPMETIRAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGWAPHGTNGKEFAIMV-AAGMPMETIRAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGVGPHGDNAREFVYLV-EAGIPAAYALQAA KALEVGPITLRNLGAAYKAGVKIAFGT QGWAPHGTNGKEFAIMV-AAGMPMETIRAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGWAPHGTNGKEFAIMV-AAGMPMETIRAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGWAPHGTNGKEFAIMV-AAGMPMETIRAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGWAPHGTNGKEFAIMV-AAGMPMETIRAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT QGWAPHGTNGKEFAIMV-AAGMPMETIRAA PAARIGALISOTAAKAYRNGVKIAFGT DGVSVKHGDNGZEFALLVEKVGMTPTEAIRSA * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	323 407 351 352 350 347 374 358 380 377 374 378 383 466 404 412
00b 90b 00b	GTKAALTAGVDTIELGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A 10ALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGACLOSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA A 1ETVRQACRDSLRIYADAGVPMGYGSDLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVASVQQKCRESLEIYANAGVKMGFGSDLLGEMHDHQAEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRGAIITFGTDAGITPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS R DRDIGEL RENFRKALKAGVKMYGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS PAASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGTDAGVQKHGTNWKEFVYMV-ENGMPAMKAIQSA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFYYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFYYMV-EAGIPAAYALQAA KALEVGPITLRNLGAAYKAGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFYYMV-EAGIPAAYALQAA KALEVGPITLRNLGAAYKAGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFYYMV-EAGIPAAYALQAA * * * :: :: : : : : : : : : : : : : : :	323 407 351 353 352 350 347 374 380 377 374 383 383 383 466 404 412 411
50b 99b 50c	GTKAALTAGVDTTEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A IQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGTDTAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA DARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGTDAGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG A VADVHGAGLQSIEIMKRAGVKMGFGTDLLGEAQRLQSDEFRILA-DV-MSPAEVIASA A IETVRQAGRDSLRIYADAGVPMGYGS DLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA A VASVQQKGRESLEIYANAGVKMGFGS DLLGEMHDHQAEEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA A VASVQQKGRESLEIYANAGVKMGFGS DLLGEMHDFQSGEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA A VASVQQKGRESLEIYANAGVKMGFGS DLLGEMHDFQAEGFRIRA-EL-LGNLEAIRSA N ERLVGKK RENFMNAHRRGAIITFGTDAGIFDHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS R DRDIGEL RENFRKALKAGVKMYGTDAGIYPHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLQAIQSA PAASVGPQISDTFKAYEKGVKIAFGTDAGVQKHGTNWKEFVYMV-EAGPAAVALQMA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYMV-EAGIPAAVALQMA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYMV-EAGIPAAVALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYMV-EAGIPAAVALQAA KALEVGPITLNNLGAAYKAGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFVYMV-EAGIPAAVALQAA KALEVGPITLNNLGAAYKAGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREFVXMV-AAGMPMETIRAA PAEAAAAAMQDSHRRAYKAGVKIAFGTDSGVSKHGDNGQEFALLVEKVGMTPTEAIRSA * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	323 407 351 353 352 350 347 378 380 377 374 388 380 377 374 466 404 401 401 409
50b 59b 50c	GTKAALTAGVDTTEHGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A IQALADSHLKAYQGAIKAGVTIALGT TAPGGPTALELQFAVERGGMTPLEAIKAA D'ARRVVDAHQESIARAHEAGVPIALGT AGVGPHGQNLEEISLLA-EVGLSTTEALAAG AVADVHGAGLQSIEIMKRAGVKMGFGS LLGEAQRLQSDEFRILA-EV-LGNLEAIRSA AVASVQQKCRESLEIYANAGVKMGFGS LLGEMHEFQSGEFRIRA-EL-LGNLEAIRSA AVASVQQKCRESLEIYANAGVKMGFGS LLGEMHEFQSGEFRIRA-EV-LGNLEAIRSA NERLVGKK RENFMNAHRRGAIITFGT AGIFDHGDNAKQFAYMV-EWGMTPLEAIQAS RDDDIGEL RENFFKALKAGVKMYGT AGIYPHGDNAKQFAYMV-ENGMPAKAIQSA PAASVGPQISDTFRKAYEKGVKIAFGT AGVQKHGTNWKEFVYMV-ENGMPAKAIQSA PAARIGELIQATAARAYKAGVKMAFGTDMGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGT QGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGT QGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGT QGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAYALQAA PAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGT QGVGPHGDNAREFIYMV-EAGIPAAYALQAA * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	323 407 351 353 352 350 374 378 380 377 378 383 378 383 378 383 378 383 378 466 404 412 401 409 401 429 401
50b 50b 50b	GTKAALTAGVDTTELGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::**	323 407 351 353 352 350 347 374 374 378 383 377 374 378 383 377 374 401 409 401 429 401 429 401 429 434 430
50b 50c 59b 2 50b 50c 59b 2 3 50b	GTKAALTAGVDTTELGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::**	323 407 351 353 352 350 347 374 374 378 383 377 374 378 383 377 374 404 404 404 401 409 401 429 401 429 401 434 430
60b 50c 59b 2 50b 50c 59b 2 2	GTKAALTAGVDTIELGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::** A ::*** A	323 407 351 353 352 350 347 374 358 380 377 374 378 383 377 374 378 383 466 404 412 411 409 401 429 401 423 434 430 423 438
60ъ 59ъ 2 50ъ 60ъ 59ъ 2 5	GTKAALTAGVDTIELGSFIDDEAIAMFKKTGAYLVPTEIAPVARVAQARSGVLPAAVL * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	323 407 351 353 352 350 347 374 378 383 377 374 378 383 377 374 404 404 404 401 429 401 429 401 434 430 423 438
50b 50c 39b 2 50b 50c 39b 2 50c	GTKAALTAGVDTIERSFIDDEALAMFKKTGAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	323 407 351 353 352 350 347 374 378 383 374 378 383 374 401 401 401 401 401 429 401 429 401 429 401 430 434 430 438
50b 50c 59b 50b 50b 50b 50b 50b 50c 59b 50c 50c 50c 50c 50c 50c 50c 50c	GTKAALTAGVDTIERSFIDDEALAMFKKTGAYLVPTELAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * ::**	323 407 351 353 352 350 347 374 378 383 377 374 378 383 377 374 404 412 409 401 429 401 429 401 434 438 438
60b 60c 59b 2) 60b 60c 59b 2) 60b 60c 59b 2) 60b 60c 59b 2) 60c 59b 2) 50b 60c 59b 2) 50c 59b 2) 50c 59b 2) 50c 59b 50c 59b 50c 59b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50b 50c 50c 50c 50b 50c 50c 50b 50c 50c 50c 50b 50c 50c 50b 50c 50c 50b 50c 50c 50b 50c 50c 50c 50c 50c 50c 50c 50c	GTKAALTACVDTIE GSFIDDEAIAMEKKTCAYLVPTEIAPVAAVAQARSGVLPAAVL * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	323 407 351 353 352 350 347 374 378 383 377 374 378 383 377 374 378 383 466 404 412 411 409 401 429 401 423 438 438



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	SNI1	ANI	LCO	SAC	SNI2	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	17,58	16,72	14,05	16,18	CNE
		100	13,35	16,06	16,92	16,56	15,43	13,68	15,03	15,53	SNI1
			100	29,47	29,83	30,57	30,59	30,37	28,79	29,70	ANI
				100	73,71	73,89	39,72	40,37	37,66	32,51	LCO

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 Lysobacter concretionis), RWI (amidohidrolasa de Rhizorhabdus wittichii), SNI1 (amidohidrolasa 1 de Stenotrophomonas nitritireducens), SNI2 (amidohidrolasa 2 de S. nitritireducens), SDO (proteína de Sphingomonas dokdonensis), CNP (peptidasa M38 de C. necator).

IPTG

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].

los residuos que forman el péptido señal. El dominio de

radiodurans (DRA) y Staphylococcus aureus (SAU). En verde oscuro se

oligomerización está marcado con un recuadro azul. Los recuadros rojos

indican dominios conservados. Aparecen resaltados los residuos conservados

(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 $((\alpha/\beta)_8)$ 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 $\alpha\beta$ y en verde el dominio catalítico que adopta un plegamiento αβα sándwich. (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.

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. Klingelhöfer, M. Braun, N. Schöffel, G. M. Oremek, D. Brüggmann, 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-

[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.abb.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

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-100. 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.