

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Identificación y caracterización de enzimas bacterianas con capacidad para transformar ocratoxina A

Identification and characterization of bacterial enzymes capable of transforming ochratoxin A

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Sánchez Arroyo

DIRECTORAS

Dra. María del Rosario Muñoz Moreno
Dra. Blanca María de las Rivas González del Rey

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Identificación y caracterización de enzimas bacterianas con capacidad para transformar ocratoxina A

Identification and characterization of bacterial enzymes capable of transforming ochratoxin A

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Sánchez Arroyo

DIRECTORAS

Dra. María del Rosario Muñoz Moreno
Dra. Blanca María de las Rivas González del Rey

Madrid

Los estudios realizados en esta memoria han sido financiados por los proyectos de investigación AGL2017-84614-C2-2R y PID2021-123291OB-I00 concedidos por la Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIN/AEI/10.13039/501100011033/) y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional “Una manera de hacer Europa”. Además, Ana Sánchez Arroyo ha sido beneficiaria de un contrato de investigación FPI PRE2018-083862 financiado por la Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y por el Fondo Social Europeo “Invirtiendo en tu futuro”.

A todos mis seres queridos

AGRADECIMIENTOS

Estoy segura de que no hubiera llegado hasta aquí sin haber estado rodeada de las personas adecuadas. En primer lugar, quiero dar las gracias a las Dras. Rosario Muñoz y Blanca de las Rivas porque, si de algo podemos estar seguros es de que, de no haber confiado en mí, no estaría escribiendo estas líneas ahora mismo. Principalmente, gracias por vuestra cercanía y calidez humana y por estar siempre disponibles, porque los experimentos que no salen, la frustración y las preocupaciones siempre surgen, pero sin estos elementos todo hubiera resultado mucho más cuesta arriba.

Gracias al Dr. José Miguel Mancheño, por su colaboración, por su paciencia y por el tiempo dedicado a explicarlo todo de forma sencilla.

Thanks to Dr. Jared Lewis for hosting me in his lab, giving me the opportunity to learn new methodologies and new perspectives. Thanks to Amardeep, Payal, Caitlin and Paras for being always ready to help and for creating such a friendly atmosphere. Thanks to Prashant and Joe for including me in their volleyball Wednesdays. Finally, a special thanks to Christian and Prabir for teaching me everything they knew about protein engineering and ending up becoming good friends.

Gracias a las Dras. Antonella Costantini y Emilia García, por acogerme en vuestro laboratorio, por vuestra hospitalidad y por ofrecerme vuestro tiempo (sé que muy preciado) enseñándome nuevas técnicas.

Gracias a los demás componentes del grupo, a Pepe y M^a Victoria, aunque debido a las circunstancias no hayamos coincidido tanto tiempo, gracias por hacer más ameno el día a día y por estar constantemente dispuestos a echar una mano. Especial gracias a M^a Victoria, por suministrarnos chocolate en todas las fechas señaladas en el calendario, lo que sin duda ha contribuido sustancialmente a la felicidad de todos nosotros. A Laura, por haber sido en muchos modos mi mentora, por enseñarme todos los pequeños trucos del laboratorio, por la ayuda y por toda la comprensión que da el haber pasado por el mismo camino.

A Claudia, contigo tengo la sensación de que decir simplemente gracias por todo sería lo más indicado. Gracias por tu implicación y tu buen hacer, pero principalmente gracias por transmitirme tu optimismo, tu modo tranquilo de afrontar las cosas y tu buen humor, creo que eres consciente de que en muchas ocasiones es lo que me ha permitido mantenerme a flote en los días más largos.

Gracias a toda la gente del ICTAN, que de una forma u otra me ha acompañado durante este tiempo y ayudado siempre que lo he necesitado.

Especialmente, a Elena, Cristina, Sara, e Irene, por los buenos ratos que hemos compartido, por contar conmigo y tener una mano siempre tendida y, por supuesto, por todos vuestros ánimos, no sabéis cuánto han contribuido en mi día a día. A Irene, de nuevo, porque me alegro de que me haya tocado compartir esta experiencia contigo, creo que hemos sabido convertirnos en un gran apoyo mutuo.

Gracias al Dr. Alejandro Revuelto, oficialmente por ayudarme con las figuras del ChemDraw, extraoficialmente por representar a la perfección las veces necesarias la misma escena de Rocky para motivarme (“y lo aguantas mientras avanzas...”) (por supuesto, gracias también a Alejandro 1, participante esencial en todas las demás tonterías).

Siempre lo he tenido claro, pero, ahora especialmente, tengo la certeza de que soy una persona extraordinariamente afortunada y este pensamiento radica principalmente en tener a mi lado a todas las personas a las que todavía no he mencionado. Tengo la suerte de tener como amigos a personas a las que admiro, de las que te sorprenden y aprendes continuamente y que son una fuente de alegría cuando más lo necesitas. Mil gracias a todos, os quiero mucho.

A Mario, porque es un cliché, pero yo estoy plenamente convencida de que es el mejor hermano que te puede tocar, junto con papá y mamá nunca podré agradeceros toda vuestra generosidad. Y, fundamentalmente, esta tesis (y básicamente todo) ha sido posible gracias a mis padres, lo único que puedo decir es gracias por vuestro amor incondicional (del que algún día espero estar a la altura), este logro es tan mío como vuestro.

Para terminar (y rebajar un poco el sentimentalismo), gracias a Ron, por ser el perro más simpático del mundo (también es un cliché, pero estoy igual de convencida de ello) y por venir a buscarme asiduamente con su murciélago durante parte de la escritura de esta tesis, recordándome que hay muchas cosas importantes en la vida (como correr detrás de un perro y todos sus animales de peluche).

“El hombre es perecedero. Puede ser, mas perezcamos resistiendo, y si es la nada lo que nos está reservado, hagamos que esto sea una injusticia”

Étienne Pivert de Senancour / Miguel de Unamuno

ÍNDICE

Resumen	i
Summary	iii
Lista de abreviaturas.....	v

I. INTRODUCCIÓN.....1

1	Micotoxinas	2
2	Ocratoxina A	8
2.1	Estructura y propiedades fisicoquímicas	9
2.2	Toxicología.....	10
2.3	Legislación	11
2.4	Estrategias de control.....	14
2.4.1	Estrategias de prevención.....	15
2.4.2	Estrategias de destoxificación	18
2.4.2.1	Métodos físicos y químicos.....	19
2.4.2.2	Métodos biológicos.....	20

II. OBJETIVOS.....28

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....30

1	Microorganismos, plásmidos y oligonucleótidos	31
2	Medios y condiciones de cultivo	34
3	Análisis bioinformático	34
4	Técnicas de ADN	35
4.1	Extracción de ADN cromosómico.....	35
4.1.1	ADN bacteriano.....	35
4.1.2	ADN fúngico	36
4.2	Extracción de ADN plasmídico.....	37
4.2.1	Extracción rápida	37
4.2.2	Extracción de alta pureza	38
4.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	38
4.4	Electroforesis de ADN	39
4.5	Métodos de clonación	40
4.5.1	Método de clonación independiente de ligación	40
4.5.2	Método de clonación con enzimas de restricción	42
4.6	Secuenciación de ADN	43
4.7	Modificación genética de cepas bacterianas.....	43
4.7.1	Transformación genética de <i>Escherichia coli</i>	43
4.7.2	Conjugación triparental en <i>Brevibacterium linens</i> y <i>Cupriavidus necator</i>	44

5	Técnicas de proteínas	45
5.1	Obtención de extractos proteicos	45
5.2	Hiperproducción y purificación de proteínas recombinantes	46
5.3	Electroforesis de proteínas.....	47
6	Ensayos de actividad enzimática.....	47
6.1	Destoxificación de ocratoxina A.....	47
6.1.1	Destoxificación mediante cultivos bacterianos y extractos proteicos	47
6.1.2	Destoxificación mediante proteínas puras	49
6.1.3	Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	49
6.2	Caracterización enzimática.....	50
6.3	Transformación de ácido gentísico y ácido salicílico.....	53
6.3.1	Análisis mediante HPLC	53
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		55
1	Identificación <i>in silico</i> de enzimas y bacterias destoxificadoras de ocratoxina A ...	56
2	Producción de enzimas destoxificadoras de ocratoxina A	61
3	Caracterización de enzimas destoxificadoras de ocratoxina A.....	65
3.1	Enzimas pertenecientes a la familia M20 (M20D) de peptidasas.....	65
3.1.1	Efecto del pH	71
3.1.2	Efecto de la temperatura y estudio de la termoestabilidad.....	73
3.1.3	Efecto de aditivos	74
3.1.4	Especificidad de sustrato	76
3.1.5	Estudio <i>in silico</i> de alergenicidad	80
3.2	Enzimas pertenecientes a la familia M38 de peptidasas	82
3.2.1	Efecto del pH	89
3.2.2	Efecto de la temperatura y estudio de la termoestabilidad.....	91
3.2.3	Efecto de aditivos	93
3.2.4	Especificidad de sustrato	96
3.2.5	Estudio <i>in silico</i> de alergenicidad	101
3.3	Salicilato 1,2 dioxigenasa de <i>Pseudaminobacter salicylatoxidans</i>	102
4	Identificación de bacterias destoxificadoras de ocratoxina A	110
4.1	Género <i>Alcaligenes</i>	112
4.2	Género <i>Brevibacterium</i>	117
4.3	Género <i>Cupriavidus</i>	122
4.4	Género <i>Lysobacter</i>	131
4.5	Género <i>Sphingomonas</i>	137
4.6	Género <i>Rhizorhabdus</i>	141
4.7	Género <i>Stenotrophomonas</i>	144
V. CONCLUSIONES.....		153
VI. BIBLIOGRAFÍA.....		158

VII. ANEXOS	185
ANEXO I. Estructura química de los sustratos empleados en esta tesis	186
ANEXO II. Ensayo de actividad endopeptidasa sobre albúmina de suero bovino	189
ANEXO III. Características de las enzimas destoxicadoras de ocratoxina A analizadas en esta tesis	190
ANEXO IV. Alineamiento de secuencia de <i>CnOTasa</i> con proteínas de <i>Cupriavidus basilensis</i> Ö16 descritas previamente como degradadoras de ocratoxina A.....	191
ANEXO V. Alineamientos de secuencias para el diseño de oligonucleótidos degenerados	192
Género <i>Alcaligenes</i>	192
Género <i>Brevibacterium</i>	193
Género <i>Cupriavidus</i>	194
Género <i>Lysobacter</i>	195
Género <i>Sphingomonas</i>	196
Género <i>Rhizorhabdus</i>	197
Género <i>Stenotrophomonas (SnAH)</i>	198
Género <i>Stenotrophomonas (SnOTasa)</i>	199
ANEXO VI. Publicaciones derivadas de los resultados presentados en esta tesis.....	200

RESUMEN

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina de gran relevancia debido a su alta prevalencia y toxicidad. Esta toxina aparece frecuentemente en numerosas materias primas y productos alimentarios, pudiendo originarse tanto durante el cultivo como en el procesado y almacenamiento, por lo que se puede encontrar a lo largo de toda la cadena alimentaria. Por estos motivos, para garantizar la seguridad alimentaria, es necesario reducir su presencia a valores tan bajos como sea técnicamente posible. En los últimos años se han realizado numerosos estudios orientados a la búsqueda de métodos eficaces para la degradación de OTA. Se han descrito estrategias que implican métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos y químicos presentan importantes limitaciones, como efectos no deseados en la salud, disminución del valor nutricional del producto o alteraciones de sus características organolépticas. Por el contrario, los métodos biológicos representan la estrategia más prometedora, ya que permiten degradar OTA sin producir compuestos químicos tóxicos, son respetuosos con el medio ambiente y pueden preservar la calidad de los alimentos. En esta línea, se han descrito microorganismos capaces de reducir el contenido de OTA mediante dos mecanismos, un fenómeno de adsorción a sus paredes celulares y otro de transformación enzimática. Generalmente, la destoxificación de OTA se consigue mediante la hidrólisis de su enlace amida, originando así ocratoxina α y L- β -fenilalanina, siendo ambos compuestos no tóxicos. Existen estudios en los que se han descrito cepas bacterianas capaces de transformar OTA en los metabolitos mencionados. En la mayor parte de estas bacterias no se han identificado las proteínas implicadas en estas transformaciones y, en los casos en los que se han identificado, estas enzimas han sido clasificadas como carboxipeptidasas e hidrolasas.

Esta tesis se basa en que las enzimas bacterianas implicadas en la transformación de OTA, una vez identificadas pueden constituir una alternativa eficaz para la reducción del contenido de esta toxina en alimentos. De este modo, los objetivos de esta tesis son la identificación, hiperproducción y caracterización de enzimas bacterianas implicadas en la degradación de OTA, así como el estudio de la presencia de estas enzimas en las distintas especies de los géneros bacterianos en los que fueron identificadas. Entre las enzimas descritas en la literatura, dos de ellas destacan por su eficiencia en la degradación de esta micotoxina, una amidasa fúngica, la ocratoxinasa de *Aspergillus niger* UVK143, y una N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *Alcaligenes faecalis* DSM 16503^T. Una de las estrategias más comunes para identificar nuevas proteínas con una misma función es mediante la comparación del grado de similitud de sus secuencias. En este trabajo, se realizó un estudio *in silico* para identificar proteínas similares a las dos enzimas descritas que presentan alta actividad sobre OTA. De este modo, se

identificaron ocho nuevas enzimas pertenecientes a diversos géneros bacterianos con potencial capacidad para degradar OTA. Además, en el estudio se incluyó la enzima salicilato 1,2 dioxigenasa de *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986^T, identificada previamente como potencial transformadora de OTA, posiblemente mediante un mecanismo diferente a la hidrólisis del enlace amida.

Los genes que codifican las enzimas seleccionadas se clonaron en vectores de expresión, los cuales se transformaron en *Escherichia coli* y las proteínas recombinantes se hiperprodujeron y purificaron. Entre las proteínas identificadas, pertenecientes a las familias de peptidasas M20 (M20D) y M38 según la base de datos *MEROPS*, todas excepto una mostraron actividad degradadora de OTA. En el caso de las enzimas que mostraron dicha actividad, se realizó la caracterización de su pH y temperatura óptimos, termoestabilidad, efecto de diferentes aditivos sobre su actividad y su especificidad de sustrato. Por lo general, las enzimas mostraron actividad óptima a valores de pH neutros (6,5-7) y temperaturas elevadas (entre 45 y 55 °C), además, su actividad se redujo en presencia de compuestos inhibidores de metaloproteasas. Respecto a la especificidad de sustrato, las enzimas presentaron perfiles hidrolíticos heterogéneos, pese a la similitud de su centro catalítico.

Tras la identificación y caracterización de las proteínas, se estudió su presencia en diferentes especies de los géneros bacterianos en los que fueron identificadas. Para ello, se adquirieron cepas tipo y se analizó su capacidad de degradar OTA en medios de cultivo. Posteriormente, se realizó un estudio *in silico* de la presencia de los genes que codifican las enzimas de interés en cada uno de los genomas de las especies ensayadas, localizando dicho gen y la región cromosómica en la que se encuentra. Además, la presencia o ausencia del gen se confirmó mediante PCR. Los resultados obtenidos indican que en las especies ensayadas existe una asociación entre la presencia de la enzima caracterizada y el fenotipo de degradación de OTA que presenta la bacteria.

SUMMARY

Ochratoxin A (OTA) is one of the most important mycotoxins attending to its high prevalence and toxicity. This toxin is frequently found in numerous raw materials and food commodities. It can appear in the crop as well as during processing and storage, thus, it can be found throughout the food chain. For these reasons, to ensure food safety, it is necessary to reduce its presence to values as low as technologically possible. In recent years, numerous studies have been conducted in search of effective OTA detoxification methods. Strategies involving physical, chemical, and biological methods have been described. Physical and chemical methods have important drawbacks, such as potential adverse health effects, reduction of the food product nutritional value or alterations of its organoleptic properties. Conversely, biological methods arise as the most promising strategy, since they are more specific, are considered environmentally friendly and can preserve food quality. In this context, it has been described that microorganisms can reduce OTA content by two possible mechanisms: adsorption of the mycotoxin to their cell walls and/or enzymatic transformation. Generally, OTA detoxification is achieved through the hydrolysis of its amide bond, rendering non-toxic ochratoxin α and L- β -phenylalanine. Bacterial strains capable of transforming OTA into the aforementioned metabolites have been described. In most of these bacteria, the protein(s) involved in this transformation has not been identified and, in the cases in which it has been identified, these enzymes have been classified as carboxypeptidases or hydrolases.

This thesis is based on the fact that the bacterial enzymes involved in OTA transformation, once identified, can be an effective alternative for the reduction of the content of this toxin in food commodities. Thus, the objectives of this thesis are the identification, hyperproduction and characterization of bacterial enzymes involved in OTA degradation, as well as the study of the presence of these enzymes among different species of the bacterial genera in which they have been identified. Among the enzymes described in the literature, two of them stand out for their efficiency in OTA detoxification, a fungal amidase named ochratoxinase from *Aspergillus niger* UVK143, and an N-acyl-L-amino acid amidohydrolase from *Alcaligenes faecalis* DSM 16503^T. One of the most common strategies to identify new proteins with a shared function is by comparing the degree of similarity of their sequences. In this work, an *in silico* study was performed to identify proteins similar to the previously described enzymes. As a result, eight new enzymes belonging to different bacterial genera with potential capacity to degrade OTA were identified. In addition, an enzyme named salicylate 1,2 dioxygenase from *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986^T, previously identified as a potential OTA degrader, was included in the study; since it was

described that it could transform OTA by a mechanism different from the hydrolysis of its amide bond.

The genes encoding the selected enzymes were cloned in expression vectors in *Escherichia coli* and the recombinant proteins were hyperproduced and purified. Among the identified proteins, which belong to the M20 (M20D) and M38 peptidases families according to the *MEROPS* database, all but one showed OTA degrading activity. The enzymes displaying such activity were characterized in terms of their optimum pH and temperature, thermostability, effect of different additives on their activity and their substrate specificity. In general, the enzymes showed optimum activity at neutral pH values (6.5-7) and high temperatures (between 45 and 55 °C), and their activity was reduced in the presence of metalloprotease inhibitors. Regarding substrate specificity, the enzymes showed heterogeneous hydrolytic profiles, despite the similarity of their catalytic center.

After the identification and characterization of the proteins, their presence in different species among the bacterial genera in which they were identified was studied. For this purpose, type strains of different species of each genus were acquired and their capacity to degrade OTA in culture media was analyzed. Subsequently, an *in silico* study of the genes encoding the enzymes of interest in each of the genomes of the species tested was conducted. In each case, the gene encoding the enzyme of interest was located, as well as the chromosomal region in which it is found. In addition, the presence or absence of the gene was confirmed by PCR. The results obtained in the study indicate that in the species tested there is an association between the presence of the characterized enzyme and the OTA degrading phenotype of the bacterium.

LISTA DE ABREVIATURAS

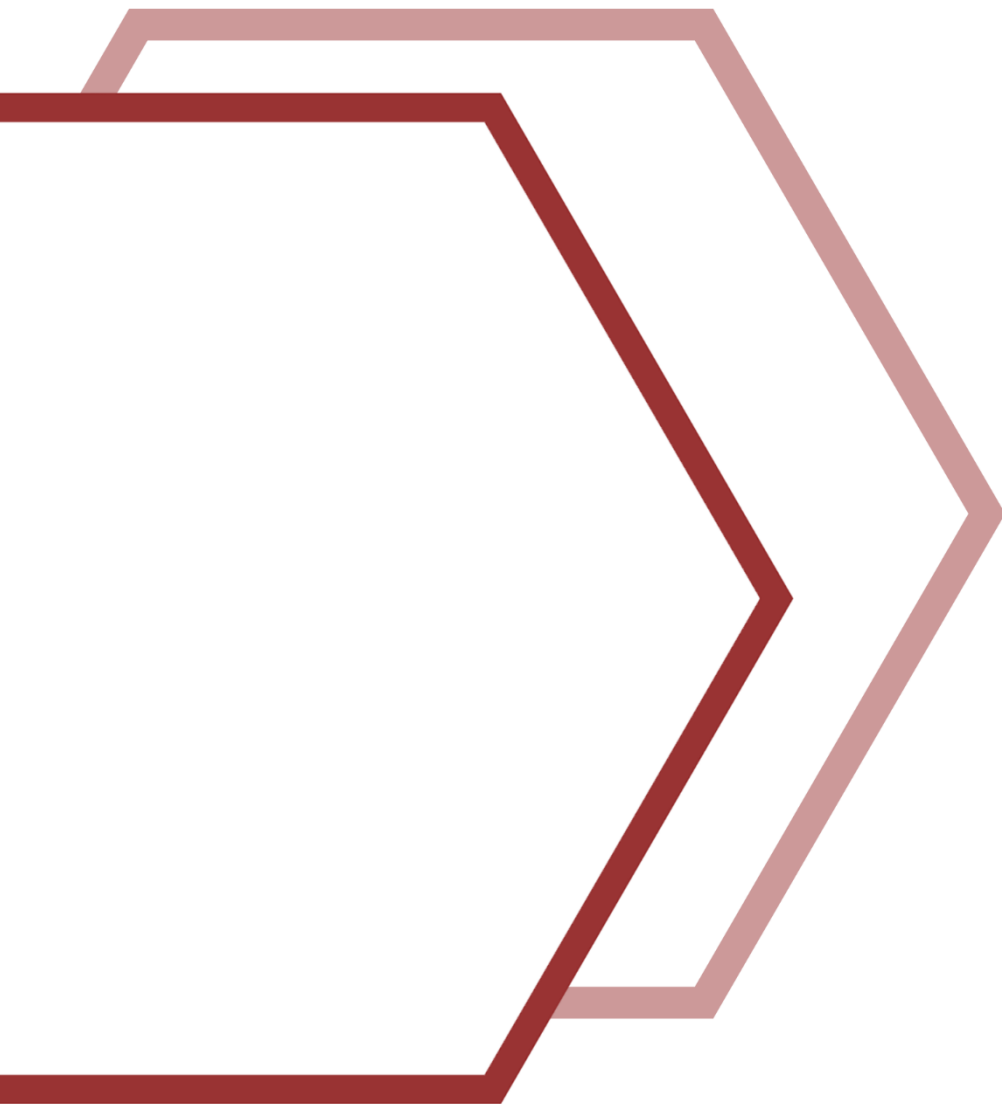
Además de las abreviaturas y unidades aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) (<https://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) (<http://old.iupac.org/publications/epub/index.html>), en esta tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

λ	Longitud de onda
4MF	N-(4-metoxifenilazoformil)-L-fenilalanina
aa	Aminoácido
A-	Sustratos derivados N-acetil
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Aflatoxina
Amp	Ampicilina
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
BCA	Agente de biocontrol (<i>BioControl Agent</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMB	Medio de cultivo <i>Bactomarine Broth</i>
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
BPAM	Buenas Prácticas de Almacenamiento y Manufactura
CAC	Comisión del Códex Alimentarius (<i>Codex Alimentarius Commission</i>)
CBS	Colección holandesa de cultivos de hongos y levaduras (<i>Westerdijk Fungal Biodiversity Institute</i>)
CCFAC	Comité del Códex de aditivos alimentarios y contaminantes (<i>Codex Committee on Food Additives and Contaminants</i>)
CE	Comisión Europea
Cm	Cloranfenicol
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DAD	Detector <i>diodo array</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
dNTP	Desoxinucleótido-5'-trifosfato
DO	Densidad Óptica
DSMZ	Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Agencia europea de seguridad alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
EMBL-EBI	Laboratorio europeo de biología molecular – Instituto europeo de bioinformática (<i>European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute</i>)

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FLD	Detector de fluorescencia
GRAS	Generalmente reconocido como seguro para la salud (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IARC	Agencia internacional de investigación sobre el cáncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
JECFA	Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>)
Km	Kanamicina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LPSN	Lista de nombres de procariontes con posición en la nomenclatura (<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>)
M1	Medio de cultivo 1 (DSMZ)
MES	Ácido 2-etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MR2A	Medio de cultivo R2A
MSR	Medio de cultivo S para <i>Rhizorhabdus</i> (DSMZ)
NCBI	Centro nacional para la información biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
Nh-Cd	Reactivo ninhidrina-cadmio
nt	Nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
OT α	Ocratoxina α
OTA	Ocratoxina A
OT β	Ocratoxina β
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
QPS	Presunción cualificada de seguridad (<i>Qualified Presumption of Safety</i>)
RASFF	Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (<i>Rapid Alert System Feed and Food</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico

sp.	Especie
subsp.	Subespecie
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
TES	Tris-EDTA-NaCl
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TSB	Medio de cultivo <i>Trypticase Soy Broth</i>
TSYE	Medio de cultivo <i>Tryptic Soy Yeast Extract</i>
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
Z-	Sustratos derivados N-carbobenciloxi

I. Introducción



1 Micotoxinas

Micotoxina deriva del griego *mykes*, que significa hongo, y del latín *toxicum*, que significa veneno (Goldblatt, 1972). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas especies de hongos filamentosos, pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* y *Alternaria* (Luo et al., 2021; Bhat et al., 2010). Por su parte, los metabolitos secundarios son aquellos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo del microorganismo, de forma que se producen en la etapa final del crecimiento exponencial y durante la fase estacionaria (Devi et al., 2020). Además, al no ser esenciales para el desarrollo del hongo, su producción depende en gran medida de las condiciones ambientales, especialmente en lo que se refiere a humedad y temperatura (Cervini et al., 2020; Selouane et al., 2009).

Las micotoxinas se consideran riesgos químicos de origen biológico, siendo uno de los principales peligros para la salud humana en términos de seguridad alimentaria a nivel mundial (Klingelhöfer et al., 2020). Estos compuestos ocasionan respuestas tóxicas en seres humanos y animales denominadas micotoxicosis. La vía más frecuente de exposición es la ingesta oral a través de alimentos contaminados, aunque también puede ocurrir por inhalación o absorción cutánea (Ráduly et al., 2020; Ostry et al., 2017). Las micotoxinas aparecen en numerosas materias primas y productos, pudiendo producirse tanto durante el cultivo como durante el procesado y el almacenamiento, por lo que se pueden encontrar a lo largo de toda la cadena alimentaria. La ingesta de micotoxinas se produce a través del consumo de productos de origen vegetal de forma mayoritaria. No obstante, la exposición a micotoxinas también se ha descrito asociada al consumo de productos derivados de animales que han consumido alimentos contaminados con ellas (Klingelhöfer et al., 2020).

Al tratarse de un contaminante natural, el ser humano ha estado expuesto a estas toxinas desde la antigüedad. Algunos investigadores concluyen que los hongos toxigénicos y, por ende, las micotoxinas, han acompañado a la humanidad desde el comienzo de la agricultura, cuando comenzó la domesticación de los cultivos y el almacenamiento de cosechas de una estación a otra. El almacenamiento de cereales supuso el inicio de la transición de una sociedad de cazadores y recolectores a una sociedad eminentemente agraria, al mismo tiempo que proporcionó un nuevo nicho ecológico para diversos hongos patógenos en los cultivos y en los alimentos almacenados, siendo muchos de estos hongos toxigénicos (Pitt & Miller, 2017). Desde entonces, se han hallado referencias a intoxicaciones por micotoxinas en diversos momentos históricos. Un ejemplo de ello son los brotes de ergotismo, también conocido como “Fuego de San Antonio” o *ignis sacer* (fuego sagrado), provocados por alcaloides ergóticos, micotoxinas producidas por hongos de la especie *Claviceps purpurea*.

Estos brotes se extendieron en Europa durante la Edad Media a raíz de la introducción del centeno (Peraica & Rašić, 2012; Richard, 2007). La frecuencia del ergotismo descendió debido a los avances en la agricultura y a la diversificación de la alimentación; no obstante, a lo largo de la historia han seguido apareciendo otras epidemias (Peraica & Rašić, 2012; Richard, 2007; Matossian, 1981). A lo largo del siglo XX, aunque con menor alcance y frecuencia, también se han descrito brotes de micotoxicosis en diversas partes del mundo como Estados Unidos, Japón, India o Etiopía (Agriopoulou et al., 2020; Pitt & Miller, 2017; Bezerra da Rocha et al., 2014).

El interés por el estudio de las micotoxinas y las enfermedades que originan surgió a mediados del siglo XX, con el descubrimiento de las aflatoxinas (FAO & PNUMA, 1982). En 1962, se realizó una investigación sobre una crisis veterinaria derivada de la muerte de más de 100.000 pavos en Inglaterra. Ésta demostró que las muertes habían sido provocadas por el consumo de pienso elaborado con harina de cacahuete contaminado con micotoxinas producidas por el hongo *Aspergillus flavus*, las cuales se denominaron aflatoxinas (Bennet & Klich, 2003; Asao et al., 1963). Desde entonces, se han seguido identificando nuevas micotoxinas producidas por diferentes géneros y especies fúngicas y, en la actualidad, se conocen más de 400 (Gurikar et al., 2023). Estas toxinas son un grupo de compuestos de gran diversidad química, por lo que su clasificación se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, entre los que destacan: el género fúngico productor (micotoxinas de *Claviceps*, *Fusarium*, *Aspergillus*, etc.), la fase de la cadena alimentaria en la que se originan (micotoxinas de precosecha o campo y de postcosecha o almacén), su estructura química (cumarinas, sesquiterpenos, etc.) o el órgano o sistema al que afectan principalmente (nefrotóxicas, neurotóxicas, hepatotóxicas, etc.) (Bennet & Klich, 2003). Las micotoxinas más importantes debido a sus implicaciones en seguridad alimentaria son las aflatoxinas, las ocratoxinas, los tricotecenos (toxina T-2 y HT-2, nivalenol y deoxinivalenol), la citrinina, la patulina, las fumonisinas, la zearalenona y los alcaloides ergóticos del cornezuelo del centeno (**Tabla 1**) (Ndiaye et al., 2022; Eskola et al., 2019).

Las micotoxicosis dan lugar a una gran diversidad de síntomas que suelen provocar un efecto multiorgánico y que dependen de factores como la especie afectada, el sexo, la edad o el estatus nutricional. En ocasiones, los síntomas se pueden confundir con síntomas similares de enfermedades comunes. Por ello, el establecimiento de una relación directa entre el consumo de una micotoxina y una sintomatología determinada no siempre es claro (Ráduly et al., 2020). Además, para establecer dicha correlación es preciso detectar la toxina en el alimento ingerido lo que, en ocasiones, no es posible (Roy et al., 2023; Bryden, 2007).

La exposición a micotoxinas puede ocurrir de dos modos: una exposición a altas concentraciones de estos compuestos, lo que da lugar a efectos agudos, o una exposición a concentraciones más bajas pero durante periodos de tiempo prolongados, lo que ocasiona efectos crónicos (Ráduly et al., 2020; Bryden, 2007; Bennet & Klich, 2003). Las intoxicaciones agudas se asocian con sintomatologías relacionadas con la función del hígado o del riñón, problemas gastrointestinales, hemorragias, ciertos problemas neurológicos e incluso la muerte (Ráduly et al., 2020; Pitt, 2000). Actualmente, las intoxicaciones agudas siguen causando problemas ocasionales en países en vías de desarrollo, debido a unas condiciones higiénicas y unos controles de seguridad alimentaria, por lo general, laxos, así como a una climatología más favorable para el desarrollo de hongos toxigénicos (Wagacha & Muthomi, 2008). No obstante, los efectos crónicos asociados al consumo de micotoxinas, tanto en animales como en seres humanos, son los más extendidos mundialmente (Ráduly et al., 2020).

La exposición crónica a micotoxinas está asociada con defectos en el crecimiento y desarrollo, inmunosupresión y efectos mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos. En relación con ese último aspecto, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha catalogado varias micotoxinas en función de su potencial carcinógeno. Dentro de las micotoxinas más relevantes, las aflatoxinas (AF), AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, se han incluido dentro del grupo 1, lo que significa que existen evidencias suficientes para afirmar que resultan carcinógenas en humanos. De hecho, AFB1 se considera el cancerígeno proveniente de una fuente natural más potente descrito hasta la fecha. La aflatoxina AFM1, la ocratoxina A (OTA) y las fumonisinas se clasifican en el grupo 2B, lo que indica que la evidencia de la relación de estos compuestos con la producción de cáncer es limitada en el ser humano, pero existen pruebas suficientes de carcinogenicidad en experimentación animal. Por su parte, las toxinas T-2, HT-2, deoxinivalenol, patulina, zearalenona y citrinina se incluyen en el grupo 3, lo que denota que las evidencias sobre su carcinogenicidad son limitadas o insuficientes en modelos animales (Agriopoulou et al., 2020; Eskola et al., 2019; Ostry et al., 2017; Marin et al., 2013). La **Tabla 1** muestra un resumen de los principales efectos tóxicos de las micotoxinas de mayor relevancia.

Según datos de la Organización para la agricultura y la alimentación de las Naciones Unidas (FAO), el 25% de los cultivos mundiales presenta algún tipo de contaminación por micotoxinas (Park et al., 1999). En un estudio más reciente, se estima que entre el 60 y el 80% de los cultivos mundiales presenta algún tipo de contaminación por este tipo de toxinas; además, se remarca que los datos sobre la prevalencia mundial de micotoxinas en los cultivos alimentarios dependen de numerosos factores, como los métodos analíticos utilizados e, incluso, la comunicación de los resultados (Eskola et al., 2019).

Tabla 1. Características de las principales micotoxinas ^a.

Micotoxina	Hongo productor	Fuentes principales	Efectos tóxicos principales	IARC ^b
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> sp.	Cereales, frutos secos, leche	Daño hepático agudo, inmunosupresión, efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos	1
Ocratoxinas	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Cereales, frutas, vino, cerveza, café, cacao, productos cárnicos	Nefrotoxicidad, inmunosupresión, efectos mutagénicos y teratogénicos	2B
Tricotecenos	<i>Fusarium</i> sp.	Cereales	Vómitos, diarrea, hemorragias, edemas, necrosis de tejidos cutáneos y alteración del sistema nervioso	3
Citrinina	<i>Penicillium</i> sp.	Cereales, frutas, vino, cerveza, café	Nefrotoxicidad e inmunosupresión	3
Patulina	<i>Penicillium</i> sp.	Frutas	Trastornos gastrointestinales y neurológicos, efecto mutagénico	3
Fumonisinias	<i>Fusarium</i> sp., <i>A. niger</i>	Cereales	Neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, afecciones pulmonares y cardíacas	2B
Zearalenona	<i>Fusarium</i> sp.	Cereales	Síndrome estrogénico y problemas reproductivos	3
Alcaloides ergóticos	<i>Claviceps</i> sp.	Cereales	Isquemia, cambios hormonales y pérdida de peso corporal	Sin clasificar

^a (Awuchi et al., 2022; Agriopoulou et al., 2020)

^b Grupo de carcinógeno según la IARC

Otros datos que reflejan la extensión del problema son los aportados por el Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (RASFF) de la Autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA). En su informe del año 2021, se afirma que la presencia de micotoxinas representa la tercera categoría de peligro más notificada, después de la presencia de residuos de pesticidas y de microorganismos patógenos (RASFF, 2022) (**Figura 1**). En lo que respecta a España, durante las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se analiza la presencia de micotoxinas en materias primas o productos alimentarios del mercado español. En ellos se refleja que, en términos generales, existe un elevado porcentaje de muestras contaminadas. Sin embargo, la concentración de micotoxinas hallada no suele exceder los límites establecidos por la legislación europea (Carballo et al., 2021; Tarazona et al., 2021; García-Díaz et al., 2020; Arroyo-Manzanares et al., 2019; Flores-Flores & González-Peñas, 2018).

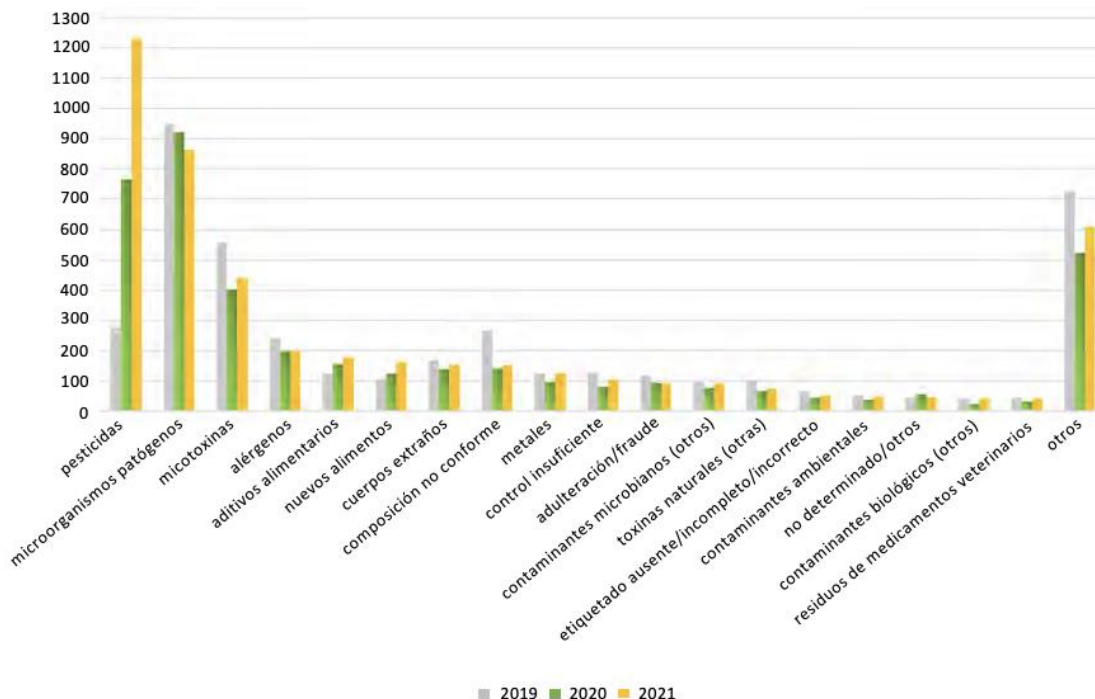


Figura 1. Notificaciones recibidas en RASFF (años 2019-2021) (Adaptado de RASFF, 2022).

Los datos señalados previamente están relacionados con la evaluación de la exposición externa a las micotoxinas, es decir, con el análisis de la presencia de las toxinas directamente en las matrices alimentarias. Sin embargo, la distribución de las micotoxinas en las matrices alimentarias no es homogénea, por lo que en ocasiones puede resultar difícil obtener datos precisos sobre su concentración real en el alimento. Por este motivo, se han comenzado a realizar análisis de la exposición interna, la cual hace referencia al estudio de biomarcadores adecuados (compuestos parentales o sus metabolitos) en fluidos biológicos o tejidos. Además, este tipo de análisis es un indicador más preciso de la exposición a micotoxinas, no sólo por vía oral sino también por vía dérmica e inhalatoria (Arce-López et al., 2020). En este contexto, en España, se han llevado a cabo dos estudios sobre población adulta e infantil en Navarra. En ellos se analizó la presencia de 19 micotoxinas en 79 personas de 2 a 16 años y en 468 personas de 19 a 68 años. Ambos análisis obtuvieron resultados similares, la micotoxina con mayor prevalencia fue OTA, detectándose su presencia en más del 95% de los individuos (Arce-López et al., 2020, 2021).

Otro aspecto destacable es que la contaminación por micotoxinas lleva asociado un gran impacto económico en el comercio doméstico e internacional. Entre los factores que influyen en las pérdidas económicas producidas por la contaminación con estos compuestos, el más evidente es la disminución en la productividad de los cultivos. Esta disminución se debe a que los alimentos con

niveles de micotoxinas por encima de lo permitido se deben descartar o vender a un precio más bajo para usos diferentes a la alimentación humana (IARC, 2012; Wu, 2008). También existen factores indirectos con un gran peso a nivel económico. Las micotoxicosis crónicas conducen a una disminución de la productividad ganadera, debido a una menor tasa de crecimiento de los animales, una mayor predisposición a infecciones secundarias por los efectos inmunosupresores de las micotoxinas y, en términos generales, una menor calidad del animal en el mercado (Ramos-Girona et al., 2020; IARC, 2012). Asimismo, hay que añadir los costes derivados de los problemas de salud humana y los costes derivados de la gestión de la prevención de estos compuestos (muestreo, análisis, investigación, etc.). De este modo, todos los agentes a lo largo de la cadena de suministro se ven afectados: agricultores, ganaderos, distribuidores, consumidores y la sociedad en su conjunto (Pitt & Miller, 2017).

En la evaluación de la problemática social y económica derivada de la contaminación por micotoxinas, también hay que considerar los efectos que el cambio climático pueda ejercer sobre ella (Kepińska-Pacelik & Biel, 2021). La contaminación de alimentos y piensos por hongos toxigénicos supone un problema creciente, ya que los extremos climáticos provocan un estrés permanente en los cultivos, volviéndoles más vulnerables a las infecciones (Marroquín-Cardona et al., 2014; Bhat et al., 2010). Asimismo, se pronostica que el cambio en las condiciones climáticas producirá alteraciones en los patrones de distribución geográfica de los hongos toxigénicos. De esta manera, regiones que hasta ahora no están afectadas por la presencia de ciertos hongos toxigénicos podrían pasar a estarlo y viceversa (Medina et al., 2017a; Battilani et al., 2016; van der Fels-Klerx et al., 2016). De hecho, ya se ha comenzado a observar este tipo de cambios en los patrones de distribución. Hasta el año 2004, la EFSA sólo contemplaba la contaminación con AFs en alimentos importados, por considerar que, dentro Europa, el porcentaje de contaminación por éstas era mínimo. Sin embargo, en el año 2007, la EFSA declaró problema emergente la posible contaminación por AFs en cultivos de maíz, pistachos y almendras procedentes de regiones del sur de Europa, derivadas del clima subtropical experimentado en los años anteriores (Ramos-Girona et al., 2020).

2 Ocratoxina A

La ocratoxina A (OTA) pertenece al grupo de las ocratoxinas y es la más perjudicial dentro de este conjunto de micotoxinas. De hecho, entre las más de 400 micotoxinas conocidas, la OTA está considerada como una de las más relevantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (Klingelhöfer et al., 2020). Esta micotoxina se describió por primera vez en 1965 por van der Merwe y colaboradores, quienes descubrieron la toxina al inocular muestras de maíz con el hongo *Aspergillus ochraceus* (van der Merwe et al., 1965). En 1969, van Walbeek y colaboradores aislaron ese mismo compuesto en especies de *Penicillium* (van Walbeek et al., 1969). Hasta la fecha, se ha descrito la producción de OTA por tres especies del género *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum* y *P. thymicola*) (Yang et al., 2022) y por algunas especies del género *Aspergillus*, entre las que destacan *A. ochraceus* (especie a la que debe su nombre) (van der Merwe et al., 1965), *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae* (Wang et al., 2022; Yang et al., 2022; Gil-Serna et al., 2020). De forma general, la presencia de OTA en localizaciones frías se asocia con su producción por parte de las especies de *Penicillium*, las cuales presentan una producción óptima a temperaturas de entre 10 y 20 °C. En cambio, la presencia de OTA en zonas más cálidas se asocia con su producción por especies del género *Aspergillus*. Por ejemplo, se ha descrito que *A. ochraceus* presenta una producción óptima de OTA a temperaturas de entre 20 y 30 °C (Magan, 2006; Pardo et al., 2006).

Se considera que la presencia de OTA está extendida a nivel mundial. No obstante, existen una serie de factores que influyen de forma directa tanto en la distribución de las distintas especies de hongos ocratoxigénicos como en la producción de la micotoxina por parte de estos. Aunque la temperatura y el agua disponible son los principales factores, el pH y la composición del medio también ejercen gran influencia (Kępińska-Pacelik & Biel, 2021). La OTA aparece en numerosos sustratos, encontrándose principalmente en cereales, higos, legumbres, café, cerveza, cacao, uvas, vino, frutos secos y especias (Wang et al., 2022; Malir et al., 2016). Por otro lado, al tener una vida media larga, puede acumularse en los tejidos de animales que han consumido piensos contaminados y, por lo tanto, también puede encontrarse en productos cárnicos; en particular, de animales no rumiantes, como es el caso de los cerdos. En el caso de los animales rumiantes, se ha descrito que la actividad hidrolítica de las bacterias del rumen hace que la transferencia de OTA a la carne y a la leche de estos animales se reduzca (Battacone et al., 2010; Mobashar et al., 2010). Asimismo, en la última década, varios estudios han descrito la presencia de OTA en quesos madurados (Anelli et al., 2019; Sakin et al., 2018; Decontardi et al., 2017; Dall'Asta et al., 2008). Debido a la baja transferencia de OTA a la leche de los rumiantes, es muy probable que la aparición de OTA en el queso se deba a la contaminación ambiental, que conduce al crecimiento de hongos en su superficie (Kure & Skaar,

2019). Aunque se ha descrito que los hongos que crecen comúnmente en la superficie de los quesos no son productores de OTA (Lund et al., 1995), el crecimiento incontrolado de mohos durante la maduración y el envejecimiento puede causar deterioro y posiblemente la producción de micotoxinas (Camardo-Leggieri et al., 2020). La Comisión Técnica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) de la EFSA realiza periódicamente una evaluación de la exposición a diferentes riesgos alimentarios. Con relación a OTA, emitieron su último informe en 2020, donde reflejan de forma detallada cuáles son los grupos de alimentos con mayor presencia de esta micotoxina (cereales y derivados, frutas desecadas, productos cárnicos y quesos) y qué grupos poblacionales en función de la edad se encuentran más expuestos a cada uno de ellos (EFSA, 2020).

2.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas

La OTA es un policétido cíclico formado por una dihidroisocumarina clorada (conocida como ocratoxina α) unida por un grupo carboxilo a través de un enlace amida a una L- β -fenilalanina (**Figura 2**). Su nomenclatura en la IUPAC es N-[(3R)-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil)carbonil]-L-fenilalanina (IARC, 1993).

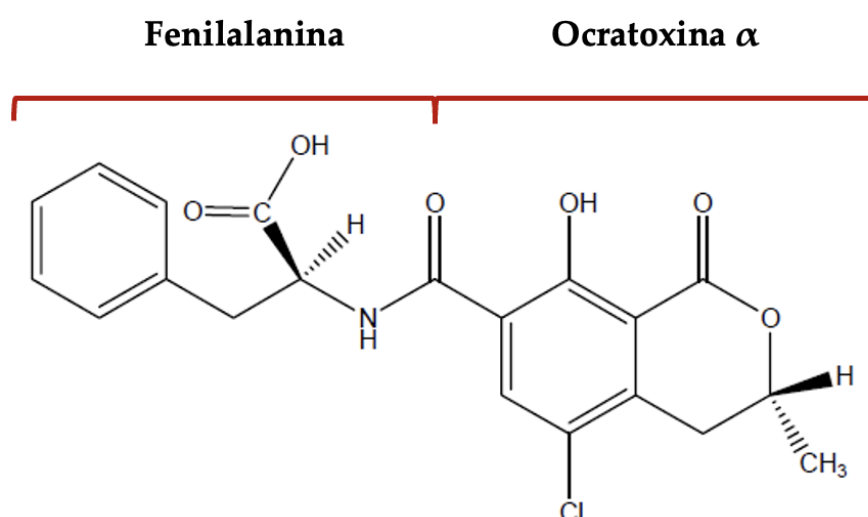


Figura 2. Estructura química de OTA.

La OTA es un compuesto sólido, cristalino, blanco e inodoro, con un punto de fusión de 169 °C y un peso molecular de 403,8 g/mol (Kószegi & Poór, 2016). Debido a su fracción isocumarínica, presenta una fuerte fluorescencia tras la absorción de luz ultravioleta (EFSA, 2020).

La OTA, al igual que otras micotoxinas, es una molécula altamente estable. Se ha demostrado que posee una gran resistencia frente a la acidez y frente a tratamientos a altas temperaturas (Boudra et al., 1995; Trivedi et al., 1992). Por ejemplo, no se ha observado degradación de OTA durante procesos de horneado de pan y masa de pizza (Bryła et al., 2021). De este modo, una vez que los alimentos están contaminados por la micotoxina, su completa eliminación constituye un problema.

Existen compuestos análogos a la OTA pertenecientes al grupo de las ocratoxinas, entre los cuales destacan: la ocratoxina B (OTB), derivado no clorado de la OTA que presenta una toxicidad significativamente menor, y la ocratoxina C (OTC), éster etílico de la OTA que se convierte posteriormente en OTA al ser ingerido (Mally et al., 2005; Steyn, 1995; Fuchs, et al., 1984). Existen además otras ocratoxinas formadas por los hongos productores de OTA en menor cantidad que son ésteres metílicos de OTA y OTB. Por otra parte, los ácidos dihidroisocumarínicos libres ocratoxina α (OT α) y ocratoxina β (OT β) son los compuestos derivados de la hidrólisis de OTA y OTB, respectivamente (Wu et al., 2011; Fuchs, et al., 1984). OT α es considerado no tóxico (Bruinink et al., 1998; Li et al., 1997), mientras que, en lo que respecta a OT β , no se han realizado estudios sobre su toxicidad; sin embargo, la similitud de su estructura con OT α sugiere que ambos metabolitos podrían presentar un comportamiento similar (Heussner & Bingle, 2015).

2.2 Toxicología

En la actualidad el riesgo de exposición a alimentos contaminados por OTA en altas concentraciones es relativamente bajo. Los síntomas originados por intoxicaciones agudas por exposición a OTA pueden presentar variaciones según la especie afectada. No obstante, generalmente incluyen hemorragias multifocales, aparición de trombos de fibrina en distintos órganos, necrosis hepática y nefrosis (EFSA, 2020; Albassam et al., 1987).

A pesar de tomarse medidas preventivas para mantener bajos los niveles de OTA, un bajo grado de contaminación en los alimentos es inevitable (Heussner & Bingle, 2015). La exposición a OTA, tanto en humanos como en animales, ocurre comúnmente a concentraciones bajas, pero durante largos periodos de tiempo, por lo que preocupan especialmente los efectos crónicos derivados de la exposición a esta micotoxina. En este contexto, se han realizado numerosos estudios para evaluar la toxicidad crónica de OTA. En 1993, la IARC clasificó a la OTA dentro del grupo de carcinógenos 2B, lo que indica que se trata de un carcinógeno potencial en humanos. Para realizar esta clasificación, la IARC se

apoyó en numerosas evidencias ampliamente probadas en estudios realizados con modelos animales (IARC, 1993).

Una vez ingerida, la OTA es una micotoxina de absorción y distribución relativamente rápidas, pero de eliminación y excreción lentas, por lo que tiende a acumularse en el organismo. Este comportamiento se debe, sobre todo, a su alto grado de unión a las proteínas plasmáticas, particularmente a la albúmina, y a su baja tasa de metabolismo. Dependiendo de la especie, la vida media plasmática oscila entre varios días en roedores y cerdos y entre varias semanas en humanos y otros primates (Wei et al., 2021).

Los ensayos toxicológicos apuntan al riñón como el principal órgano diana de los efectos adversos de OTA. En todas las especies de mamíferos estudiadas, la OTA induce nefrotoxicidad dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, con marcadas diferencias de sensibilidad según el sexo y la especie (EFSA, 2020). Además, los estudios toxicológicos también han revelado efectos inmunotóxicos, neurotóxicos y teratogénicos (EFSA, 2020).

Existen estudios que describen la participación de OTA en múltiples eventos moleculares. Sin embargo, hasta la fecha, los mecanismos responsables de su toxicidad no se han esclarecido por completo. La especial sensibilidad del riñón parece deberse, en gran medida, a la absorción de OTA que llevan a cabo los transportadores de aniones orgánicos del riñón. Con respecto a la carcinogenicidad, en estudios animales se ha propuesto la participación de OTA en la inducción de apoptosis y autofagia, la detención del ciclo celular, alteraciones en la respuesta de proliferación y señalización celulares, estrés oxidativo y cambios en la expresión génica (EFSA, 2020).

2.3 Legislación

La toxicidad causada por OTA comenzó a ser evidente a finales de la década de los 70. Sin embargo, no fue hasta los años 90 cuando se empezó a debatir sobre la necesidad de la implementación de normas para la regulación de la concentración de esta micotoxina en alimentos destinados al consumo humano y animal. En 1991, entre los 60 países que poseían legislación sobre micotoxinas, sólo 11 de ellos establecían límites para OTA (Malir et al., 2016). Sin embargo, en 2003 el número de países con regulación legal para OTA había aumentado hasta 37 (FAO, 2004). Desde entonces no se ha realizado ningún otro estudio a gran escala (Malir et al., 2016).

A nivel internacional, la comisión mixta FAO/OMS del *Códex Alimentarius* (CAC) es el organismo responsable de la discusión de los términos relacionados con las micotoxinas. Dentro de esta entidad, se encuentra el comité del *Códex* sobre aditivos alimentarios y contaminantes (CCFAC), que establece los niveles máximos (estándares) de aditivos y contaminantes aconsejados en los alimentos. Asimismo, el comité mixto de expertos en aditivos alimentarios (JECFA) es un comité científico internacional de expertos, encargado de llevar a cabo la evaluación del riesgo y/o la inocuidad de las micotoxinas y emitir documentos de asesoramiento al CAC que sirvan como base para la elaboración de medidas legislativas (López-García, 2010). De forma general, el JECFA aconseja que la presencia de contaminantes en los alimentos se debería reducir de forma que resulte “tan bajo como sea razonablemente posible”, conocido como nivel ALARA (*As Low As Reasonably Achievable*) (FAO, 2004).

En el plano europeo, la EFSA es la responsable del asesoramiento científico a los responsables de la toma de decisiones, la Comisión Europea (CE) (Sorbo et al., 2022). La CE inició en 1995 una acción coordinada con el fin de implantar una regulación comunitaria para la OTA, de tal forma que, en ese mismo año, se elaboró el primer estudio destinado a establecer el nivel de ingesta de OTA. La instauración de la primera legislación comunitaria para esta toxina en alimentos ocurrió en 2002 (CE, 2002). Esta regulación se enmendó en numerosas ocasiones debido al aumento de estudios sobre la incidencia y la toxicidad de OTA, restringiendo los límites permitidos y expandiendo la regulación a nuevos alimentos. Todas estas modificaciones dieron lugar a un nuevo reglamento en 2006 (CE, 2006a). Este reglamento ha experimentado modificaciones posteriores debido a los avances en el conocimiento de OTA y de su detección en matrices alimentarias no contempladas previamente por la ley. En la actualidad, el Reglamento (CE) nº 1881/2006 se ha derogado en favor del nuevo Reglamento (UE) 2023/915, que establece los límites permitidos basándose en todas las evidencias científicas generadas hasta la fecha. En la **Tabla 2** se muestra el contenido máximo permitido de OTA en diversas matrices alimentarias tal y como se recoge en el actual reglamento (CE, 2023). Asimismo, la CE también establece medidas normalizadas y específicas para el muestreo y el análisis de micotoxinas reguladas en diversas matrices alimentarias en el Reglamento (CE) nº 401/2006 (CE, 2006b). Todo ello, con el fin de estandarizar los protocolos de control oficial llevados a cabo por las autoridades de los Estados miembros (Sorbo et al., 2022).

Tabla 2. Límites máximos de OTA establecidos en alimentos destinados al consumo humano (CE, 2023).

Alimento		OTA ^a
Cereales	No procesados	5,0
	Productos derivados de cereales sin transformar y cereales comercializados para el consumidor final, excepto los productos señalados (*)	3,0
	(*) Productos de panadería, aperitivos de cereales y cereales para el desayuno:	
	- productos que no contengan semillas oleaginosas, frutos de cáscara ni frutos secos	2,0
	- productos que contengan al menos un 20 % de frutos de uvas pasas y/o higos secos	4,0
	- otros productos que contengan semillas oleaginosas, frutos de cáscara y/o frutas desecadas	3,0
(*) Bebidas de malta no alcohólicas	3,0	
(*) Gluten de trigo no comercializado para el consumidor final	8,0	
Frutas desecadas	Uvas pasas e higos secos	8,0
	Otras frutas desecadas	2,0
Café	Café tostado en grano y café tostado molido, excepto el café soluble	3,0
	Café soluble (café instantáneo)	5,0
Uva	Vino (incluido el vino espumoso, excluidos el vino de licor y el vino con un grado alcohólico mínimo del 15 % vol.) y vino de fruta	2,0
	Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2,0
	Zumo de uva, néctar de uva y mosto de uva comercializados para el consumidor final	2,0
Especias	Especias secas y mezclas de especias, excepto <i>Capsicum</i> spp.	15,0
	<i>Capsicum</i> spp. (frutos de dicho género desecados, enteros o molidos, incluidos el chile, el polvo de chile, la cayena y el pimentón)	20,0
Otros	Regaliz (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> y otras especies)	
	- raíz de regaliz (desecada), incluso como ingrediente para infusiones	20,0
	- extracto de regaliz para uso alimentario, en particular en bebidas y confitería	80,0
	- productos de confitería a base de regaliz con ≥ 97 % de extracto de regaliz en base seca	50,0
	- otros productos de confitería a base de regaliz	10,0
	Hierbas secas	10,0
	Jengibre (seco) para su uso en infusiones	15,0
	Raíces secas de malvasisco y diente de león y azahar (seco) para infusiones o sustitutos del café	20,0
	Semillas de girasol, semillas de calabaza, semillas de melón y de sandía, semillas de cáñamo, semillas de soja	5,0
	Pistachos que deben someterse a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes de su comercialización para el consumidor final o de su uso como ingredientes alimentarios	10,0
	Pistachos comercializados para el consumidor final o empleados como ingrediente en productos alimenticios	5,0
	Cacao en polvo	3,0
	Jarabe de dáttil	15,0
	(*) Alimentos para usos médicos especiales para lactantes y niños de corta edad	0,5
(*) Alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad	0,5	

^a Concentración máxima de OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Como se ha mencionado anteriormente, en los últimos años se ha descubierto que ciertos productos derivados de animales, como el jamón curado o el queso, pueden ser fuentes de ingesta de OTA en la dieta (Lešić et al., 2022; Altafini et al., 2021; Tolosa et al., 2020). Sin embargo, por el momento, la CE no ha establecido límites máximos para OTA en ningún producto de origen animal. No obstante, se espera que, en las próximas modificaciones de la ley, se establezcan límites

para este tipo de productos, ya que en la propia normativa se reconoce la necesidad de realizar un seguimiento adicional de la presencia de OTA en ellos.

En lo que respecta a la alimentación animal, actualmente la CE sólo recoge una recomendación no vinculante respecto al contenido de OTA en piensos a base de cereales y sus productos derivados para cerdos, aves de corral, perros y gatos en la Recomendación (UE) 2016/1319 (CE, 2016) (**Tabla 3**). De nuevo, es posible que, según avance el conocimiento sobre esta micotoxina y su modo de propagación en la cadena alimentaria, estudios futuros den lugar a la instauración de restricciones vinculantes en piensos destinados a la alimentación animal.

Tabla 3. Valores orientativos de OTA en productos destinados a la alimentación animal (CE, 2016).

Producto	Valor orientativo (mg/kg)
Materias primas para piensos: Cereales y productos a base de cereales	0,25
Piensos compuestos para: Cerdos	0,05
Aves de corral	0,1
Gatos y perros	0,01

2.4 Estrategias de control

El avance del conocimiento disponible sobre las micotoxinas, especialmente en lo que se refiere a su toxicología e incidencia, ha generado progresivamente un interés mayor en la búsqueda de métodos fiables, capaces de reducir sus niveles de contaminación en productos alimentarios. Como se ha comentado previamente, la OTA es una molécula muy estable que aparece como contaminante natural en multitud de sustratos. Su elevada estabilidad hace difícil su completa eliminación una vez que ha entrado en la cadena alimentaria. Ante esta problemática, existen principalmente dos tipos de estrategias, aquellas basadas en la prevención de la aparición de la toxina y aquellas basadas en la eliminación o degradación de la toxina una vez que se encuentra en el alimento (**Figura 3**). El modo óptimo de combatirla implicaría la combinación de ambas estrategias de forma que, en primer lugar, se redujera lo máximo posible la presencia de OTA y, posteriormente, la micotoxina remanente se eliminara mediante métodos de degradación (Liu et al., 2020).

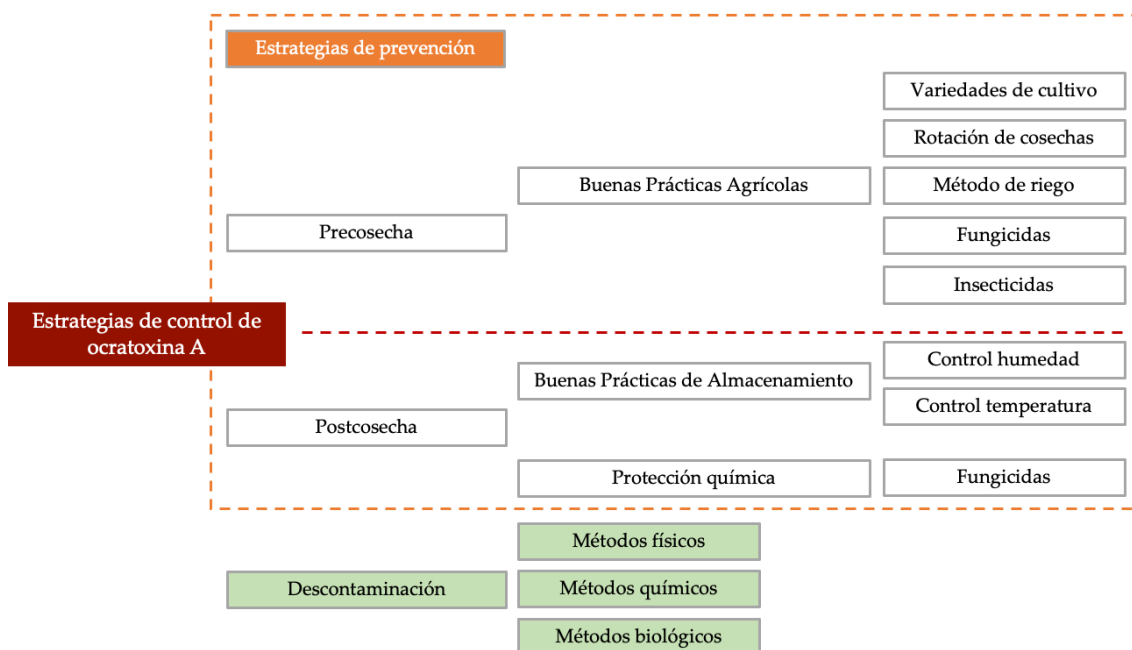


Figura 3. Estrategias de control de OTA.

2.4.1 Estrategias de prevención

La primera barrera en la prevención de la aparición de OTA consiste en evitar su acumulación en el campo y en los procesos postcosecha. El objetivo inicial es la prevención del crecimiento del hongo y, en caso de que esto ocurriese, impedir que produzca la toxina (Liu et al., 2020). Con este fin, se recomienda la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Almacenaje y Manufactura (BPAM), junto con la elaboración e implantación de protocolos de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) (FAO, 2003).

Las BPA representan la primera línea de defensa frente a la contaminación de los alimentos por micotoxinas. Esencialmente, son un conjunto de códigos de actuación que tienen por objetivo la identificación y aplicación de condiciones esenciales de higiene, desde el campo hasta la cosecha, para garantizar la seguridad de las materias primas (Zakhia-Rozis et al., 2007). Entre las BPA destacan un uso adecuado de la tierra, la adecuación de las técnicas de cultivo, la elección de variedades que presenten una mayor resistencia a hongos y la protección fitosanitaria (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2005). Por ejemplo, en el caso del vino resulta muy importante el tiempo de vendimia. Se ha descrito que la mayor incidencia de *Aspergillus* ocurre cuando el fruto está maduro y acumula altos niveles de azúcares, siendo los últimos 20 días de maduración cruciales para la síntesis de OTA en las uvas. Existen estudios que

apuntan que el seguimiento de las BPA puede reducir hasta un 80% la presencia de OTA en el vino (Mondani et al., 2020).

De forma análoga a las BPA, las BPAM son una serie de códigos de actuación durante el almacenamiento, procesamiento y distribución de los productos alimenticios, cuyo fin es garantizar el mantenimiento de unas condiciones de higiene adecuadas a lo largo de todo el proceso. Entre estas prácticas se incluye el control de una serie de parámetros como la humedad, la temperatura y la ventilación, así como la aplicación de medidas sanitarias de desinsectación y desinfección que eviten la proliferación de los hongos (Liu et al., 2020; Zakhia-Rozis et al., 2007). En este contexto, el Códex Alimentarius ofrece códigos de prácticas de higiene, que tienen como objetivo la reducción de la presencia de hongos ocratoxigénicos en vino, café y cacao (Códex Alimentarius, 2007, 2009, 2013).

Por su parte, el APPCC es un sistema de actuación desarrollado para garantizar la seguridad alimentaria, y está basado en la identificación y evaluación de los peligros potencialmente presentes en los alimentos, así como en la definición de los medios para controlarlos. En este contexto, en 2003 la FAO puso a disposición del público un manual sobre la aplicación de un sistema APPCC, enfocado en la prevención y control de la aparición de micotoxinas (FAO, 2003).

Respecto a la protección fitosanitaria, ésta es necesaria tanto en el periodo precosecha como postcosecha. El control de insectos y parásitos adquiere gran importancia durante la precosecha, ya que éstos son capaces de producir daños en las plantas y en los frutos que pueden servir como vía de entrada para los hongos, facilitando así su colonización. A modo de ejemplo, en la vid se ha encontrado que existe correlación entre los daños causados por la polilla de la uva (*Lobesia botrana*) y el contenido de OTA en las uvas, puesto que *L. botrana* contribuye a crear heridas en las bayas y a la diseminación de las esporas de los hongos. Los ensayos de campo han confirmado que un control efectivo de *L. botrana*, utilizando métodos biológicos o insecticidas, reduce la infección fúngica y la acumulación de OTA en las uvas (Mondani et al., 2020; Varga et al., 2010). Por otra parte, el control directo de la infección fúngica se puede realizar mediante fungicidas que impidan el crecimiento de hongos toxigénicos (Mondani et al., 2020). En este terreno, se pueden utilizar tanto agentes químicos sintéticos como naturales. El empleo de agentes químicos sintéticos se ha estudiado extensivamente (Varga et al., 2010), sin embargo, se encuentra obstaculizado por las consecuencias negativas que éstos pueden suponer en la salud humana y en el medio ambiente (Sarrocchio & Vannacci, 2018). Otro inconveniente en el uso de agentes químicos es el aumento del número de cepas resistentes a estos, lo que plantea la necesidad de encontrar métodos alternativos

(Gonçalves et al., 2019). Asimismo, es necesario prestar especial atención a la concentración utilizada, ya que se ha descrito que el uso de dosis subletales de estos agentes puede conducir a una estimulación de la producción de micotoxinas, especialmente bajo condiciones de estrés ambiental (Medina et al., 2017b).

Existen numerosos estudios en los que se explora el uso de compuestos naturales como alternativa al uso de agentes químicos sintéticos. Algunos ejemplos de ello son el uso de ácido vanílico, derivados del ácido hidroxicinámico o aceites esenciales de tomillo, orégano o romero (Álvarez et al., 2023; Lappa et al., 2017; El Khoury et al., 2016; Palumbo et al., 2007). No obstante, es necesario tener en cuenta que, al igual que en el caso de los compuestos químicos sintéticos, dosis bajas de estos compuestos pueden crear condiciones de estrés que potencien el metabolismo secundario como defensa fúngica y, de este modo, la producción de micotoxinas (Medina et al., 2017b).

Otra estrategia para prevenir la proliferación de hongos es el uso de agentes de biocontrol (BCA). Se denomina BCA a microorganismos antagónicos que dificultan el crecimiento del hongo, ya sea por competencia por el nicho ecológico, por la producción de compuestos antimicrobianos o por una combinación de estos mecanismos (Yang et al., 2022). Existen numerosos estudios que exploran la capacidad para controlar la presencia de OTA de diferentes microorganismos que pueden actuar como BCA. Las bacterias lácticas son un candidato atractivo como BCA debido a la seguridad de su uso industrial (Nguyen et al., 2017). Diversos estudios han demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento y la producción de OTA de cepas ocratoxigénicas de *A. carbonarius* por parte de diversas bacterias lácticas, como *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactilactobacillus graminis* y *Pediococcus pentosaceus* (Lappa et al., 2018; Belkacem-Hanfi et al., 2014). Por otra parte, también se ha demostrado la acción de lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* en la inhibición del crecimiento y la producción de OTA de *A. carbonarius*, durante el proceso de elaboración del vino (Jiang et al., 2017). Igualmente, la producción de compuestos orgánicos volátiles por parte de levaduras antagonistas, como por ejemplo *Kluyveromyces marxianus*, puede controlar la germinación de esporas, el crecimiento de hongos ocratoxigénicos e inhibir la producción de OTA (Alasmar et al., 2020). Entre las levaduras descritas como BCA para la prevención de OTA se encuentran *Metschnikowia pulcherrima*, *Aerobasidium pullulans*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Cryptococcus laurentii* y *Hanseniaspora uvarum*, entre otras (Gómez-Albarrán et al., 2021; Apaliya et al., 2017; Iacumin et al., 2017; Ponsone et al., 2016; Zhu et al., 2015; Cubaiu et al., 2012; Dimakopoulou et al., 2008; Bleve et al., 2006). También se ha explorado el potencial de ciertos hongos y sus compuestos activos como BCA. Por ejemplo, la aplicación del hongo no toxigénico *Penicillium chrysogenum*

redujo el crecimiento de hongos ocratoxigénicos y la acumulación de OTA en jamón ibérico curado (Delgado et al., 2019; Rodríguez et al., 2015). Aunque el uso de microorganismos como BCA resulta ventajoso frente al uso de agentes químicos, un aspecto clave a tener en cuenta en el futuro, principalmente en aquellos BCA cuyo fin sea su aplicación directa sobre el cultivo, es si los nuevos escenarios que traerá el cambio climático afectarán a su acción en el control de hongos toxigénicos, y si las formulaciones disponibles ahora serán tan efectivas como bajo las condiciones actuales (Medina et al., 2017b).

Puesto que el clima es el principal factor determinante en la contaminación de los cultivos por micotoxinas, y dado que la globalización y el cambio climático han llevado a la aparición de nuevas plagas en los cultivos de todo el mundo, es necesaria una evaluación de la posible implicación de estas variables en la contaminación por OTA. En este contexto, el uso de modelos predictivos para evaluar el riesgo de OTA es una herramienta válida para apoyar la optimización de la planificación de los cultivos y las prácticas de gestión a lo largo de la cadena de valor (Mondani et al., 2020). A este respecto, Battilani y Camardo-Leggieri desarrollaron un modelo capaz de predecir el riesgo de contaminación por OTA en uvas por encima del límite legal vigente en Europa, a partir de datos horarios sobre la temperatura, la humedad del aire y las precipitaciones (Battilani & Camardo-Leggieri, 2015). En la misma línea, se han desarrollado diversos modelos para predecir la aparición de *L. botrana*, uno de los cuales es utilizado actualmente en la región italiana de Emilia-Romaña para el control de este insecto (Mondani et al., 2020).

2.4.2 Estrategias de destoxificación

La correcta implementación de los códigos de buenas prácticas, así como el establecimiento de un sistema APPCC, reducen la aparición de micotoxinas en la cadena alimentaria. Sin embargo, las posibilidades actuales de eliminar este riesgo por completo son limitadas. Por este motivo, estas técnicas deben complementarse con la implementación de métodos de descontaminación y destoxificación, que son aquellos que, una vez que la micotoxina está presente, tratan de eliminarla o degradarla a compuestos no tóxicos o con toxicidad reducida. Por ello, el desarrollo de estrategias alternativas para la reducción de micotoxinas se considera un tema relevante y urgente (Loi et al., 2017). Se ha propuesto que una buena estrategia de destoxificación debe cumplir los siguientes requisitos básicos: i) la micotoxina se debe inactivar o degradar mediante su transformación a compuestos con una toxicidad significativamente reducida respecto a la micotoxina original, ii) el alimento debe mantener sus características organolépticas y su valor nutritivo tras el tratamiento, iii) el

tratamiento debe ser fácilmente aplicable y viable desde el punto de vista económico (Loi et al., 2017; Halász et al., 2009).

Como estrategias de destoxificación de OTA se han propuesto enfoques físicos, químicos y biológicos.

2.4.2.1 Métodos físicos y químicos

Entre los métodos físicos, destacan aquellos basados en la eliminación mecánica de fracciones altamente contaminadas de la materia prima, la aplicación de tratamientos térmicos, la irradiación y el uso de adsorbentes (Loi et al., 2017).

El método físico más convencional y fácilmente aplicable para la reducción de la concentración de OTA se basa en la clasificación, separación y limpieza de los productos contaminados; por ejemplo, eliminando partes con moho, dañadas o el polvo (Colović et al., 2019).

También se han explorado estrategias basadas en tratamientos térmicos; sin embargo, existe cierta contradicción entre los estudios publicados a este respecto (Wang et al., 2022a). En general, como ya se ha comentado, la OTA es un compuesto estable frente a tratamientos térmicos, no obstante, procesos como la extrusión, la cocción, o el horneado de alimentos pueden tener diferentes impactos sobre la toxina (Jalili et al., 2020; Lee, 2020; Ariño et al., 2007).

Del mismo modo, se han investigado otros tratamientos físicos como la irradiación o la sonicación como medios para la reducción de OTA (Liu et al., 2019; Calado et al., 2018). Entre las desventajas más importantes de este tipo de tratamientos se encuentra el conocimiento limitado sobre los productos de degradación generados y su toxicidad. Además, al ser tratamientos no selectivos, pueden producir cambios nutricionales y organolépticos en los productos (Gavahian et al., 2021; Colović et al., 2019; Loi et al., 2017). Asimismo, en la literatura se encuentran algunos estudios sobre el uso de tecnologías emergentes, como la aplicación de plasma frío o la irradiación por haz de electrones (Gavahian et al., 2021). Sin embargo, además de las desventajas señaladas previamente, en la actualidad estas tecnologías presentan también otros inconvenientes como altos costes de inversión, altos costes operativos y falta de unidades de procesamiento a gran escala, entre otros (Gavahian et al., 2021).

Uno de los métodos físicos más utilizado, más económico y de fácil manejo para reducir y eliminar OTA es el uso de agentes adsorbentes (Wang et al., 2022b). El empleo de este tipo de materiales es una estrategia reconocida por la CE, estando permitido el uso de algunos de ellos como aditivo alimentario (CE,

2003). Existen adsorbentes de micotoxinas que se comercializan como aditivos para piensos, de modo que, al formar un complejo con la toxina, limitan tanto su absorción en el tracto gastrointestinal, impidiendo su paso a la sangre, como su acumulación en los órganos diana, y favorecen su eliminación (Boudergue et al., 2017). Entre los agentes adsorbentes estudiados con capacidad de unir OTA se encuentran el carbón activo, aluminosilicatos, hidratos de carbono complejos no digeribles, polímeros sintéticos (colestiramina o polivinilpirrolidona), albúmina de huevo, etc. (Colović et al., 2019). También han demostrado ser eficaces en la reducción de la concentración de OTA residuos vegetales como cáscaras de clementina, fibra de coco o posos de café y fibras micronizadas de diferentes vegetales, como el trigo (Loffredo et al., 2020; Aoudia et al., 2009). A pesar de sus ventajas, es necesario ser precavidos en su uso ya que, al igual que en el caso de los otros métodos físicos, no son métodos selectivos. Esto hace que, además de la OTA, otros nutrientes o vitaminas también puedan adsorberse, limitando así su biodisponibilidad. En estos agentes, es necesario demostrar que la unión adsorbente-OTA sea una unión fuerte e irreversible. La estabilidad de la unión toxina-sorbente y la eficacia de esta unión en un amplio intervalo de valores de pH (especialmente al pH del tracto gastrointestinal) son criterios importantes para la aplicación de estos compuestos (Colović et al., 2019).

Los tratamientos químicos constituyen otra alternativa para la destoxificación de OTA, entre ellos se encuentra mayoritariamente el uso de bases (alcalinización, amonización), agentes oxidantes (hipoclorito de sodio, ozono), y ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido propiónico). Estos métodos pueden reducir los niveles de OTA hasta niveles indetectables, además de inhibir el crecimiento fúngico. Sin embargo, la CE no permite el uso de este tipo de tratamientos en la destoxificación de alimentos destinados al consumo humano (CE, 2023). Estos métodos presentan desventajas semejantes a las mencionadas previamente para otros métodos, como son la falta de conocimiento de los productos de degradación originados, la potencial alteración de las características organolépticas y nutricionales de los productos, además de ser potencialmente dañinos para el medio ambiente (Conte et al., 2020; Luo et al., 2018).

2.4.2.2 Métodos biológicos

Los métodos biológicos consisten en el uso de microorganismos o enzimas para la adsorción o degradación de las micotoxinas en compuestos estables inocuos o de menor toxicidad (Nešić et al., 2021). Estos métodos suponen una alternativa a las limitaciones que presentan los métodos físicos y, principalmente, los químicos. De este modo, los métodos biológicos se consideran la estrategia más prometedora dado que presentan ventajas como: menos efectos sobre el medio

ambiente, una mayor especificidad y una eficiencia y fiabilidad potencialmente mayores, pudiendo de esta manera preservar la calidad de los alimentos contaminados (Sandlin et al., 2022).

La descontaminación de OTA mediante adsorción se produce cuando las moléculas de la micotoxina se unen a la pared celular del microorganismo, dando lugar a un complejo OTA-célula que permite su eliminación del medio. Este mecanismo se ha descrito tanto en bacterias lácticas como en levaduras, al observarse una disminución del contenido de OTA en el medio de cultivo sin detectarse productos de degradación. Existen numerosos estudios que han descrito la capacidad de adsorber OTA de diferentes cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, así como de cepas de las especies *Oenococcus oeni* y *Pediococcus acidilactici* (Del Prete et al., 2007; Skrinjar et al., 1996). Entre las levaduras, se han descrito cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida friedrichii*, *C. intermedia* y *Lachancea thermotolerans* capaces de adsorber OTA (Fiori et al., 2014; Piotrowska et al., 2013). La composición de la pared celular determina la eficiencia de adsorción de OTA (Yang et al., 2022). Se ha descrito que la aplicación de diferentes tratamientos, como por ejemplo el tratamiento con calor, ácido o ultrasonidos, puede aumentar significativamente la capacidad de adsorción de OTA de los microorganismos (Abedi et al., 2022; Yang et al., 2022). Recientemente, se han publicado estudios orientados a la búsqueda de microorganismos con capacidades más adecuadas para adsorber OTA (Caridi et al., 2020; Pulvirenti et al., 2020). En algunos estudios se han obtenido cepas mutantes con mayor capacidad de adsorción o capaces de adsorber la toxina con mayor especificidad, tanto en levaduras (Caridi et al., 2020), como en bacterias lácticas (Khattab et al., 2018).

A pesar de que la eliminación de OTA por adsorción a las paredes celulares es un mecanismo válido y de fácil aplicación, es necesario tomarlo con precaución ya que la adsorción puede ser un proceso reversible, pudiendo volver a liberarse OTA al medio. El grado de reversibilidad del proceso depende de la estabilidad del complejo formado entre la superficie del microorganismo y la toxina (Nahle et al., 2022). Además, al igual que ocurre en el caso de otro tipo de adsorbentes, se trata de un mecanismo inespecífico, pudiendo adsorberse otros componentes de los alimentos. En este sentido, la degradación biológica de OTA por parte de microorganismos y/o enzimas constituye un proceso mucho más específico y, por tanto, mucho más deseable (Zhao et al., 2019).

En la literatura científica existen estudios que describen la capacidad transformadora de OTA de diferentes microorganismos y enzimas. Aunque los mecanismos de degradación de OTA pueden seguir diferentes vías metabólicas, el principal mecanismo de degradación microbiana descrito es la transformación mediante la hidrólisis del enlace amida, dando lugar como productos de

degradación a OT α y L- β -fenilalanina (**Figura 4**). Esta transformación se considera un mecanismo de detoxificación ya que ninguno de estos productos es tóxico. Los estudios realizados demuestran que OT α es 1000 veces menos tóxica que OTA y que su vida media en sangre es 10 veces más corta que la vida media de OTA (Bruinink et al., 1998; Li et al., 1997). Aunque la OT α se absorbe parcialmente en el intestino, no se acumula en el riñón y se excreta rápidamente en la orina en forma de glucurónido (EFSA, 2020). Por su parte, la fenilalanina es un aminoácido natural que se encuentra en diversos alimentos (Kohlmeier, 2003). Otro mecanismo metabólico de degradación de OTA propuesto en bacterias es la hidrólisis mediante la apertura del anillo lactona. Sin embargo, esta ruta no se considera un mecanismo de detoxificación, ya que el producto de la reacción es un compuesto más tóxico que OTA, y además es una reacción reversible, pudiendo dar lugar de nuevo a OTA (Mwabulili et al., 2023; Wu et al., 2011).

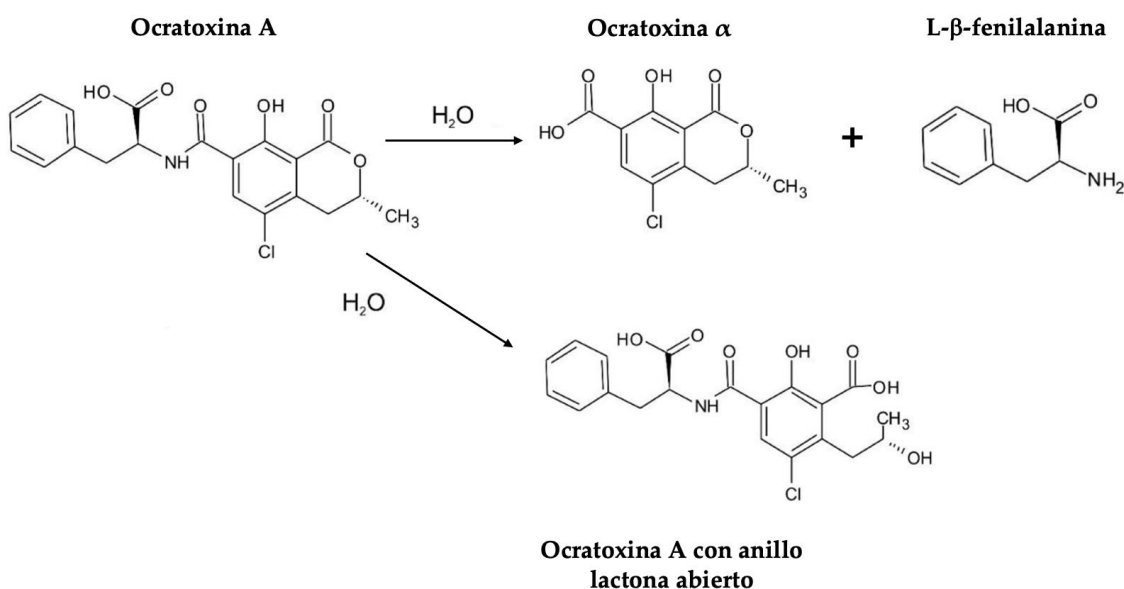


Figura 4. Mecanismos propuestos para la hidrólisis de OTA por bacterias (Adaptado de Leitão & Enguita, 2021).

La capacidad de detoxificar OTA mediante la hidrólisis del enlace amida se ha descrito en numerosos microorganismos. Los primeros estudios, en los que se observó que los rumiantes presentaban una mayor tolerancia a la contaminación por OTA, propusieron a los protozoos como responsables de esta mayor resistencia (Mobashar et al., 2010; Özpınar et al., 1999; Xiao et al., 1991; Kiessling et al., 1984; Galtier & Alvinerie, 1976). Más tarde, el papel central de los protozoos en la degradación de OTA en los rumiantes quedó en entredicho en un estudio sobre la contribución de los diferentes grupos de microorganismos de la microbiota del rumen (bacterias, protozoos y hongos) en la degradación de OTA. El estudio concluyó que las bacterias eran las mayores responsables de esta capacidad (Mobashar et al., 2012). Parece ser que la mayor resistencia de los rumiantes a OTA viene dada por el hecho de que la OTA se hidroliza antes de

llegar al intestino delgado, donde se absorbe en mayor proporción; mientras que, en el caso de los no rumiantes, la mayor parte de la toxina se absorbe antes de llegar a la microbiota intestinal (Mobashar et al., 2010).

Además de en la microbiota intestinal, se han identificado microorganismos transformadores de OTA en numerosos entornos. Por ejemplo, los ambientes habitualmente contaminados con la toxina son una fuente tradicional para aislar microorganismos degradadores (Sandlin et al., 2022). Asimismo, presentan un interés especial los microorganismos capaces de degradar OTA y que se encuentran presentes de forma natural en los alimentos. Este es el caso de la bacteria *Brevibacterium linens* que forma parte de la microbiota natural de algunos alimentos como el queso y para la cual el grupo de investigación de Biotecnología Bacteriana del ICTAN (CSIC) describió su capacidad para transformar OTA en OT α , así como en otras especies del género (Rodríguez et al., 2011). En la **Tabla 4** se muestran, según la fecha de descripción, los microorganismos para los que se ha descrito capacidad transformadora de OTA.

Tabla 4. Microorganismos descritos en la literatura con capacidad degradadora de OTA.

Microorganismo ^{a,b}	Origen	Referencia
<i>Phenyllobacterium immobile</i> ^a	Suelo	Wegst & Lingens, 1983
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NRRL B-551 ^a	Colección	Hwang & Draughon, 1994
<i>Aspergillus niger</i> CBS 120.49 ^a	Colección	Varga et al., 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i> SZMC 1180 ^a		
<i>Aspergillus fumigatus</i> mut. <i>helvola</i> NRRL 174 ^a		
<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>acolummaris</i> NRRL 5587 ^a		
<i>Pleurotus ostreatus</i> ^a	Colección	Engelhardt, 2002
<i>Aspergillus niger</i> ^a	Uvas	Abrunhosa et al., 2002
<i>Aspergillus carbonarius</i> ^a		
<i>Aspergillus japonicus</i> ^a		
<i>Aspergillus wentii</i> ^b		
<i>Aspergillus ochraceus</i> ^b		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069 ^a	Colección	Schatzmayr et al., 2002
<i>Sphingomonas</i> sp. (DSM 14167, DSM 14170) ^a		
<i>Stenotrophomonas</i> sp. (DSM 14168, DSM 14169) ^a		
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 14171 ^a		
<i>Agrobacterium</i> sp. DSM 30201 ^a		
<i>Trichosporon</i> sp. (DSM 14153, DSM 14156, DSM 14162) ^a	Colección	Schatzmayr et al., 2003
<i>Rhodotorula</i> sp. DSM 14155 ^a		
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> sp. <i>nov.</i> ^a	Intestino de termita	Molnar et al., 2004
<i>Rhizopus stolonifera</i> ^a	Suelo, frutas, arroz y tempeh	Varga et al., 2005
<i>Rhizopus microspores</i> ^a		
<i>Rhizopus homothallicus</i> ^a		
<i>Rhizopus oryzae</i> ^a		
<i>Rhizopus</i> sp. ^a		
<i>Eubacterium callanderi</i> Due4_11 ^a	Suelo	Schatzmayr et al., 2006
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> 033-1 ^a		
<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> 034-1 ^a		
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> 041-9 ^a		
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (MTV, 115) ^a		
<i>Trichosporon</i> 178 ^a		
<i>Rhodotorula</i> 124 ^a		
<i>Cryptococcus</i> 118 ^a		

Introducción

Tabla 4. (continuación)

Microorganismo ^{a,b}	Origen	Referencia
<i>Aspergillus niger</i> GX312 ^a	Uvas	Bejaoui et al., 2006
<i>Aspergillus japonicus</i> AX35 ^a		
<i>Aspergillus carbonarius</i> SA332 ^a		
<i>Kloeckera apiculata</i> (3187, 3188, 3189, 3197, 3198, 3200) ^a	Colección	Angioni et al., 2007
<i>Phaffia rhodozyma</i> CBS 5905 ^a	No descrito	Péteri et al., 2007
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ^a		
<i>Bacillus licheniformis</i> CM 21 ^a	Soja fermentada	Petchkongkaew et al., 2008
<i>Botrytis cinerea</i> (UdLTA 3 95, UdLTA 3 102, UdLTA 3 115)	Uvas	Valero et al., 2008
<i>Aureobasidium pullulans</i> (AU14-3-1, AU18-3B, AU34-2, LS30) ^a	Fruta	De Felice et al., 2008
<i>Brevibacterium casei</i> (DSM 20657 ^T , DSM 9657, DSM 20658) ^a	Colección	Rodríguez et al., 2011
<i>Brevibacterium linens</i> DSM 20425 ^T ^a		
<i>Brevibacterium iodinum</i> DSM 20626 ^T ^a		
<i>Brevibacterium epidermidis</i> DSM 20660 ^T ^a		
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (MACH1, M320)	Colección	Patharajan et al., 2011
<i>Kloeckera lindneri</i> GAL5		
<i>Pichia guilliermondii</i> (M8, M29)		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AR14		
<i>Bacillus licheniformis</i>	Rumen caprino	Upadhaya et al., 2011
<i>Eubacterium bifforme</i> MM11	Microbiota intestinal cerdo	Upadhaya et al., 2012
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (GD2A, BRB 1AB)	Suelo	Cserháti et al., 2013
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> K402, K408		
<i>Bacillus subtilis</i> CW14	Gotas de alce	Shi et al., 2014
<i>Cupriavidus basilensis</i> Ör16 ^a	Suelo	Ferenczi et al., 2014
<i>Pediococcus parvulus</i> UTAD 473 ^a	Vino / uva	Abrunhosa et al., 2014
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 396.1 ^a	Suelos de viñedos	De Bellis et al., 2015
<i>Acinetobacter</i> sp. neg 1 ^a		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ASAG1 ^a	Maíz almacenado	Chang et al., 2015
<i>Aspergillus tubingensis</i> (M036, M074) ^a	Meju coreano	Cho et al., 2016
<i>Yarrowia lipolytica</i> ^a	Viñedo	Yang et al., 2016
<i>Alcaligenes faecalis</i> ASAGF 0D-1 ^a	Suelo	Zhang et al., 2017
<i>Aspergillus niger</i> M00120 ^a	Suelo	Xiong et al., 2017
<i>Streptomyces</i> (AT10, AT8, SN7, MS1, ML5, G10, PT1)	Suelo	El Khoury et al., 2017
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> CCUG 44338 ^T ^a	Colección	Al-nussairawi et al., 2020
<i>Cupriavidus alkaliphilus</i> BCCM 26294 ^T ^a		
<i>Cupriavidus basilensis</i> DSM 11853 ^T ^a		
<i>Cupriavidus necator</i> CCUG 52238 ^T ^a		
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> DSM 19553 ^T ^a		
<i>Cupriavidus numazuensis</i> DSM 15562 ^T ^a		
<i>Cupriavidus respiraculi</i> CCUG 46809 ^T ^a		
<i>Aspergillus oryzae</i> ^a	Suelo	Xiong et al., 2020
<i>Lysobacter</i> sp. CW239 ^a	Suelo contaminado	Wei et al., 2020
<i>Cryptococcus podzolicus</i> Y3 ^a	No descrito	Wei et al., 2022
<i>Bacillus velezensis</i> E2 ^b	Arroz	Zhang et al., 2022a
<i>Pleurotus ostreatus</i> ^a	Colección	Nobre et al., 2022
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> ^a	Suelo	Peng et al., 2022
<i>Alcaligenes faecalis</i> ANSA176 ^a	Quimo intestinal de burro	Zheng et al., 2022
<i>Trichoderma koningii</i> ^{a,b}	Semillas de tomate	Ismail et al., 2023
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Estiércol de vaca	Tang et al., 2023
<i>Cytobacillus oceanisediminis</i> ^a	Viñedos	Yang et al., 2023a
<i>Agaricus campestris</i>	Cuerpo fructífero	Söylemez et al., 2023
<i>Bacillus velezensis</i> IS-6 ^a	Varias fuentes	Jahan et al., 2023
<i>Brevibacillus</i> sp. ALJ01 ^a	Trigo	Liu et al., 2023
<i>Brevibacillus schisleri</i> ALJ02 ^a		
<i>Acinetobacter pittii</i> AP19 ^a	Suelos de viñedos	Yang et al., 2023b

^a OT α descrito como producto de degradación

^b Producto de degradación distinto a OT α

Otro método biológico para la destoxificación de OTA es la utilización de enzimas. Dependiendo de la aplicación final, puede resultar de mayor interés el uso de microorganismos o el de enzimas; si bien es cierto que, desde el punto de vista de la aplicación, las enzimas presentan ciertas ventajas adicionales frente al uso de microorganismos vivos, como la garantía de actividades más homogéneas y reproducibles, mayor facilidad de manejo y menores riesgos de seguridad y contaminación (Adegoke et al., 2022). Asimismo, las propiedades de las enzimas se pueden modificar mediante técnicas de ingeniería genética para adaptarlas a una aplicación industrial determinada (Loi et al., 2017).

Se han descrito enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida presente en la molécula de OTA con diferentes grados de eficiencia. Todas las enzimas descritas hasta el momento son hidrolasas de diferentes tipos, mayoritariamente peptidasas (número EC 3.4). La primera enzima descrita con capacidad para degradar OTA fue la carboxipeptidasa A de páncreas bovino (Pitout, 1969). Dentro de las enzimas microbianas, la primera enzima descrita fue una amidohidrolasa de *Aspergillus niger* UVK143 a la que denominaron ocratoxinas, haciendo referencia a esta capacidad (Dobritzsch et al., 2014). Algunos de los estudios que describen la transformación enzimática de OTA se basan en la actividad degradadora observada en extractos libres de células. Por ejemplo, Cho y colaboradores (2016) describieron la actividad degradadora de OTA del extracto libre de células de un cultivo de *Aspergillus tubingensis*.

Otros estudios dan un paso más en la caracterización, determinando que las enzimas involucradas en la hidrólisis de OTA son metalocarboxipeptidasas debido a la susceptibilidad de los extractos libres de células, o de los cultivos, a inhibidores propios de este tipo de enzimas. Tal es el caso de la carboxipeptidasa descrita en *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 (Péteri et al., 2007).

Finalmente, existen estudios en los que se ha identificado y purificado la enzima potencialmente responsable de la degradación. Entre otras, se encuentran las proteínas bacterianas anotadas como carboxipeptidasas de *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1 (Chang et al., 2015), *Bacillus subtilis* CW14 (Xu et al., 2021; Hu et al., 2018), *Lysobacter* sp. CW239 (Wei et al., 2020) y *Acinetobacter* sp. *neg1* (Liuzzi et al., 2017). Sin embargo, estas proteínas, aunque degradan OTA, no lo hacen de manera eficiente, por lo que no parece que sean las enzimas responsables de la capacidad degradadora que muestran los cultivos de las bacterias que las poseen. Por ejemplo, un lisado celular de *E. coli* expresando heterológamente la proteína recombinante PJ15_1540 de *Acinetobacter* sp. *neg1* fue capaz de degradar únicamente el 33% de la OTA presente en el medio (Liuzzi et al., 2017). Este resultado indicaba que la actividad de la enzima identificada era mucho menor que la presentada por la cepa *Acinetobacter* sp. *neg1* (De Bellis et al., 2015). Otros ejemplos son la carboxipeptidasa cp4 descrita en *Lysobacter* sp.

CW239 y la amidohidrolasa NA de *Stenotrophomonas* sp. CW117, ambas enzimas mostraron una actividad degradadora de OTA moderada e inferior a la observada en los cultivos de estas cepas (Chen et al., 2022; Wei et al., 2020). Además, la actividad degradadora de OTA presente en el mutante deficiente en carboxipeptidasa cp4 de *Lysobacter* sp. CW239 (Qian et al., 2021), así como en una cepa deficiente en amidohidrolasa NA de *Stenotrophomonas* sp. CW117 (Chen et al., 2022), sugiere, de nuevo, que éstas no son las principales enzimas responsables del fenotipo degradador de la bacteria y/o que algunas cepas podrían contener múltiples enzimas con capacidad de degradación de OTA.

En contraposición a la baja actividad hidrolítica exhibida por estas enzimas, existen dos proteínas que han demostrado una actividad eficiente sobre OTA, la ocratoxinasa de *A. niger* UVK143 (Dobritzsch et al., 2014) y la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *Alcaligenes faecalis* DSM 16503^T (Zhang et al., 2019). Además, durante el transcurso de este trabajo se describió una amidohidrolasa, denominada ADH3, en la cepa *Stenotrophomonas* sp. CW117, con una eficacia catalítica superior a las enzimas previamente descritas en la literatura (Luo et al., 2022). La **Tabla 5** muestra todas las enzimas en las que se ha descrito capacidad transformadora de OTA hasta la fecha.

Puesto que se ha descrito en la bibliografía un alto número de bacterias capaces de destoxificar OTA y sólo se ha identificado la proteína responsable en algunas de ellas, la identificación de nuevas enzimas en otras especies bacterianas aportará información relevante sobre el tipo de enzimas que catalizan la transformación de la micotoxina y ampliará el abanico de enzimas disponibles para su utilización en productos alimentarios.

Tabla 5. Enzimas degradadoras de OTA.

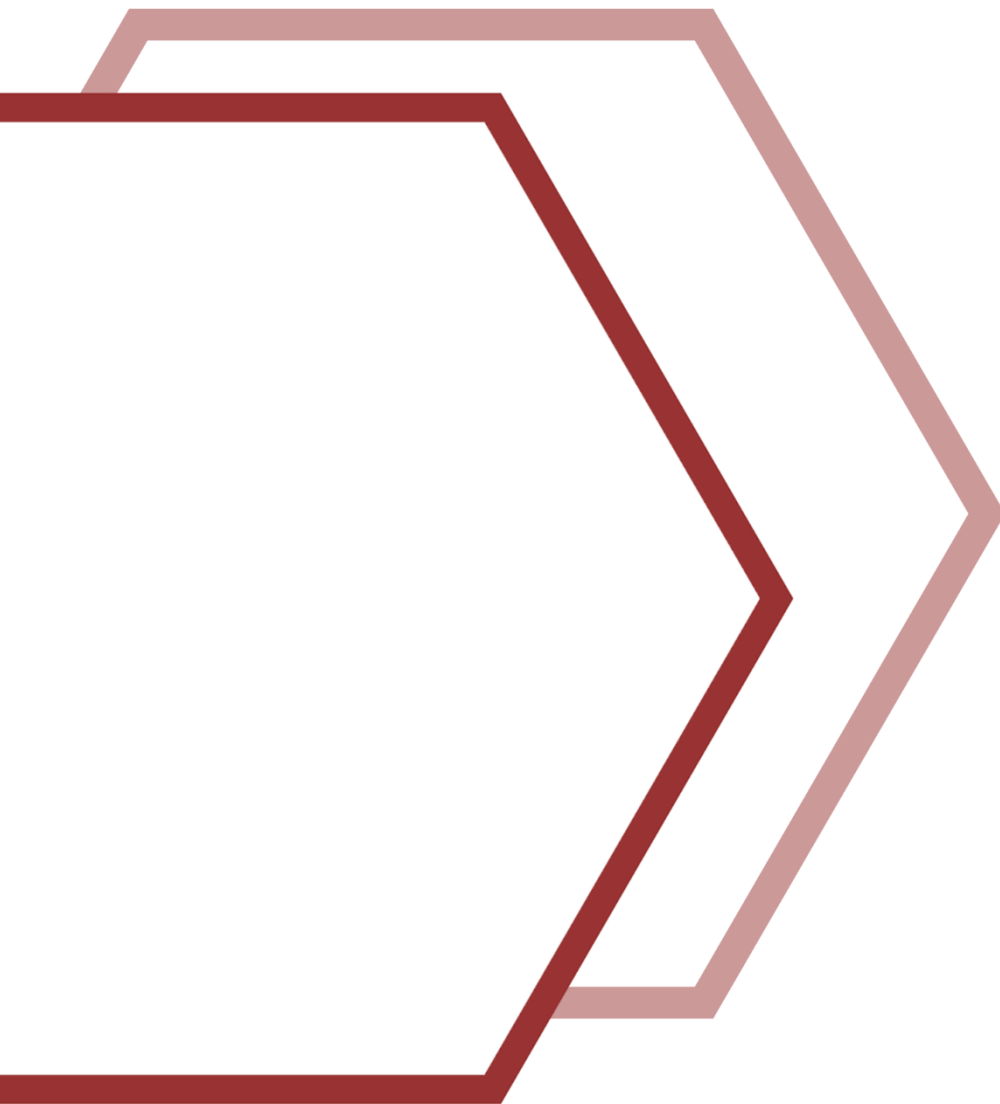
Enzima	Origen	Producto ^a	Referencia
Carboxipeptidasa A	Páncreas bovino	OT α	Pitout, 1969
Pancreatina	Páncreas porcino	OT α	Abrunhosa et al., 2006
Carboxipeptidasa Y	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	OT α	Abrunhosa et al., 2010
Carboxipeptidasa B	Porcino	OT α	Dellafiora et al., 2020
Ocratoxinas	<i>Aspergillus niger</i> UVK143	OT α	Dobritzsch et al., 2014
Carboxipeptidasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ASAG1	OT α	Chang et al., 2015
Carboxipeptidasa PJ15_1540 ^b	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>neg1</i>	OT α	Liuzzi et al., 2017
Carboxipeptidasa BCV50_12785	<i>Bacillus subtilis</i> CW14	OT α	Hu et al., 2018
N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa	<i>Alcaligenes faecalis</i> DSM 16503 ^T	OT α	Zhang et al., 2019
Carboxipeptidasa cp4	<i>Lysobacter</i> sp. CW239	OT α	Wei et al., 2020
Carboxipeptidasa DacA Carboxipeptidasa DacB	<i>Bacillus subtilis</i> CW14	OT α	Xu et al., 2021
ADH3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. CW117	OT α	Luo et al., 2022
N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa (NA)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. CW117	OT α	Chen et al., 2022
Peptidasa familia M3 (<i>BnOTase1</i>) Serín carboxipeptidasa (<i>BnOTase2</i>) Peptidasa familia M14 (<i>BnOTase3</i>) Amidohidrolasa (<i>BnOTase4</i>)	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> ML17	OT α	Peng et al., 2023
Hidrolasa metalodependiente Peptidasa familia S9	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 043-1a	OT α	Gonaus et al., 2023
Bromelaína cisteín proteasa	<i>Ananas comosus</i>	ND ^c	Orozco-Cortés et al., 2023
Tripsina bovina serín proteasa	Bovino	OT α	
Metaloendopeptidasa	<i>Bacillus subtilis</i>	OT α	
Nudix hydrolase (Nh-9) Carboxilesterasa (Ce-3) Péptido señal peptidasa (Sp-2)	<i>Bacillus velezensis</i> IS-6	OT α	Jahan et al., 2023
Carboxipeptidasa DacC	<i>Acinetobacter pittii</i> AP19	OT α	Yang et al., 2023b

^a Producto de la reacción enzimática

^b Enzima expresada heterológamente en *E. coli*, pero no purificada (se estudia la actividad del lisado celular)

^c Producto no determinado

II. Objetivos



Las micotoxinas representan uno de los principales peligros a nivel mundial en el ámbito de la seguridad alimentaria. Además, el contexto de cambio climático en el que nos encontramos supone un agravante, pudiendo conducir a un aumento de la presencia de este tipo de contaminantes. Esto hace necesario la búsqueda de métodos eficaces para reducir la contaminación a niveles tan bajos como sea técnicamente posible. La ocratoxina A (OTA) se encuentra entre las micotoxinas más relevantes debido a su toxicidad y amplia distribución en diferentes materias primas y productos alimentarios. Para reducir su presencia se han estudiado diferentes estrategias. Los métodos biológicos, basados en el uso de microorganismos y/o sus enzimas, presentan las mayores ventajas. En la literatura científica existen estudios en los que se han descrito cepas bacterianas capaces de transformar OTA en metabolitos no tóxicos. En algunas de estas bacterias se han identificado proteínas hidrolizadoras de OTA. Entre las proteínas bacterianas identificadas, sólo algunas de ellas presentan alta actividad.

Hipótesis de partida:

La búsqueda de proteínas con similitud de secuencia a una proteína dada puede conducir a la identificación de nuevas proteínas con funciones similares. De este modo, la búsqueda de proteínas similares a las enzimas ya descritas que degradan OTA eficazmente permitiría la identificación de nuevas proteínas con esta actividad, así como la identificación de nuevas bacterias degradadoras de OTA al ser poseedoras de dichas enzimas.

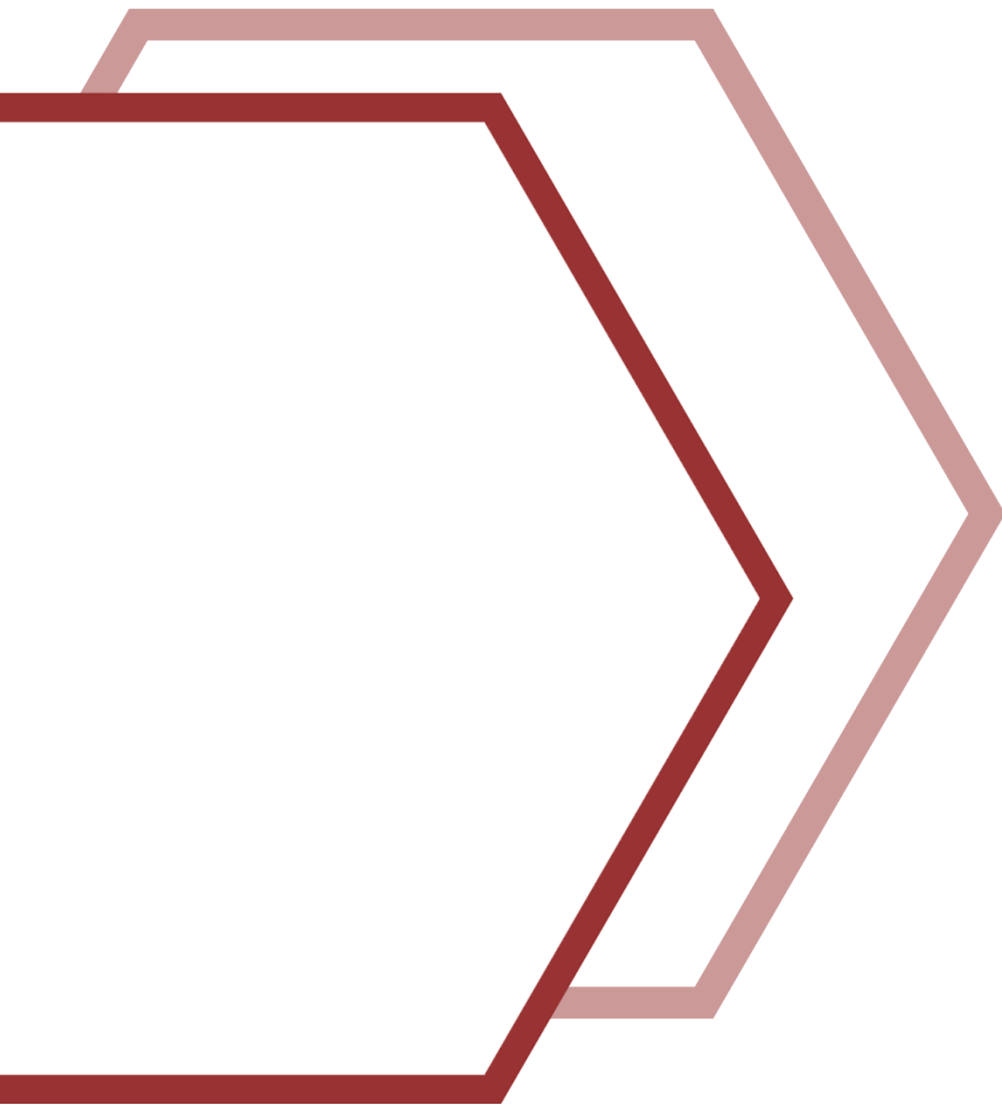
Objetivo general:

La identificación y caracterización de nuevas enzimas bacterianas capaces de degradar OTA eficazmente, ampliando de esta manera la colección de enzimas degradadoras de OTA disponibles con potencial aplicación en matrices alimentarias.

Objetivos específicos:

1. Identificación de nuevas enzimas bacterianas capaces de transformar OTA.
2. Producción y caracterización de las enzimas bacterianas degradadoras de OTA.
3. Estudio de la presencia de la enzima degradadora de OTA y su relación con el fenotipo degradador de la bacteria que la posee.
4. Estudio del fenotipo degradador de OTA en especies del mismo género que las bacterias previamente identificadas.

III. Materiales y métodos



1 Microorganismos, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas microbianas empleadas en el presente trabajo aparecen recogidas en la **Tabla 6**. Las cepas tipo se adquirieron en el Instituto Leibniz-Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ), con la excepción de la cepa *Aspergillus niger* CBS 513.88, que se adquirió en la colección de cultivos de hongos y levaduras del *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (Países Bajos).

Para la clonación y la expresión heteróloga de proteínas recombinantes, se utilizaron las cepas *Escherichia coli* DH10B y *E. coli* BL21 (DE3), respectivamente. Para los experimentos de conjugación, se empleó como donadora la cepa *E. coli* S17-1 λ pir transformada con el plásmido de interés y como auxiliar (*helper*) se utilizó la cepa *E. coli* HB101 portadora del plásmido pRK600.

Tabla 6. Microorganismos empleados en este trabajo.

Género	Especie	Cepa ^a	Medio ^b	Temperatura (°C)
<i>Alcaligenes</i>	<i>A. endophyticus</i>	DSM 100498 ^T	LB	30
	<i>A. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	DSM 30030 ^T	LB	37
	<i>A. faecalis</i> subsp. <i>parafaecalis</i>	DSM 13975 ^T	LB	37
	<i>A. faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i>	DSM 16503 ^T	LB	37
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	CBS 513.88	Sabouraud	28
<i>Brevibacterium</i>	<i>B. antiquum</i>	DSM 21545 ^T	MR2A	28
	<i>B. aurantiacum</i>	DSM 20426 ^T	TSYE	30
	<i>B. casei</i>	DSM 20658	LB	30
	<i>B. casei</i>	DSM 9657	LB	30
	<i>B. epidermidis</i>	DSM 20660 ^T	LB	30
	<i>B. jeotgali</i>	DSM 29217 ^T	BMB	28
	<i>B. linens</i>	DSM 20425 ^T	LB	30
	<i>B. permense</i>	DSM 21546 ^T	TSYE	28
	<i>B. sediminis</i>	DSM 102229 ^T	TSYE	28
	<i>B. senegalense</i>	DSM 25783 ^T	TSYE	28
<i>Cupriavidus</i>	<i>C. basilensis</i>	DSM 106286 ^T	MR2A	28
	<i>C. campinensis</i>	DSM 17293 ^T	CASO	37
	<i>C. malaysiensis</i>	DSM 19416 ^T	M1	28
	<i>C. necator</i>	DSM 13513 ^T	M1	30
	<i>C. numazuensis</i>	DSM 15562 ^T	M1	25
	<i>C. oxalaticus</i>	DSM 1105 ^T	TSB	30
	<i>C. taiwanensis</i>	DSM 17343 ^T	MR2A	28
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	DH10B	LB	37
	<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	LB	37
	<i>E. coli</i>	S17-1 λ pir	LB	37
	<i>E. coli</i>	HB101 (pRK600)	LB + Cm	37
<i>Lysobacter</i>	<i>L. capsici</i>	DSM 19286 ^T	MR2A	28
	<i>L. concretionis</i>	DSM 16239 ^T	MR2A	30
	<i>L. daejeonensis</i>	DSM 17634 ^T	MR2A	28
	<i>L. enzymogenes</i>	DSM 2043 ^T	CY	30
	<i>L. niastensis</i>	DSM 18481 ^T	MR2A	28
	<i>L. silvestris</i>	DSM 104734 ^T	MR2A	28
	<i>L. soli</i>	DSM 24712 ^T	MR2A	25
	<i>L. spongiicola</i>	DSM 21749 ^T	BMB	28
<i>Pseudaminobacter</i>	<i>P. salicylatoxidans</i>	DSM 6986 ^T	CASO	28

Tabla 6. (continuación)

Género	Especie	Cepa ^a	Medio ^b	Temperatura (°C) ^c
<i>Rhizorhobdus</i>	<i>R. argentea</i>	DSM 100912 ^T	MSR	28
	<i>R. dicambivorans</i>	DSM 107650 ^T	MR2A	28
	<i>R. wittichii</i>	DSM 6014 ^T	MR2A	30
<i>Sphingomonas</i>	<i>S. adhaesiva</i>	DSM 7418 ^T	TSB	28
	<i>S. canadensis</i>	DSM 29393 ^T	M1	28
	<i>S. dokdonensis</i>	DSM 21029 ^T	M1	25
	<i>S. endophytica</i>	DSM 101535 ^T	TSB	28
	<i>S. jeddahensis</i>	DSM 103790 ^T	TSB	28
	<i>Sphingomonas</i> sp.	DSM 14167	M1	26
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. acidaminiphila</i>	DSM 13117 ^T	M1	35
	<i>S. bentonitica</i>	DSM 103927 ^T	M1	28
	<i>S. chelatiphaga</i>	DSM 21508 ^T	M1	28
	<i>S. indicatrix</i>	DSM 28278 ^T	M1	28
	<i>S. nitritireducens</i>	DSM 12575 ^T	M1	30
	<i>S. pictorum</i>	DSM 19282 ^T	M1	28
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	DSM 14169	M1	30
	<i>S. terrae</i>	DSM 18941 ^T	TSB	28

^a DSM, Instituto Leibniz-Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares; CBS, CBS-KNAW Instituto Westerdijk-Colección holandesa de hongos y levaduras

^b La composición de los medios de cultivo es la determinada por la DSMZ

(<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms>)

La **Tabla 7** y la **Tabla 8** recogen los plásmidos y oligonucleótidos empleados en este trabajo, respectivamente.

Tabla 7. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Genotipo relevante	Origen
pURI3-Cter	Derivado de pT7-7, Amp ^R	Curiel et al., 2011
pURI3-Cter-afotasa	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter-anotasa	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter-blotasa	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter-cnotasa	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter-afotasa	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter-pssdo	Amp ^R	Este estudio
pLATE31	Derivado de pMB1, Amp ^R	<i>Thermo Scientific</i> (aLICator™)
pLATE31-cnp	Amp ^R	Este estudio
pLATE31-icotasa	Amp ^R	Este estudio
pLATE31-rwotasa	Amp ^R	Este estudio
pLATE31-sdotasa	Amp ^R	Este estudio
pLATE31-snah	Amp ^R	Este estudio
pLATE31-snotasa	Amp ^R	Este estudio
pMA-anotasa	Plásmido con el gen <i>anotasa</i> con el uso de codones optimizados para <i>E. coli</i>	<i>Thermo Scientific</i> (<i>GeneArt</i>)
pK18mob	Plásmido conjugativo derivado de pK18, Km ^R	Schäfer et al., 1994
pK18mob-fg-blotasa	Km ^R	Este estudio
pK18mob-fg-cnotasa	Km ^R	Este estudio
pRK600	Plásmido auxiliar para conjugación, Cm ^R	Kessler et al., 1992

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
63	CAGGCCTAACACATGCAAGTC
1224	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
1233	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
1387	GGGCGWGTGTACAAGGC
1945	AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTAACCCCATGATGGATACGGC
1946	GCTATTAATGATGATGATGATGATGCGGTTTTTGTGATCCATCATATA
1951	AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTCACAGTACTCACCCACGCCAC
1952	GCTATTAATGATGATGATGATGATGGACGAGCGCACCGTCGAGGTAGAC
1959	AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTCCGCCGAATTGCTTCAGCTAC
1960	GCTATTAATGATGATGATGATGATGCAGAAAAGGATTACGTGCATCTTC
1972	AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAGAACGAAAACTCGACCACGAG
1973	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATCTTCTGCCCTCGATCTTGGTGCG
1977	AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAGACCACGCCGGCCCCCATCTCC
1978	GCTATTAATGATGATGATGATGATGGCGCTGCGCCATCACCATGTAGTCC
2034	GCTCTAGAGGGGACTTCCACCTCGTC
2035	GGGTACCGGCCTTGATGACGGCCTG
2047	ATYCCCGMGTCACTCCACTGCCA
2048	AGSAGGCTCATCTCYTCGAGGTTT
2049	GAYGCCCTGCCYGTACAGGAACG
2050	TTTTCAATCATGAATTCAGG
2051	CACCTGCGCAAGCTCGGCATGGA
2052	TCCACATAGAACTCCGGCGAGTG
2057	GCTCTAGACCCACGTGGCGATTTTGA
2058	GGGTACCTTCTCCGGCACGATGTTT
2084	AGAAGGAGATATAACTATGTCCCAGAGTCCCCAGATCCTTTTC
2085	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGCCTTCGCGGCGGTGGATGCGGC
2090	AGAAGGAGATATAACTATGGCCAGCGGATCGACGGCCCTGC
2091	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTGGCGACGTCCCGGGCTGGCTG
2094	AGAAGGAGATATAACTATGGCCGAGGGCCAGCGCCCGGAGG
2095	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGCCTGCGCGCCGTGCAGGTAG
2096	AGAAGGAGATATAACTATGTGTGCCGAACCCGTGCGCCGTGCAC
2097	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCTGCTTGTAGATCACCCCGTCTTC
2104	AGAAGGAGATATAACTATGCGCGACGTCGTGGTCCATGCCGGC
2105	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCTGCGCGGCCGCGCTCCAGGGCTTC
2106	AGAAGGAGATATAACTATGCAGACGGCGGCGCCTCCTGCTCCG
2107	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCATCGGTGAGCGGCTTGGCCACGTCC
2110	AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTTCGTGATGCAAGCGC
2111	GCTATTAATGATGATGATGATGATGCAGAAACGGATTACGTGCATC
2114	ATGATTGAACAAGATGGATTGC
2115	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG
2156	ACNNGNGGNCA YAANGAYCCNACYAA
2157	CCNACNCCCATRCCNGTNCRRAA
2158	GCNTGYGGNCA YGAYGCNCA
2159	TTNACNGTNGCNGGRTTNCNTC
2160	GCNGTNGGNTAYGCNGARAA
2161	GGDATNCCNGCYTCNACCAT
2182	GARGGNGAYAMRGARCCNAAYGAYACNTC
2183	NCCNCCNARNCCYTTNACNGCNGCRAACAT
2186	GGNTTYACNAGYGTNCGNGA
2187	TCNGTNCRAANGCDATYTT
2188	CTNNGNGCNCARGTNATHAA
2189	CCRTGYTRCTNACNCC

Las dianas de restricción de las enzimas *KpnI* y *XbaI* aparecen subrayadas.

Se señalan en negrita las regiones homólogas a los vectores de expresión pURB3-Cter y pLATE31.

2 Medios y condiciones de cultivo

Cada microorganismo se cultivó siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor y en el medio sugerido por este, dicha información se encuentra recogida en la **Tabla 6**. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C (Sambrook & Russell, 2001). De forma general, todos los microorganismos se cultivaron en agitación a 140 rpm. Para los cultivos en medio sólido, se añadió al medio agar al 1,5%.

Para la expresión de proteínas heterólogas, se añadió al medio el inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,4 mM. En el caso de proteínas que presentaron dificultades de solubilidad, se utilizó medio LB suplementado con D-sorbitol (1 M) y glicina-betaína (2,5 mM) (Blackwell & Horgan, 1991) y la inducción se realizó añadiendo IPTG a una concentración final de 0,2 mM.

Para el cultivo de cepas portadoras de plásmidos con genes de resistencia a antibióticos, se añadió al medio ampicilina (100 μ g/ml), cloranfenicol (20 μ g/ml) o kanamicina (50, 100 o 1000 μ g/ml, dependiendo de la cepa a seleccionar). Para evitar el crecimiento de *E. coli* S17-1 λ pir y de *E. coli* HB101 (pRK600) en los experimentos de conjugación, se añadieron al medio antibióticos para los que la cepa receptora es naturalmente resistente: aztreonam (128 μ g/ml) para *Brevibacterium linens* DSM 20425^T (Troxler et al., 2001) y gentamicina (10 μ g/ml) para *Cupriavidus necator* DSM 13513^T (Xiong et al., 2018).

Las cepas se almacenaron en glicerol al 15% a -80 °C para su conservación a largo plazo.

3 Análisis bioinformático

La herramienta informática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) perteneciente al NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se empleó para la búsqueda de secuencias similares al gen de interés depositadas en las bases de datos del EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Los alineamientos múltiples de secuencia se realizaron mediante el programa *Clustal Omega* proporcionado por el EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

La predicción de la presencia de péptido señal se llevó a cabo utilizando el programa *SignalP 5.0* proporcionado por la Universidad Técnica de Dinamarca (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>).

Los parámetros relacionados con algunas características de las proteínas se obtuvieron mediante la herramienta *ProtParam* de *ExpASy*, proporcionada por el Instituto de bioinformática suizo (SIB) (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Las bases de datos *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>) e *InterPro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) del EMBL-EBI se emplearon para examinar los dominios presentes en las proteínas de interés. La base de datos de peptidasas *MEROPS* del EMBL-EBI se utilizó en el estudio de la clasificación de las proteínas (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>).

La predicción de la estructura tridimensional de la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* DSM 16503^T se realizó con el programa *AlphaFold* (Varadi et al., 2022; Jumper et al., 2021) por el Dr. José Miguel Mancheño del Instituto de Química Física Blas Cabrera (CSIC).

Las imágenes de las estructuras tridimensionales de las proteínas se obtuvieron con el programa *PyMOL* versión 2.5.0 (Schrödinger, 2010).

La posible alergenicidad de las proteínas se evaluó con las herramientas informáticas *AllerTOP v.2* (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) (Dimitrov et al., 2014) y *AlgPred 2.0* (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred2/>) (Sharma et al., 2021).

Para la identificación taxonómica de la especie bacteriana a través de la secuenciación del gen ARNr 16S, se utilizó la base de datos de secuencias de ARNr 16S *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

4 Técnicas de ADN

4.1 Extracción de ADN cromosómico

4.1.1 ADN bacteriano

La extracción de ADN cromosómico de las cepas bacterianas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). Los microorganismos se cultivaron en 10 ml del medio de cultivo correspondiente durante 18 h, en las condiciones indicadas por el proveedor (**Tabla 6**). Posteriormente, los cultivos se centrifugaron durante 15 min a 16000 × *g* y,

seguidamente, las células sedimentadas se lavaron con 500 µl de tampón TES (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM). La suspensión se centrifugó de nuevo durante 5 min a 16000 x g y el sedimento se resuspendió en 600 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Para proceder con la lisis celular, se añadió lisozima (10 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*, Alemania) y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se añadieron 80 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 20% agitando la mezcla por inversión. Para continuar con la purificación del ADN, las proteínas e impurezas se eliminaron realizando dos extracciones sucesivas, una con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y otra con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Finalmente, el ADN se obtuvo mediante precipitación al añadir NaCl 5 M (concentración final 0,2 M) y dos volúmenes de etanol 100% frío (-20 °C). La solución se mezcló por inversión hasta que se visualizó el ADN como un precipitado. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% frío (-20 °C) para eliminar las sales. Después, la muestra se dejó secar en una estufa a 37 °C hasta eliminar el etanol. El ADN así obtenido se rehidrató disolviéndolo en tampón TE y se conservó a -20 °C hasta su uso.

La concentración y la pureza del ADN se analizaron empleando un espectrofotómetro *NanoDrop*TM ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*, EEUU) y mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.1.2 ADN fúngico

La extracción de ADN cromosómico de la cepa de *Aspergillus niger* CBS 513.88 se realizó en colaboración con las Dras. Jéssica Gil Serna y Bélen Patiño Álvarez del Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), incluyendo algunas modificaciones en los protocolos descritos en la bibliografía por Querol et al. (1992) y Liu et al. (2000). El microorganismo se cultivó previamente en 20 ml de caldo Sabouraud (*Pronadisa*, España) a 28 °C durante 72 h con una agitación de 120 rpm. El cultivo se filtró a continuación empleando papel Whatman N°1 (*Sigma-Aldrich*, Alemania) y el micelio así obtenido se conservó a -80 °C hasta su procesado.

El micelio se trituró y homogeneizó con nitrógeno líquido. Tras ello, 100 mg se resuspendieron en 1 ml de una solución de sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, pH 8,0. A continuación, se añadieron 50 µl de Zymolyasa 20T (1,5 mg/ml) (*MP Biomedicals*, EEUU) y 50 µl de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (2 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*, Alemania). La mezcla se incubó 1 h a 37 °C, agitando cada 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C durante 3 min a 16000 x g. Para obtener el lisado celular, las células sedimentadas se resuspendieron en 500 µl de una

solución Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8,0 a la que se añadieron 13 μ l de SDS al 10%. La muestra se agitó y se incubó a 65 °C durante 5 min. Posteriormente, el ADN se purificó añadiendo 200 μ l de acetato potásico 5 M. La solución se dejó reposar 10 min en hielo y se centrifugó durante 15 min a 16000 x g a 4 °C. El ADN presente en el sobrenadante se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol frío y la mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 10 min a 16000 x g, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol al 70% frío (-20 °C). El ADN precipitado se centrifugó durante 5 min a 16000 x g y se dejó secar en una estufa a 37 °C hasta eliminar el etanol. El ADN así obtenido se rehidrató disolviéndolo en tampón TE y se conservó a -20 °C hasta su uso.

La concentración y la pureza del ADN se analizaron empleando un espectrofotómetro *NanoDrop*TM ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*, EEUU) y mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2 Extracción de ADN plasmídico

4.2.1 Extracción rápida

La extracción rápida de ADN plasmídico se llevó a cabo para la selección rutinaria de colonias de *E. coli* portadoras del plásmido con el gen de interés. En primer lugar, se tomó una colonia crecida en medio de cultivo sólido durante 18 h y se resuspendió en 20 μ l de solución de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, EDTA 25 mM, lizozima 0,5 mg/ml, RNasa 0,1 mg/ml, azul de bromofenol al 0,02% y glicerol al 0,015%). A continuación, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Tras la lisis celular, se procedió a la purificación del ADN añadiendo 5 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó la muestra y se centrifugó durante 2 min a 16000 x g. Finalmente, se emplearon 10 μ l de la fase acuosa conteniendo el ADN en una electroforesis convencional en gel de agarosa (Apartado 4.4 de Materiales y métodos). Las colonias transformadas con el plásmido portador del gen de interés se discriminaron de aquellas que contenían el plásmido sin inserto debido a la diferencia de tamaño causada por la presencia de dicho gen. Como control se empleó una colonia de *E. coli* DH10B transformada con el plásmido sin inserto, procesada del mismo modo que las muestras a analizar.

4.2.2 Extracción de alta pureza

En el caso de experimentos que requerían un ADN plasmídico de mayor pureza o más concentrado, la extracción se llevó a cabo utilizando el kit comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, Suiza). El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante. El ADN plasmídico extraído se conservó a -20 °C hasta su uso.

4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de ADN mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador *Axygen™ Maxygene II* (*Axygen Scientific*, EEUU).

Las mezclas de reacción contenían una mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), dos oligonucleótidos cebadores, tampón de reacción, una ADN polimerasa 5'→3' termoestable y, como molde, ADN cromosómico. En el caso de la amplificación del gen *anotasa* de *A. niger*, se utilizó también como molde el plásmido pMA-*anotasa* que contiene el gen que codifica la proteína AnOTasa sintetizado químicamente con el uso de codones optimizado para *E. coli* (*GeneArt, Thermo Fisher Scientific*, Alemania).

Se utilizaron dos ADN polimerasas termoestables diferentes, *Advantage® HD* (*Takara Biotechnology*, Japón) y *AmpliTaq Gold™* (*Applied Biosystems*, EEUU). La polimerasa *Advantage® HD* posee actividad correctora de errores 3'→5' exonucleasa y se utilizó para la clonación de los genes de interés. Esta polimerasa se empleó a una concentración final de 0,025 U/μl, en un tampón conteniendo MgCl₂ (5 mM), dNTPs (0,2 mM), cebadores (0,3 μM cada uno) y 100 ng aprox. de ADN molde. La polimerasa *AmpliTaq Gold™* carece de actividad correctora por lo que posee baja fidelidad y se utilizó para el resto de aplicaciones, como la detección de la presencia de genes de interés. Esta polimerasa se empleó a una concentración final de 0,05 U/μl, en un tampón conteniendo MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), cebadores (0,2 μM cada uno) y como molde se emplearon 100 ng aprox. de ADN. Los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron sintetizados por *Invitrogen* (*Thermo Fisher Scientific*, EEUU). En los casos en los que el ADN molde era rico en GCs se añadió DMSO al 5%, para favorecer la separación de las cadenas y mejorar el rendimiento de la amplificación (Varadharajan & Parani, 2021).

En función del tamaño del amplicón esperado y de la temperatura de fusión de los cebadores, se realizaron variaciones sobre el protocolo estándar de reacción (**Tabla 9**).

Tabla 9. Protocolos estándar de reacción de PCR.

	<i>Advantage® HD</i>	<i>AmpliTaq Gold™</i>
Desnaturalización inicial	-	94 °C - 10 min
Desnaturalización	98 °C - 10 s	90 °C - 1 min
Hibridación	55 °C - 5 s	55 °C - 1 min
Extensión	72 °C - 1 min/kb	72 °C - 1 min/kb
ciclos	35	30
Extensión final	72 °C - 7 min	72 °C - 10 min

Las temperaturas de hibridación se establecieron entre 3 y 5 grados por debajo de la temperatura de anillamiento del cebador con la temperatura de hibridación más baja.

La identificación taxonómica de la especie bacteriana se realizó mediante la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento interno de 1,3 kb del gen ARNr 16S. Para la amplificación de este fragmento se utilizaron los oligonucleótidos 63 y 1387 (Marchesi et al., 1998) (Tabla 8).

4.4 Electroforesis de ADN

El análisis de las muestras de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarosa D-1, Pronadisa, España) preparados a una concentración del 0,7 o 2% según el tamaño esperado de las muestras. Los geles se prepararon con tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,0, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM), el cual también se utilizó como electrolito. Las muestras de ADN se prepararon añadiéndoles un 20% de su volumen de tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25%, xilencianol FF al 0,25% y glicerol al 30% en agua). Las electroforesis se realizaron a 100 V. Al finalizar, los geles se tiñeron con *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, EEUU) siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor. Para visualizar los fragmentos de ADN se utilizó el sistema de captura y análisis de imágenes *Chemidoc XRS* (Bio-Rad, EEUU) empleando radiación ultravioleta (UV) ($\lambda=302$ nm). Como marcador de peso molecular se empleó *lambda-Eco14 Digest* (Takara Biotechnology, Japón).

El aislamiento y la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemania), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

4.5 Métodos de clonación

4.5.1 Método de clonación independiente de ligación

Para la producción de proteínas heterólogas, los genes de interés se clonaron inicialmente en el vector de expresión pURI3-Cter (Curiel et al., 2011) (**Figura 5**). Este plásmido pertenece a la familia de vectores pURI, empleados para la clonación de genes de interés mediante un método independiente de ligación descrito por De Las Rivas et al., (2007). Los vectores pURI son derivados del vector comercial pT7. El vector pURI3-Cter posee una secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región de unión al ribosoma (RBS). Esta secuencia líder continúa con el codón codificante de la metionina inicial seguida de una región intergénica no codificante de 230 pb, la cual presenta la diana de restricción *NotI*. A continuación, contiene una cola de afinidad que codifica seis residuos de histidina seguidos de cuatro codones de terminación en tándem, lo que posibilita la purificación de la proteína producida mediante cromatografía de afinidad en un único paso. Como marcador de selección contiene un gen de resistencia a ampicilina (De Las Rivas et al., 2007) (**Figura 5**).

Respecto al proceso de clonación, en primer lugar, se amplificaron los genes de interés a partir del ADN cromosómico del microorganismo del modo descrito en el Apartado 4.1 de Materiales y métodos. Los oligonucleótidos empleados como cebadores se diseñaron con extremos 5' complementarios a regiones presentes en el vector de expresión. De este modo, mediante una segunda reacción de amplificación en la que se empleó el vector como molde y el gen de interés como cebador, los extremos 5' pueden hibridar con el plásmido, posibilitando a la ADN polimerasa amplificar la totalidad del plásmido y, por consiguiente, la inserción del gen de interés en el mismo.

Tras el proceso de clonación, se realizó una digestión con *DpnI* (Roche, Suiza) del producto de la segunda reacción de amplificación, incubando la mezcla a 37 °C, 18 h aproximadamente. La enzima de restricción *DpnI* digiere exclusivamente secuencias metiladas, por lo que permite eliminar los posibles restos de plásmido molde. Además, como una segunda estrategia para eliminar restos de plásmidos sin inserto, se realizó una segunda digestión con la enzima *NotI* (Takara Biotechnology, Japón) incubando la mezcla a 37 °C durante 4 h, siempre y cuando el gen de interés no presentase diana de restricción para dicha enzima. La diana para la enzima de restricción *NotI* se encuentra en el segmento no codificante de 230 pb presente sólo en el plásmido pURI3-Cter original (sin inserto). A continuación, ambas enzimas se inactivaron mediante una incubación a 65 °C durante 25 min. Finalmente, el producto de las digestiones se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH10B (Apartado 4.7.1 de Materiales y métodos).

En algunos casos, en los que no fue posible la clonación en el vector pURI3-Cter, la clonación de los genes de interés se realizó empleando el vector comercial pLATE31 (*Thermo Fisher Scientific*, EEUU) (**Figura 5**). De forma similar al vector pURI3-Cter, la clonación en este vector se realiza mediante un método independiente de ligación y da lugar a una proteína recombinante con una cola de seis histidinas en su extremo C-terminal que se puede purificar mediante cromatografía de afinidad. Además, como marcador de selección también contiene un gen de resistencia a ampicilina. Una característica distintiva de este vector es la incorporación del gen que codifica la proteína LacI, proteína represora de la expresión de genes que se encuentran bajo el control del promotor *lac*. LacI se encuentra unida a la región del operador (*lacO*), la presencia del inductor (IPTG) desplaza la proteína represora, permitiendo la expresión del gen de interés (**Figura 5**) (Santillán & Mackey, 2008). La presencia de este represor supone una barrera adicional para minimizar el posible escape del promotor. La clonación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Curiel et al. (2022).

Brevemente, los genes de interés se amplificaron utilizando los oligonucleótidos recogidos en la **Tabla 8** (Apartado 1 de Materiales y métodos), los cuales se diseñaron con extremos 5' complementarios a regiones presentes en el vector de expresión. Como paso previo a la clonación, el plásmido se incubó con la enzima de restricción *BsaI* durante 2 h a 50 °C para linealizar el plásmido. Tras la incubación, el producto de la digestión se purificó en geles de agarosa (Apartado 4.4 de Materiales y métodos). A continuación, el plásmido linealizado se incubó con ADN polimerasa T4 (*Thermo Fisher Scientific*, EEUU) y dCTP para generar extremos cohesivos 5' y 3', necesarios para la inserción del gen. La enzima ADN polimerasa T4 posee actividad polimerasa 5' → 3' y actividad exonucleasa 3' → 5'. La ausencia de dATP, dTTP y dGTP hace que la enzima ejerza su actividad exonucleasa hasta que encuentra el primer residuo de citosina. La reacción con la polimerasa se incubó 15 min a 22 °C y, posteriormente, se inactivó durante 10 min a 75 °C. Paralelamente, se realizó una reacción con el gen de interés, ADN polimerasa T4 y dGTP para, de igual manera que con el vector, generar extremos cohesivos mediante la actividad exonucleasa 3' → 5' de la polimerasa. La reacción se incubó durante 5 min a 22 °C y se inactivó añadiendo EDTA 0,5 M (concentración final 30 mM) a pH 8,0. Seguidamente, el gen de interés y el vector pLATE31, previamente tratados con la polimerasa, se mezclaron y la solución se incubó 5 min a temperatura ambiente. En esta reacción, la hibridación del gen y el vector se produce en ausencia de ADN ligasa. Finalmente, todo el volumen de reacción se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH10B (Apartado 4.7.1 de Materiales y métodos).

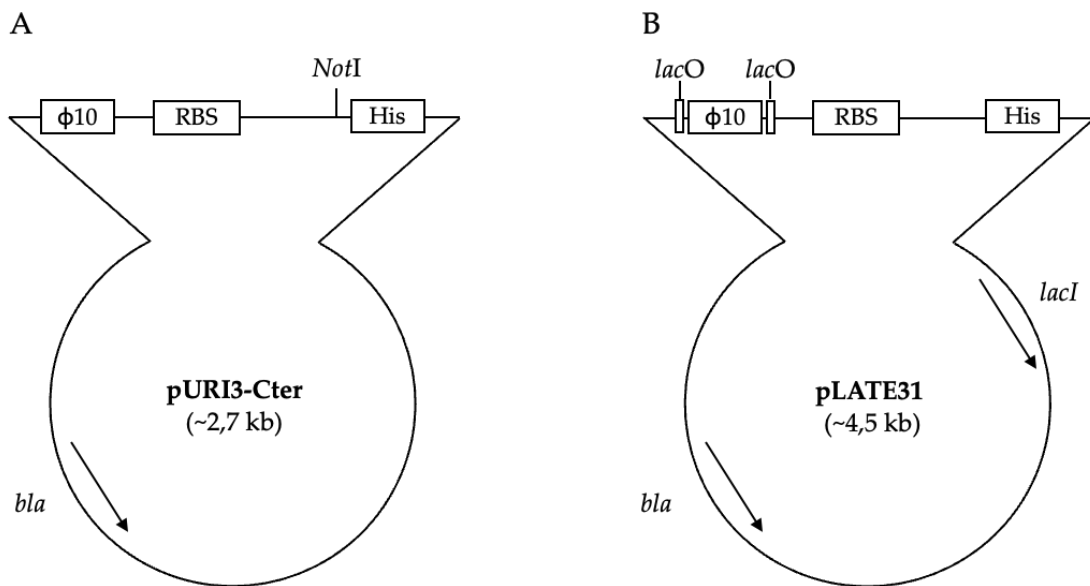


Figura 5. Esquema de los vectores de expresión empleados en esta tesis. (A) pURI3-Cter. (B) pLATE31. Se indican $\phi 10$, promotor $\phi 10$; RBS, sitio de unión al ribosoma; His, cola de histidinas; *NotI*, sitio de restricción de la enzima *NotI*; *lacO*, operador *lac*; *lacI*, gen que codifica LacI; *bla*, gen que codifica la β -lactamasa.

4.5.2 Método de clonación con enzimas de restricción

La clonación con enzimas de restricción se realizó siguiendo protocolos descritos previamente (Sambrook & Russell, 2001). Este método se empleó para clonar un fragmento interno del gen de interés en el vector pK18mob. Dicha construcción se realizó con el objetivo de interrumpir los genes que codifican las proteínas degradadoras de OTA en *Brevibacterium linens* DSM 20425^T y *Cupriavidus necator* DSM 13513^T. De modo que la interrupción se produciría mediante un proceso de inserción-duplicación por recombinación homóloga, ya que el vector pK18mob carece de un origen de replicación utilizable por estas bacterias (Schäfer et al., 1994).

Los fragmentos de los genes de interés se amplificaron mediante PCR empleando como molde ADN cromosómico de *B. linens* DSM 20425^T o *C. necator* DSM 13513^T. Los oligonucleótidos se diseñaron incorporando las dianas de restricción de las enzimas *KpnI* y *XbaI*. Posteriormente, el fragmento amplificado y el vector se digirieron con ambas enzimas de restricción durante 2 h a 37 °C y, seguidamente, la reacción se incubó durante 20 min a 65 °C para su inactivación. A continuación, la digestión se purificó en geles de agarosa (Apartado 4.4 de Materiales y métodos) y se ligó empleando la enzima ADN ligasa T4 (*USB® Affymetrix*, EEUU), incubando la mezcla a 4 °C durante 18 h. Finalmente, el producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH10B (Apartado 4.7.1 de Materiales y métodos).

4.6 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó con un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377* (*Applied Biosystems*, EEUU) en la empresa *Secugen S.L.* (España) utilizando el kit de secuenciación *BigDye® Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*, EEUU) y empleando *AmpliTaq FS* (*Applied Biosystems*, EEUU) como ADN polimerasa. Las secuencias se importaron mediante el programa *Chromas* (*Technelysium Pty Ltd*, Australia).

4.7 Modificación genética de cepas bacterianas

4.7.1 Transformación genética de *Escherichia coli*

La transformación genética de *E. coli* se realizó siguiendo un procedimiento de choque térmico sobre células competentes obtenidas mediante el método de cloruro de rubidio descrito por Hanahan (1983). La preparación de las células competentes se realizó a partir de una colonia de *E. coli* DH10B o *E. coli* BL21 (DE3) en 100 ml de medio LB, hasta alcanzar un DO_{600} de 0,48. El cultivo se mantuvo en hielo durante 30 min y, posteriormente, se centrifugó a $8000 \times g$ durante 7 min a 4 °C. Las células sedimentadas se resuspendieron en 30 ml de solución TFBI (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KOAc 30 mM, CaCl₂ 10 mM y 15% glicerol) durante 90 min a 4 °C. A continuación, la suspensión de células se centrifugó a $8000 \times g$ durante 7 min a 4 °C. Posteriormente, el sedimento se resuspendió suavemente en 4 ml de solución TFBII (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y 15% glicerol) hasta conseguir una suspensión homogénea. La suspensión se repartió en alícuotas de 200 µl, las cuales se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La transformación de las células competentes de *E. coli* se llevó a cabo incubándolas con 100 ng aprox. del plásmido de interés en hielo durante 15 min, seguido inmediatamente de una incubación de 3 min a 37 °C y de 5 min en hielo. Para la recuperación de las células, se añadió 1 ml de LB y se incubó 1 h a 37 °C. Pasado ese tiempo, el cultivo se inoculó en placas de medio LB conteniendo el antibiótico necesario para la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron en una estufa a 37 °C hasta la aparición de colonias.

4.7.2 Conjugación triparental en *Brevibacterium linens* y *Cupriavidus necator*

El protocolo utilizado para la conjugación de ambos microorganismos con *E. coli* fue proporcionado por la Dra. Beatriz Galán del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC). Como cepa donadora, se empleó la cepa *E. coli* S17-1 λ pir transformada con las construcciones del plásmido pK18mob conteniendo fragmentos internos de los genes a interrumpir. Como cepas receptoras, se utilizaron *B. linens* DSM 20425^T y *C. necator* DSM 13513^T. Finalmente, como cepa auxiliar, se empleó la cepa *E. coli* HB101 transformada con el plásmido pRK600.

Se realizó un inóculo de 10 ml de cada una de las cepas empleadas, que se incubó 18 h en agitación a la temperatura óptima de crecimiento de cada una de las cepas. Las cepas *B. linens* DSM 20425^T y *C. necator* DSM 13513^T se inocularon en medio LB, *E. coli* S17-1 λ pir transformada con el plásmido a conjugarse se inoculó en LB suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) y *E. coli* HB101 (pRK600) se cultivó en LB suplementado con cloranfenicol (20 μ g/ml). Posteriormente, se recogieron 4 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 10000 x g durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con 2 ml de solución salina (NaCl 0,9%). La suspensión se centrifugó de nuevo y las células sedimentadas se resuspendieron en 300 μ l de solución salina. A continuación, se tomaron 50 μ l de cada cepa y se prepararon cuatro mezclas, dos de ellas fueron controles negativos, una mezcla de cepas para la conjugación biparental y otra para la conjugación triparental. Los controles negativos fueron: cepa donadora y cepa auxiliar o cepa receptora y cepa auxiliar. La mezcla para la conjugación biparental contenía cepa donadora y cepa receptora, y la triparental contenía cepa donadora, cepa receptora y cepa auxiliar.

Previamente, en una placa de medio LB, se colocaron cuatro filtros de 25 mm de diámetro y 0,22 μ m de tamaño de poro (*Millipore*, EEUU). En el centro de cada uno de los filtros se dispusieron 100 μ l de cada una de las mezclas de conjugación. La placa se incubó a 30 °C durante 20 h. Pasado ese tiempo, se recogió la muestra celular de cada filtro lavándolo con 1 ml de solución salina. Finalmente, las células presentes en la solución salina se sembraron en placas de medio LB selectivo. Para la selección de conjugantes de *B. linens*, se utilizó LB suplementado con kanamicina (100 μ g/ml) y aztreonam (128 μ g/ml). Puesto que *B. linens* es resistente a aztreonam y *E. coli* es sensible al mismo, la suplementación de este antibiótico permite únicamente el crecimiento de *B. linens*. En el caso de *C. necator*, resistente a gentamicina, la selección de conjugantes se realizó sembrando en placas de medio LB suplementado con kanamicina (1000 μ g/ml) y gentamicina (10 μ g/ml), puesto que *E. coli* es sensible a este antibiótico.

La correcta construcción de los transconjugantes se analiza, en primer lugar, comprobando la presencia del plásmido pK18mob en el interior de las células transformadas, amplificando para ello el gen que confiere resistencia a kanamicina mediante PCR con los oligonucleótidos 2114 y 2115 (**Tabla 8**). Posteriormente, la interrupción del gen de interés se analiza mediante la ausencia de amplificación de dicho gen completo, utilizando los oligonucleótidos 1951 y 1952 en el caso del gen de *B. linens* y 1977 y 1978 en el caso del gen de *C. necator*. Finalmente, la correcta integración de los plásmidos en el ADN cromosómico, interrumpiendo los genes de interés, se analiza mediante dos reacciones de PCR, utilizando un oligonucleótido complementario al plásmido y un oligonucleótido complementario al gen de interés. En el caso de *B. linens* se utilizaron los oligonucleótidos 1224 y 1952, 1233 y 1951; para *C. necator* se utilizaron los oligonucleótidos 1224 y 1978, 1233 y 1977 (**Tabla 8**).

5 Técnicas de proteínas

5.1 Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos se realizaron cultivos bacterianos en 250 ml del medio correspondiente, en las condiciones de crecimiento indicadas por el proveedor (DSMZ). Posteriormente, las células se recogieron centrifugando a $10000 \times g$ durante 15 min a 4 °C. Las bacterias sedimentadas se lavaron con solución salina (NaCl 0,9%) con el fin de eliminar restos del medio y, seguidamente, se resuspendieron en tampón MOPS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. Para realizar la lisis, la suspensión celular se sometió a diez pases por una mini prensa de French (*Amicon French pressure cell, SLM instruments, EEUU*) a una presión de 500 psi. El lisado celular se centrifugó a $47000 \times g$ durante 40 min para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante así obtenido se filtró a través de filtros de 0,22 μm de tamaño de poro (*Millipore, EEUU*). Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C. Los extractos de proteínas se emplearon para los ensayos correspondientes en el momento de su preparación.

La correcta lisis celular y la consecuente obtención de los extractos proteicos se confirmó estimando la concentración de proteínas presentes en el extracto midiendo su absorbancia ($\lambda=280 \text{ nm}$) con un espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU)* y mediante electroforesis en gels de poliacrilamida (Apartado 5.3 de Materiales y métodos).

5.2 Hiperproducción y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas de interés se hiperprodujeron y purificaron para llevar a cabo el estudio de su actividad frente a OTA y para su caracterización bioquímica. Los genes que codifican las proteínas de interés se clonaron en los vectores de expresión pURI3-Cter y pLATE31 (Apartado 4.5.1 de Materiales y métodos). Estos vectores contienen un promotor de expresión inducible por IPTG y producen una proteína que contiene una secuencia que codifica una cola de afinidad de histidinas, que posibilita la purificación de las proteínas recombinantes en un solo paso cromatográfico. El plásmido recombinante se propagó en *E. coli* DH10B, mientras que para llevar a cabo la posterior expresión del gen de interés se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3).

Las colonias de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido recombinante se cultivaron en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C. La hiperproducción de las proteínas se indujo añadiendo al cultivo IPTG a una concentración final de 0,4 mM cuando la DO₆₀₀ del cultivo alcanzó valores entre 0,4 y 0,6. La inducción se llevó a cabo a 22 °C durante 18 h. Algunas de las proteínas estudiadas en este trabajo presentaron problemas de solubilización al hiperproducirlas de este modo, en estos casos los cultivos se incubaron a 22 °C durante 5 días en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml), D-sorbitol (1 M) y glicina-betaína (2,5 mM). Para la inducción de estos cultivos, se añadió IPTG (0,2 mM) en el momento de la inoculación (Santamaría et al., 2018). Tras la inducción, las células se recogieron mediante centrifugación a 10000 x g durante 15 min a 4 °C. Las células sedimentadas se resuspendieron en tampón MOPS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. Posteriormente, las células de *E. coli* se lisaron realizando tres pases en la prensa de French a una presión de 1000 psi (*Amicon French pressure cell, SLM instruments, EEUU*). La fracción insoluble del lisado se descartó tras un paso de centrifugación a 47000 x g durante 40 min a 4 °C. Finalmente, la fracción conteniendo las proteínas solubles se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (*Millipore, EEUU*). El extracto proteico filtrado se mezcló con 2 ml de resina *TALON[®] metal affinity (Clontech, Takara, EEUU)* durante 20 min en un agitador de rodillos, con el fin de que la proteína de interés, conteniendo la cola de seis histidinas, se uniese a la resina. Previamente, la resina se equilibró empleando el mismo tampón utilizado para la resuspensión de las células. Tras la incubación con la resina, se realizó un primer lavado utilizando tampón MOPS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0, y un segundo lavado con este mismo tampón al que se le añadió imidazol a una concentración final de 10 mM, para eliminar posibles uniones inespecíficas a la resina. Finalmente, la proteína de interés se eluyó añadiendo 150 mM de imidazol al tampón MOPS descrito. La enzima así eluída se dializó frente a tampón MOPS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 a 4 °C realizando tres cambios de tampón (500 ml aprox./cambio) en 18 h, utilizando membranas de diálisis (*OrDial D35-MWCO*

3500, Orange Scientific, Bélgica) de 3,5 kDa de diámetro de poro, con el objetivo de eliminar el imidazol presente en la solución de proteína recombinante.

La pureza de la proteína se determinó en geles de poliacrilamida (Apartado 5.3 de Materiales y métodos). La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia ($\lambda=280$ nm) en un espectrofotómetro *UVmini-1240* (Shimadzu, Japón), mediante la Ley de Lambert-Beer, utilizando el coeficiente de extinción molar teórico de cada proteína obtenido con el software *ProtParam tool* de *ExpASY* (<https://web.expasy.org/protparam/>).

5.3 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS. La técnica emplea geles de poliacrilamida a una concentración de acrilamida dependiente del tamaño molecular de las proteínas a analizar (Laemmli, 1970). Generalmente, debido al tamaño de las proteínas producidas, las proteínas estudiadas se analizaron en geles del 12,5% de acrilamida. La electroforesis se realizó empleando como electrolito tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 10 min en presencia de tampón Tris-HCl 6,5 mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,005%. La electroforesis se realizó a 120 mV durante aproximadamente 90 min. Al finalizar, los geles se tiñeron empleando azul brillante de Coomassie R-250 (*Sigma-Aldrich*, Alemania). Como marcador de peso molecular se utilizó *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range* (*Bio-Rad*, EEUU).

6 Ensayos de actividad enzimática

6.1 Destoxificación de ocratoxina A

6.1.1 Destoxificación mediante cultivos bacterianos y extractos proteicos

Para evaluar la capacidad de degradación de OTA de las distintas bacterias utilizadas en este estudio, éstas se cultivaron en 10 ml del medio de cultivo y condiciones de crecimiento recomendadas por el proveedor (DSMZ). Al medio de cultivo se añadieron 2 μ g/ml de OTA a partir de un stock con una concentración de 1 mg/ml. El stock de OTA (*Sigma-Aldrich*, Alemania) se preparó disolviéndola en metanol en condiciones estériles. De forma general, los cultivos se incubaron durante siete días. Pasado ese tiempo, los cultivos se centrifugaron

durante 15 min a 8000 x g. En este punto, se recolectó tanto el sobrenadante como las células sedimentadas para su posterior análisis por separado. El sobrenadante se diluyó con fase móvil en una proporción 1:1 y, seguidamente, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (*Millipore*, EEUU) para analizar la presencia de OTA mediante HPLC (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos). Las células sedimentadas se lavaron con 2 ml de metanol durante 1 h en agitación, para extraer la OTA que pudiese haber quedado adherida a las paredes celulares. A continuación, se realizó una centrifugación de 10 min a 8000 x g. Tras este paso, se recogió el sobrenadante y las células sedimentadas se lavaron de nuevo. Finalmente, se evaporó el metanol incubando las muestras a 60 °C durante 18 h aproximadamente y el residuo seco se reconstituyó con 500 µl de fase móvil. Seguidamente, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (*Millipore*, EEUU) para el análisis de la presencia de OTA mediante HPLC (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos).

Para la detección de OTα en el sobrenadante de los cultivos bacterianos fue necesaria su extracción mediante columnas de inmunoafinidad. Puesto que, en las condiciones utilizadas en el ensayo, la OTα queda enmascarada por otros compuestos presentes en el sobrenadante y procedentes del medio de cultivo. La extracción de OTα se llevó a cabo empleando las columnas de inmunoafinidad *OchraTest WB™* (*VICAM*, EEUU) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, 5 ml del sobrenadante de los cultivos se diluyeron con 5 ml de solución de dilución (1% polietilenglicol, 5% NaHCO₃, pH 8,3) y, seguidamente, la mezcla se pasó a través de la columna de inmunoafinidad. A continuación, se pasaron por la columna 5 ml de una solución de lavado (2,5% NaCl, 0,5% NaHCO₃) y, posteriormente, 5 ml de agua MilliQ. La elución de la micotoxina y sus productos de degradación se realizó con 2 ml de metanol. El metanol se evaporó incubando la muestra a 60 °C durante 18 h aproximadamente. Finalmente, la muestra se resuspendió en 500 µl de fase móvil y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (*Millipore*, EEUU), para su posterior análisis mediante HPLC (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Como controles se emplearon: medio de cultivo, medio de cultivo conteniendo OTA (2 µg/ml) y medio de cultivo sin OTA inoculado con la bacteria correspondiente.

En algunos casos, el ensayo de actividad degradadora de OTA se realizó utilizando extractos proteicos libres de células (Apartado 5.1 de Materiales y métodos). La actividad de estos extractos se examinó frente a 2 µg/ml de OTA, incubando las reacciones a 37 °C durante 18 h. Para detener la reacción, las muestras se incubaron 5 min a 95 °C y, a continuación, se centrifugaron 5 min a 16000 x g. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de

poro (*Millipore*, EEUU) y se analizó mediante HPLC (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.1.2 Destoxificación mediante proteínas puras

La transformación enzimática de OTA y OTB se estudió incubando las enzimas puras en presencia de cada una de estas toxinas. Se preparó una solución stock de OTA (*Sigma-Aldrich*, Alemania) y OTB (*Apollo Scientific*, Reino Unido) (1 mg/ml) en metanol. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0, empleando 15 µg de enzima y añadiendo OTA u OTB a una concentración final de 2 µg/ml. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 18 h. La reacción se detuvo mediante incubación a 95 °C durante 5 min y posterior centrifugación 5 min a 16000 x g. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (*Millipore*, EEUU), para su análisis mediante HPLC (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y como control se emplearon reacciones en ausencia de enzima.

6.1.3 Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El estudio de la presencia de OTA, OTB y de sus productos de degradación en los ensayos de transformación de ocratoxinas se realizó mediante análisis por HPLC.

El análisis se realizó en un equipo cromatográfico *Thermo* (*Thermo Electron Corporation*, EEUU) equipado con un desgasificador, una bomba *P400 SpectraSystem*, un inyector de muestras automático *AS3000*, un detector de fluorescencia (FLD) *FL3000* y un detector de *diodo-array* (DAD) *UV6000LP*. La separación se realizó en una columna de fase reversa *Nova-Pak*[®] C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm tamaño de partícula) (*Waters*, EEUU). Como fase móvil se utilizó: eluyente A (acetonitrilo), eluyente B (agua:acetonitrilo:ácido acético glacial (89:10:1, v/v/v) a temperatura ambiente; eluyente A:B = 25:75 (v/v), en isocrático; flujo: 1,3 ml/min; tiempo de análisis: 20 min; detector FLD ($\lambda_{\text{ex}}=330$ nm, $\lambda_{\text{em}}=460$ nm); detector DAD ($\lambda=330$ nm); volumen de inyección: 20 µl. OTA, OTB y el producto de degradación OT α se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con estándares comerciales. El estándar de OT α se adquirió en una solución de acetonitrilo (10 µg/ml) (*LGC Standards*, Reino Unido). El procesamiento de los datos se realizó mediante el paquete informático *Chromquest 4.2.34 Chromatography Data System* (*Thermo Electron Corporation*, EEUU).

6.2 Caracterización enzimática

Las enzimas recombinantes producidas que fueron capaces de hidrolizar OTA se caracterizaron bioquímicamente. Debido a la toxicidad de OTA, para el estudio bioquímico se utilizó como sustrato N-(4-metoxifenilazoformil)-L-fenilalanina (4MF) (*Bachem*, Suiza), análogo de OTA (**Anexo I**). La actividad enzimática de las proteínas puras se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbancia ($\lambda=350$ nm) resultante de la hidrólisis del 4MF. Los moles de 4MF hidrolizados se determinaron empleando la Ley de Lambert-Beer, conociendo su coeficiente de extinción molar ($19000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Dobritzsch et al., 2014), el paso óptico (0,43 cm) y teniendo en cuenta el volumen final de la reacción (150 μl). Se preparó una solución stock de 4MF 55 mM en DMSO. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos añadiendo 4MF a una concentración final de 0,1 mM. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de placas *PowerWave HT* (*Biotek*, EEUU). Las reacciones se realizaron de manera estándar a 37 °C durante 15 min en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0.

Para realizar la caracterización físicoquímica de las proteínas recombinantes producidas, en primer lugar, fue necesario determinar la cantidad de enzima a emplear dependiendo de la actividad específica de cada una de las proteínas. Con este fin, se realizaron ensayos utilizando diferentes cantidades de enzima (μg o ng) frente a 4MF (0,1 mM) en las condiciones previamente definidas como estándar. Finalmente, se seleccionó para cada proteína la cantidad de enzima que permitía realizar los ensayos en condiciones de saturación de sustrato.

El pH óptimo de reacción de las enzimas se determinó realizando la reacción estándar con 4MF (0,1 mM) en tampones ajustados a distintos valores de pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 y 9,0). Los tampones empleados fueron: tampón citrato sódico 50 mM para los valores de pH 3,0 a 6,0 y tampón Bis-Tris propano 50 mM para los valores de pH 6,5 a 9,0. La actividad relativa a cada pH se determinó en función del valor de absorbancia más alto obtenido en el ensayo.

El estudio de la temperatura óptima de reacción de las enzimas se realizó modificando la temperatura de incubación en la reacción estándar. Las enzimas se incubaron con 4MF (0,1 mM) a diferentes temperaturas comprendidas entre 4 y 65 °C (4, 20, 30, 37, 40, 45, 55 y 65 °C). En el caso de enzimas cuya actividad continuaba aumentando a los 65 °C, se incluyeron también reacciones a 75 y 85 °C. La actividad relativa a cada temperatura se determinó en función del valor de absorbancia más alto obtenido en el ensayo.

La estabilidad térmica de las enzimas se determinó preincubándolas en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0 a diferentes temperaturas (20, 30, 37,

45, 55 y 65 °C) durante diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6 y 20 h). Tras los periodos de preincubación, se determinó la actividad residual de las enzimas realizando la reacción colorimétrica estándar con 4MF (0,1 mM). La actividad residual se determinó en función del valor de absorbancia obtenido por la reacción con la enzima no sometida a tratamiento térmico.

El estudio del efecto de la presencia de metales y otros aditivos se llevó a cabo preincubando las enzimas durante 5 min a temperatura ambiente en presencia de cada uno de los aditivos a una concentración final de 1 mM. Para ello, se prepararon soluciones stock en agua o etanol, dependiendo de la solubilidad del aditivo, a una concentración final de 25 mM. Pasados los 5 min de preincubación, se añadió 4MF (0,1 mM) y se llevó a cabo la reacción estándar. Como control se emplearon reacciones en ausencia de enzima (tampón, aditivo y sustrato). La actividad relativa se determinó en función del valor de absorbancia obtenido por la reacción de la enzima con el sustrato en ausencia de aditivos. En el estudio se incluyeron los siguientes aditivos: cationes monovalentes (KCl), cationes divalentes (CaCl₂, HgCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, NiCl₂, FeCl₂ y MnCl₂), un inhibidor de proteasas (PMSF) y agentes quelantes (EDTA, 1,10-fenantrolina y 8-hidroxiquinolina).

Con el objetivo de conocer la especificidad de sustrato de las enzimas estudiadas, se ensayó la actividad hidrolítica de la enzima pura frente a diversos sustratos. La actividad endopeptidasa se evaluó incubando la enzima con 0,015 mM de albúmina de suero bovino (BSA) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0 durante 18 h a 37 °C. Tras la incubación, la posible degradación de BSA se monitorizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Apartado 5.3 de Materiales y métodos). A continuación, se estudió la actividad de las enzimas frente a una colección de sustratos sintéticos con diferentes aminoácidos en su posición C-terminal (**Tabla 10**). Todos los sustratos ensayados se adquirieron a *Sigma-Aldrich* (Alemania) y sus estructuras químicas se muestran en el **Anexo I**. Se prepararon soluciones stock de cada uno de ellos a una concentración final de 25 mM en agua o etanol, dependiendo de su solubilidad. La concentración final de los sustratos en la reacción fue 1 mM. Las reacciones se realizaron en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0 a 37 °C durante 1 h. En el caso de las enzimas que en la caracterización fisicoquímica no fueron capaces de degradar el análogo de OTA, 4MF, en tiempos comprendidos entre 15 min y 4 h, las reacciones con los sustratos se prolongaron durante 18 h.

Tabla 10. Sustratos sintéticos empleados en este trabajo.

Sustrato	Abreviatura
Hipuril-fenilalanina (N-benzoil-glicil-fenilalanina)	HF
Hipuril-arginina (N-benzoil-glicil-arginina)	HR
Glicil-L-alanina	GA
Glicil-L-fenilalanina	GF
Derivados N-acetil	
N-acetil-L-alanina	AA
N-acetil-L-ácido aspártico	AD
N-acetil-L-ácido glutámico	AE
N-acetil-L-fenilalanina	AF
N-acetil-L-lisina	AK
N-acetil-L-leucina	AL
N-acetil-L-metionina	AM
N-acetil-L-asparagina	AN
N-acetil-L-prolina	AP
N-acetil-L-glutamina	AQ
N-acetil-L-tirosina	AY
Derivados N-carbobenciloxi	
N-carbobenciloxi-L-alanina	ZA
N-carbobenciloxi-L-ácido aspártico	ZD
N-carbobenciloxi-L-ácido glutámico	ZE
N-carbobenciloxi-L-fenilalanina	ZF
N-carbobenciloxi-L-isoleucina	ZI
N-carbobenciloxi-L-lisina	ZK
N-carbobenciloxi-L-leucina	ZL
N-carbobenciloxi-L-metionina	ZM
N-carbobenciloxi-L-asparagina	ZN
N-carbobenciloxi-L-prolina	ZP
N-carbobenciloxi-L-glutamina	ZQ
N-carbobenciloxi-L-serina	ZS
N-carbobenciloxi-L-tirosina	ZY

La hidrólisis de los distintos sustratos se determinó mediante el método modificado de ninhidrina-cadmio (Nh-Cd) descrito por Doi et al., (1981). Este método cuantifica la presencia de aminoácidos libres en una solución, mediante una reacción colorimétrica originada por la reacción de la ninhidrina con el grupo amino del aminoácido, produciéndose una oxidación y liberándose amonio. La ninhidrina reducida y el amonio liberado se condensan junto con otra molécula de ninhidrina produciendo un producto púrpura con un máximo de absorbancia a 507 nm. En el caso de los sustratos que contienen prolina, la reacción da lugar a un producto amarillo con un máximo de absorbancia a 440 nm. La determinación de los aminoácidos liberados en las reacciones de la enzima con los distintos sustratos se realizó añadiendo dos volúmenes del reactivo Nh-Cd, el cual, al mismo tiempo, detiene la reacción de la enzima con el sustrato. El reactivo Nh-Cd se compone de 87,9% (v/v) de una solución de ninhidrina (*Merck*, Alemania) 56 mM en etanol, 11% (v/v) de ácido acético y 1,1% (v/v) de una solución de CdCl₂ (1 g/ml) en agua. La reacción con Nh-Cd se incubó durante 5 min a 84 °C y se detuvo incubándola inmediatamente en hielo. Posteriormente, se midió la absorbancia ($\lambda=507$ nm o, en el caso de sustratos con prolina, $\lambda=440$

nm) en un espectrofotómetro *UVmini-1240* (Shimadzu, Japón). La concentración de los aminoácidos liberados se determinó interpolando en una recta patrón realizada con el aminoácido correspondiente, en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 1 mM. En determinadas ocasiones fue necesario preparar diluciones de las muestras con el objetivo de que los resultados se encontrasen dentro del intervalo lineal de respuesta del método. La actividad relativa se determinó en función del valor de absorbancia obtenido por la reacción con el sustrato para el que la enzima presentó mayor actividad de cada uno de los grupos (N-benzoil-glicil aminoácidos, N-glicil-L-aminoácidos, N-acetil-L-aminoácidos o N-carbobenciloxi-L-aminoácidos).

Todos los ensayos de caracterización se realizaron por triplicado y como control se emplearon reacciones en ausencia de enzima.

6.3 Transformación de ácido gentísico y ácido salicílico

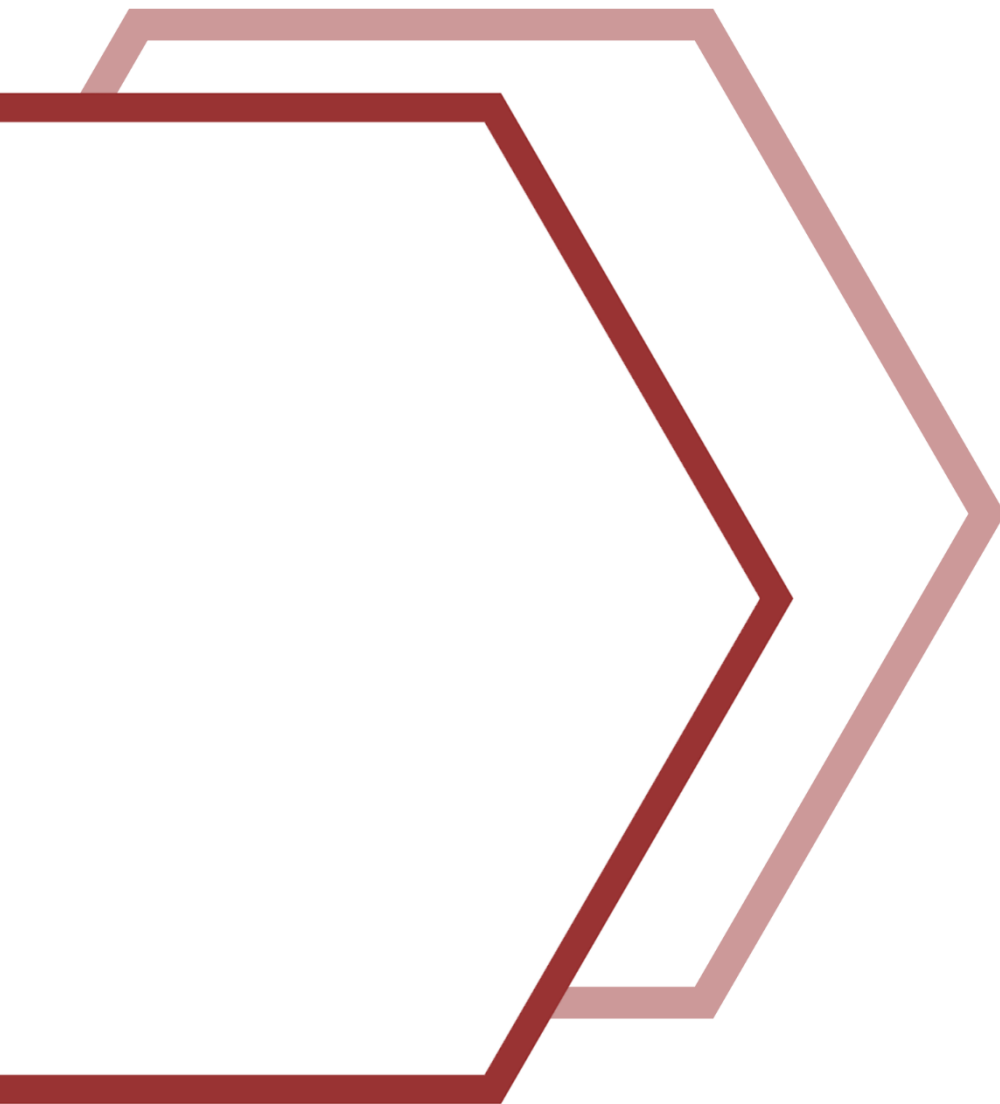
Para verificar la actividad dioxigenasa sobre ácidos mono- y dihidroxilados de la enzima salicilato 1,2-dioxigenasa de *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986^T (PsSDO), ésta se incubó en presencia de ácido salicílico y gentísico, respectivamente. Para ello, se prepararon soluciones stock de ácido gentísico y ácido salicílico (25 mM) en agua. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0, empleando 15 µg de enzima y añadiendo ácido gentísico o salicílico a una concentración final de 1 mM. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 4 h. Pasado ese tiempo, la reacción se detuvo mediante una incubación de 5 min a 95 °C y posterior centrifugación 5 min a 16000 x g. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, EEUU) y las muestras se analizaron mediante HPLC (Apartado 6.3.1 de Materiales y métodos). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y como control se emplearon reacciones en ausencia de enzima.

6.3.1 Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El equipo cromatográfico utilizado fue el mismo que el empleado para el análisis de ocratoxinas (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos), pero en este caso únicamente se utilizó el detector DAD. La separación se realizó en una columna de fase reversa *Nova-Pak*[®] C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 4 µm tamaño de partícula) (Waters, EEUU). Como fase móvil se utilizó: eluente A (agua:ácido acético (98:2, v/v)) y eluente B (agua:acetronitrilo:ácido acético (78:20:2, v/v/v)) a temperatura ambiente. El programa de elución utilizado fue el siguiente: 0-55 min, 80% B lineal, 1,1 ml/min; 55-57 min, 90% B lineal, 1,2 ml/min; 57-70 min, 90% B

isocrático, 1,2 ml/min; 70-80 min, 95% B lineal, 1,2 ml/min; 80-100 min, 100% B lineal, 1,2 ml/min; 100-120 min, lavado con metanol a 1 ml/min. La detección de los sustratos y los productos de degradación se llevó a cabo realizando un barrido de 220 a 380 nm. La presencia de ácido gentísico y ácido salicílico se determinó mediante la comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción con los estándares comerciales.

IV. Resultados y discusión



1 Identificación *in silico* de enzimas y bacterias destoxicadoras de ocratoxina A

Los métodos biológicos se consideran la estrategia más prometedora para la destoxicación de micotoxinas. Esto se debe a que ofrecen ventajas como su mayor especificidad y su posible aplicación en condiciones suaves, lo que permite preservar la calidad nutricional y las características organolépticas de las materias primas o alimentos contaminados; además, los métodos biológicos constituyen una alternativa respetuosa con el medio ambiente (Loi et al., 2017). Como se explica en el Apartado 2.4.2.2 de Introducción, este tipo de métodos consisten en el uso de microorganismos y/o enzimas como agentes para la degradación de las micotoxinas a compuestos estables e inocuos o de menor toxicidad (Loi et al., 2017).

Como se ha mencionado en el Apartado 2.4.2.2 de Introducción, la mayoría de las proteínas descritas en la literatura con capacidad para degradar OTA son poco eficientes, puesto que poseen una capacidad de degradación inferior a la cepa que las posee. Sin embargo, este no es el caso de la ocratoxinasasa de *A. niger* UVK143 y la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* DSM 16503^T, las cuales son capaces de degradar por completo OTA en las condiciones en las que se estudiaron (Zhang et al., 2019; Dobritsch et al., 2014).

Una estrategia habitual para identificar proteínas con una función similar a una proteína dada es la comparación del grado de similitud de sus secuencias (Higdon et al., 2010). Las proteínas con alta similitud de secuencia y estructura tienden a compartir relaciones evolutivas y poseer funciones similares (Karlsen et al., 2023; Gan et al., 2002). Con objeto de ampliar el número de proteínas bacterianas disponibles para la degradación de OTA y siguiendo esta hipótesis, se realizó una búsqueda mediante la herramienta informática BLAST del NCBI, tomando como punto de partida las proteínas descritas de *A. niger* y *A. faecalis* y realizando alineamientos múltiples de secuencia con el programa *Clustal Omega* del EMBL-EBI. Entre las proteínas identificadas en esta búsqueda similares a las proteínas previamente descritas de *A. niger* y *A. faecalis*, se seleccionaron aquellas pertenecientes a cepas de colección disponibles comercialmente. En la **Tabla 11** y **Figura 6** se muestran las proteínas analizadas en este estudio y el porcentaje de identidad de secuencia entre dichas proteínas y las enzimas de *A. niger* y *A. faecalis*, utilizadas como modelo. Además, para su comparación con las enzimas identificadas en este estudio, se incluye la enzima ADH3 perteneciente a la cepa *Stenotrophomonas* sp. CW117, descrita durante el desarrollo de este trabajo y que también degrada OTA de forma eficiente (Luo et al., 2022).

Tabla 11. Proteínas analizadas en este estudio con potencial capacidad para degradar OTA.

Código	Acceso	Anotación	Cepa
AFA ^a	WP_026482608.1	Amidohidrolasa	<i>Alcaligenes faecalis</i> DSM 16503 ^T
SNI1	WP_200911391.1	Amidohidrolasa	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> DSM 12575 ^T
CNE	WP_011615094.1	Amidohidrolasa	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 13513 ^T
ANI ^a	A0A075TJ05.1	Ocratoxinas	<i>Aspergillus niger</i> UVK143
BLI	WP_101553338.1	Amidohidrolasa	<i>Brevibacterium linens</i> DSM 20425 ^T
LCO	WP_036192648.1	Amidohidrolasa	<i>Lysobacter concretionis</i> DSM 16239 ^T
SNI2	WP_152984101.1	Amidohidrolasa	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> DSM 12575 ^T
RWI	WP_029994416.1	Amidohidrolasa	<i>Rhizorhabdus wittichii</i> DSM 6014 ^T
SDO	WP_088366708.1	Amidohidrolasa	<i>Sphingomonas dokdonensis</i> DSM 21029 ^T
CNP	WP_013953161.1	Peptidasa M38	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 13513 ^T

^a Proteínas descritas en la literatura, tomadas como punto de partida en el estudio *in silico*

AFA	CNE	SNI1	ANI	LCO	SCW	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
					100	90,87	41,87	41,00	36,83	32,42	SCW
						100	41,81	40,47	35,55	31,92	SNI2
							100	44,32	36,50	33,92	RWI
								100	36,83	33,17	SDO
									100	40,05	BLI
										100	CNP

Figura 6. Matriz de identidad entre las proteínas utilizadas como modelo y las proteínas identificadas en este estudio. Como modelo se han utilizado la enzima N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *Alcaligenes faecalis* DSM 16503^T (AFA), la ocratoxinas de *Aspergillus niger* UVK143 (ANI) y la amidohidrolasa ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 (SCW). Las proteínas identificadas en este estudio son amidohidrolasas de *Brevibacterium linens* (BLI), *Cupriavidus necator* (CNE), *Lysobacter concretionis* (LCO), *Rhizorhabdus wittichii* (RWI), *Stenotrophomonas nitritireducens* (SNI1 y SNI2), *Sphingomonas dokdonensis* (SDO) y una peptidasa M38 de *Cupriavidus necator* (CNP).

La **Figura 6** muestra que, según el porcentaje de identidad de secuencia, se pueden distinguir dos grupos de enzimas, aquellas con mayor similitud a la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* DSM 16503^T (aprox. 40% de identidad de secuencia) y aquellas con mayor similitud a la ocratoxinas de *A. niger* UVK143 (aprox. 30% de identidad de secuencia). Entre las primeras se encuentran dos proteínas anotadas como “amidohidrolasa”, una de *Stenotrophomonas nitritireducens* y otra de *Cupriavidus necator*. Entre las proteínas similares a la ocratoxinas de *A. niger* UVK143, aparecen proteínas anotadas como “amidohidrolasa” pertenecientes a *Lysobacter concretionis*, *Rhizorhabdus wittichii*, *Sphingomonas dokdonensis*, *Brevibacterium linens* y *S. nitritireducens*,

además de una proteína anotada como “peptidasa M38” de *C. necator*. Asimismo, se puede observar que la proteína ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 se agrupa dentro de las proteínas con mayor similitud a la ocratoxinasa de *A. niger* UVK143, presentando un porcentaje de identidad similar al mostrado por las proteínas identificadas en este estudio. Además, la proteína ADH3 presenta un 90,87% de identidad de secuencia con respecto a la amidohidrolasa “SNI2” identificada en *S. nitritireducens*, lo que parece indicar que se trata de una proteína equivalente en las dos especies.

Una vez identificadas estas proteínas candidatas, se adquirieron las cepas tipo correspondientes a las especies bacterianas en las que se habían identificado dichas proteínas. Además, con el objetivo de disponer de cepas control, que previamente hubieran sido descritas como hidrolizadoras de OTA, se adquirieron las cepas *Sphingomonas* sp. DSM 14167 y *Stenotrophomonas* sp. DSM 14169, depositadas bajo patente en la DSMZ (Schatzmayr et al., 2012). Puesto que dichas cepas no estaban identificadas a nivel de especie, se decidió realizar su identificación taxonómica mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. El análisis de la secuencia obtenida se realizó mediante la herramienta bioinformática *Ribosomal Database Project*; el porcentaje de identidad más alto obtenido identificó a *Sphingomonas* sp. DSM 14167 como perteneciente a la especie *Sphingomonas dokdonensis* y a *Stenotrophomonas* sp. DSM 14169 como *Pseudoxanthomonas indica*, género filogenéticamente cercano a *Stenotrophomonas* (Lee et al., 2008) (datos no mostrados).

Una vez se dispuso de las cepas tipo de las especies seleccionadas, se analizó la capacidad de estas cepas para disminuir la presencia de OTA en cultivos. Con este objetivo, las bacterias se cultivaron en medio líquido suplementado con OTA (2 µg/ml) durante siete días (Apartado 6.1.1 de Materiales y métodos). Pasado el periodo de incubación, se analizó la cantidad de OTA remanente en el medio, así como la presencia de OTα (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos). Como se ha mencionado anteriormente, se han descrito casos en los que la disminución de OTA en el medio no ha sido originada por un proceso de transformación enzimática, sino por la capacidad de ciertos microorganismos de adsorber la toxina en sus paredes celulares (Del Prete et al., 2007). Con el objetivo de conocer si la reducción de OTA observada se debe a un fenómeno de adsorción, a un proceso enzimático o a una combinación de ambos, los cultivos bacterianos se centrifugaron, se recogieron las células sedimentadas y se lavaron para recuperar la posible OTA unida a las paredes. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Degradación de OTA mediante cultivos.

Especie	Cepa	Sobrenadante		Células
		OTA	OT α	OTA
<i>Escherichia coli</i>	BL21	+ ^a	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i>	DSM 16503 ^T	-	+	-
<i>Brevibacterium linens</i>	DSM 20425 ^T	-	+	-
<i>Cupriavidus necator</i>	DSM 13513 ^T	-	+	-
<i>Lysobacter concretionis</i>	DSM 16239 ^T	-	+	-
<i>Pseudoxanthomonas indica</i> (<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	DSM 14169	-	+	-
<i>Rhizorhabdus wittichii</i>	DSM 6014 ^T	-	+	-
<i>Sphingomonas dokdonensis</i>	DSM 21029 ^T	-	+	-
<i>Sphingomonas dokdonensis</i> (<i>Sphingomonas</i> sp.)	DSM 14167	-	+	-
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	DSM 12575 ^T	-	+	-

^a+, presencia; -, ausencia

^T cepa tipo

En el estudio también se incluyó la cepa *E. coli* BL21 como posible control negativo y por ser el huésped para la producción heteróloga de las posibles proteínas recombinantes. La cepa de *E. coli* no fue capaz de degradar la OTA presente en el medio de cultivo y tampoco se observó adsorción a sus paredes celulares. Por el contrario, todas las demás cepas analizadas demostraron capacidad para degradar OTA en cultivos (Tabla 12). En los cultivos de las cepas en los que se observó la degradación de OTA también se observó acumulación de OT α , compuesto considerado no tóxico, lo que indica la capacidad de estas bacterias de destoxificar la micotoxina. En ninguna de las bacterias analizadas se observó la unión de OTA a las células, por lo que se descarta un proceso de adsorción a éstas que pudiera contribuir a la disminución de la micotoxina presente en el medio de cultivo. Estos resultados podrían sugerir que las proteínas identificadas en el estudio *in silico* puedan ser las responsables de dicha actividad. Por otro lado, la confirmación de la capacidad para degradar OTA de las bacterias seleccionadas en este estudio muestra la adecuación de la estrategia seguida para su identificación, basada en la selección de bacterias a partir de la identificación de enzimas con una alta similitud de secuencia a las ya descritas en la literatura científica.

Hasta el momento, fundamentalmente se han descrito dos tipos de proteínas capaces de degradar OTA, proteínas que poseen actividad amidohidrolasa (Chen et al., 2022; Luo et al., 2022; Zhang et al., 2019; Dobritsch et al., 2014) y proteínas con actividad carboxipeptidasa (Xu et al., 2021; Wei et al., 2020; Hu et al., 2018; Liuzzi et al., 2017; Chang et al., 2015). Ambos tipos de proteínas rompen el enlace amida presente en la molécula de OTA, produciendo OT α y L- β -fenilalanina. En

la búsqueda de nuevas proteínas con una actividad determinada, el avance de la bioinformática ha impulsado el desarrollo de estrategias *in silico* alternativas, basadas tanto en la estructura como en la capacidad de interacción con el sustrato de las diferentes proteínas (Singh & Dominy, 2010). En este sentido, Dellafiora y colaboradores llevaron a cabo un estudio de *target fishing* que consistió en realizar un cribado *high-throughput* para identificar proteínas que potencialmente pudiesen interactuar con OTA y/o transformarla. Estos investigadores realizaron un cribado del repositorio de ligandos del Banco de Proteínas (PDB) para encontrar aquellos ligandos que resultasen más similares a esta toxina. De este modo, la similitud de la estructura química entre OTA y los ligandos del PDB puede utilizarse teóricamente como “cebo” en el proceso de “pesca” para identificar proteínas potencialmente capaces de interactuar con esta micotoxina. Seguidamente, realizaron un estudio de modelado molecular de estructuras para evaluar la formación de cada complejo OTA-enzima (Dellafiora et al., 2020). Este estudio condujo a la identificación de 16 enzimas no redundantes presuntamente capaces de degradar OTA. Entre estas proteínas se incluían 12 hidrolasas (enzimas potencialmente hidrolizadoras de OTA), dos enzimas que podrían actuar como *binders* y dos enzimas transformadoras de OTA por un mecanismo diferente a la hidrólisis (no hidrolizadoras). Las enzimas no hidrolizadoras identificadas en el estudio fueron la salicilato 1,2 dioxigenasa de *Pseudaminobacter salicylatoxidans* (PsSDO) y la N-acil racemasa de *Amycolatopsis* sp. (Dellafiora et al., 2020). Con el objetivo de comprobar la validez de esta estrategia de búsqueda de nuevas enzimas, diferente a la utilizada en esta tesis, así como de evaluar la actividad degradadora de una enzima no anotada como carboxipeptidasa o amidohidrolasa - que potencialmente puede dar lugar a productos de degradación distintos de OT α - se decidió incorporar en este trabajo el estudio de la actividad sobre OTA de la enzima PsSDO de *P. salicylatoxidans*.

Para comprobar esta hipótesis, se adquirió la cepa *P. salicylatoxidans* DSM 6986^T y se estudió su capacidad para degradar OTA. Esta cepa se cultivó en medio de cultivo CASO suplementado con la micotoxina y, al analizar el sobrenadante del cultivo, se observó que no se había producido degradación de OTA (**Figura 7A**). Ante la posibilidad de que la bacteria no transformase OTA por estar cultivada en un medio rico, se decidió cultivar la bacteria en un medio mínimo al que se añadió OTA como única fuente de carbono. Sin embargo, *P. salicylatoxidans* no fue capaz de crecer en dicho medio mínimo y, por lo tanto, tampoco fue capaz de degradar OTA. Al no detectar degradación en el cultivo, se evaluó la actividad sobre OTA de extractos proteicos libres de células. Al contrario que lo observado con los cultivos celulares, los extractos sí que mostraron actividad degradadora (**Figura 7B**). Lo que indica que la bacteria posee alguna(s) enzima(s) con capacidad degradadora de OTA, existiendo la posibilidad de que la enzima salicilato 1,2 dioxigenasa, identificada en el estudio de *target fishing*, muestre tal capacidad.

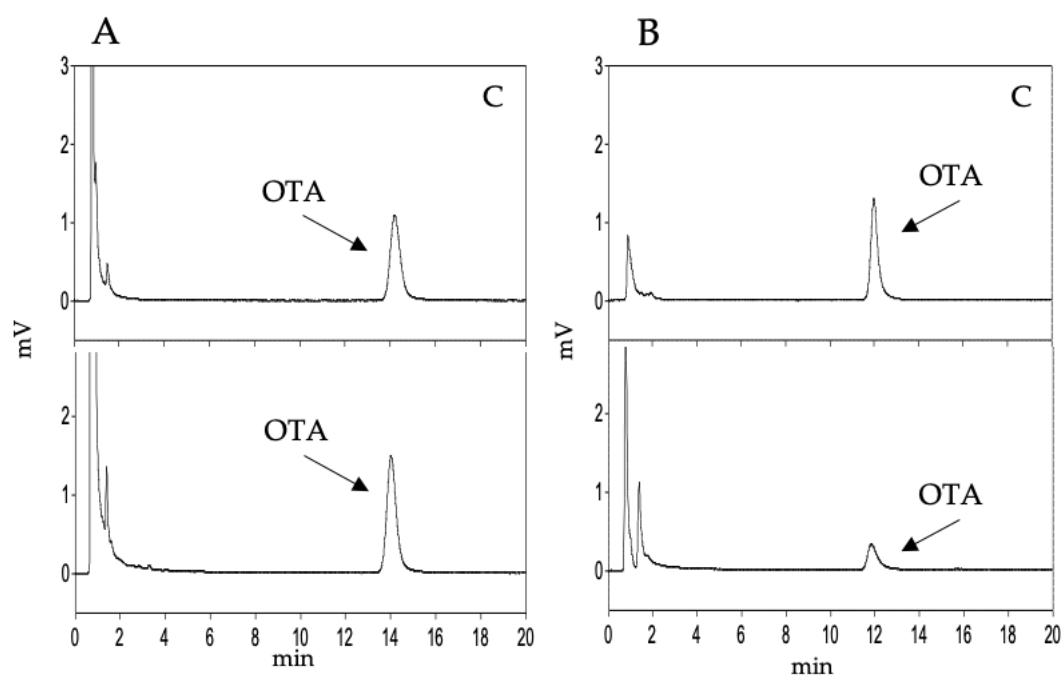


Figura 7. Degradación de OTA por *P. salicylatoxidans* DSM 6986^T. (A) Cultivo de *P. salicylatoxidans* incubada durante siete días en presencia de OTA (2 µg/ml). (B) Extracto proteico de *P. salicylatoxidans* incubado con OTA (2 µg/ml) durante 18 h a 37 °C. Se indican con (C) los controles (medio de cultivo con OTA no inoculado).

2 Producción de enzimas destoxificadoras de ocratoxina A

Una vez confirmada la capacidad para degradar OTA de las bacterias que poseen las enzimas identificadas en el estudio *in silico*, la siguiente etapa consistió en la verificación de la actividad hidrolítica de dichas enzimas sobre esta micotoxina. Con este fin, se procedió a la producción heteróloga y purificación de las mismas. También se clonaron y produjeron la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T y la ocratoxinasa de *A. niger* CBS 513.88, con el objetivo de utilizarlas como controles y poder comparar sus características bioquímicas con las de las nuevas enzimas descritas en este trabajo. La caracterización de estas nuevas enzimas podría conducir a la obtención de un conjunto de proteínas con distintos parámetros fisicoquímicos, que pudieran resultar de utilidad en procesos tecnológicos diferentes.

El estudio de todas las proteínas se realizó siguiendo un procedimiento similar. Con objeto de producir la proteína de forma recombinante, en primer lugar, se analizó *in silico* la posible presencia de un péptido señal, utilizando para ello la herramienta *SignalP-5.0*. Las proteínas que mostraron una secuencia correspondiente a un péptido señal se clonaron sin él. El tamaño molecular de la

proteína y el coeficiente de extinción molar se estimaron con la herramienta *ProtParam tool* de *ExPASy*. A continuación, se realizaron cultivos de las bacterias de interés a partir de los cuales se extrajo el ADN cromosómico y los genes que codifican las enzimas candidatas se amplificaron mediante PCR. Posteriormente, dichos genes se clonaron en vectores de expresión. En este trabajo se han empleado los vectores pURI3-Cter y pLATE31. Ambos comparten características comunes, dando lugar a proteínas recombinantes con una cola de seis residuos de histidina en su extremo C-terminal; esto permite la purificación de las proteínas recombinantes en un único paso mediante cromatografía de afinidad (Apartado 5.2 de Materiales y métodos). La clonación se realizó empleando las parejas de oligonucleótidos que se muestran en la **Tabla 13**, junto al tamaño de los fragmentos amplificados. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 13. Proteínas caracterizadas en este trabajo.

Anotación	Cepa	Cebadores	pb	Vector	PS	aa /kDa	Rto (mg/L)
N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa	<i>A. faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i> DSM 16503 ^T	1945-1946	1241	pURI3-Cter	+	420/44,7	8,65
Amidohidrolasa (1)	<i>S. nitritireducens</i> DSM 12575 ^T	2094-2095	1251	pLATE31	+	422/45,0	4,90
Amidohidrolasa	<i>C. necator</i> DSM 13513 ^T	1977-1978	1280	pURI3-Cter	+	433/47,0	4,08
Ocratoxinasa	<i>A. niger</i> CBS 513.88	2110-2111	1436	pURI3-Cter	-	486/52,0	2,67
Amidohidrolasa	<i>B. linens</i> DSM 20425 ^T	1951-1952	1208	pURI3-Cter	-	410/42,5	29,76
Amidohidrolasa	<i>L. concretionis</i> DSM 16239 ^T	2090-2091	1242	pLATE31	+	419/44,5	2,00
Amidohidrolasa (2)	<i>S. nitritireducens</i> DSM 12575 ^T	2096-2097	1290	pLATE31	+	415/44,5	2,50
Amidohidrolasa	<i>R. wittichii</i> DSM 6014 ^T	2104-2105	1314	pLATE31	+	418/44,0	3,60
Amidohidrolasa	<i>S. dokdonensis</i> DSM 21029 ^T	2106-2107	1320	pLATE31	+	428/44,4	13,14
Peptidasa M38	<i>C. necator</i> DSM 13513 ^T	2084-2085	1239	pLATE31	-	418/44,0	11,12
Salicilato 1,2 dioxigenasa	<i>P. salicylatoxidans</i> DSM 6986 ^T	1972-1973	1104	pURI3-Cter	-	374/42,0	7,10

pb, tamaño amplicón (pares de bases); PS, péptido señal; aa/kDa, aminoácidos de la proteína y peso molecular teórico; Rto, rendimiento

Tras la clonación, los plásmidos recombinantes se propagaron en la cepa *E. coli* DH10B. La correcta inserción y secuencia del gen de interés se confirmó mediante secuenciación y, a continuación, los plásmidos recombinantes obtenidos se transfirieron a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de las proteínas de interés.

El rendimiento de la producción de proteínas recombinantes solubles en sistemas heterólogos es muy variable, dependiendo de factores como el tipo de proteína o el vector de clonación empleado. De forma general, resulta necesario ensayar diferentes parámetros hasta conseguir unas condiciones que permitan obtener una proteína soluble (Structural Genomics Consortium et al., 2008). Una estrategia para optimizar la producción de proteínas recombinantes consiste en modificar las condiciones de inducción. En la inducción intervienen variables como el medio de cultivo, el momento en el que se realiza la inducción, el tiempo de inducción, la temperatura y la concentración del inductor. Durante el desarrollo de este trabajo, se ensayaron varias condiciones de inducción para las diferentes proteínas de interés. De forma general, se obtuvieron proteínas solubles induciendo los cultivos en medio LB durante 18 h a 22 °C con IPTG a una concentración final de 0,4 mM. Cuando no se obtuvieron proteínas solubles aplicando estas condiciones, se utilizó medio LB suplementado con sorbitol y glicina-betaína. Blackwell y Horgan (1991) describieron un mayor rendimiento (400 veces mayor) utilizando este medio en la obtención de una proteína transferasa de *Agrobacterium* expresada heterológamente en *E. coli*. Aunque no se conoce con exactitud la causa de esta mejora, los autores indican que el aumento de las concentraciones internas de osmolitos compatibles podría minimizar el contacto disolvente-proteína, estabilizando la estructura de la proteína (Blackwell & Horgan, 1991). En los casos en los que se empleó LB-sorbitol-betaína como medio para la inducción, se añadió IPTG a una concentración final de 0,2 mM y los cultivos se indujeron a 22 °C durante cinco días. Es necesario señalar que, en el caso de la ocratoxinas de *A. niger* CBS 513.88, el gen que la codifica se amplificó inicialmente a partir de ADN cromosómico del hongo y se clonó en los vectores pURI3-Cter y pLATE31. Sin embargo, a pesar de los múltiples intentos realizados, no fue posible producir de forma soluble la proteína. Como estrategia alternativa, se decidió sintetizar el gen que codifica la enzima con un uso de codones optimizado para *E. coli*, dado que la optimización de codones es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la expresión de proteínas en sistemas heterólogos (Al-Hawash et al., 2017). La síntesis del gen con el uso de codones optimizado se encargó a GeneArt (*Thermo Fisher Scientific*, Alemania) y se adquirió insertado en el vector pMA. El vector pMA conteniendo dicho gen se utilizó como molde para la amplificación por PCR del gen y su posterior clonación en pURI3-Cter. Mediante esta estrategia se consiguió la producción de la ocratoxinas de *A. niger* CBS 513.88 de forma soluble, aunque no con un alto rendimiento (2,7 mg/L), realizando la inducción en medio LB suplementado con sorbitol y glicina-betaína.

Una vez purificadas y dializadas, las proteínas recombinantes se analizaron por SDS-PAGE con el fin de comprobar el tamaño correcto de la proteína (**Figura 8**). Como se observa en la **Figura 8**, las proteínas recombinantes purificadas presentan una masa molecular que coincide con la masa molecular teórica

calculada por la herramienta *ProtParam tool* de *ExPASy* (**Tabla 13**). A pesar de numerosos esfuerzos para conseguir una mejor producción y pureza, en el caso de la purificación de las proteínas de *L. concretionis*, *R. wittichii* y *S. dokdonensis*, se observa la presencia de otras proteínas acompañantes en la solución. En estos casos, la cantidad de proteína de interés obtenida se estimó analizando por densitometría las bandas obtenidas en el gel SDS-PAGE. Los rendimientos de producción y purificación de todas las proteínas analizadas fueron muy variables y oscilaron entre los 2 y 29,76 mg de proteína por litro de cultivo (**Tabla 13**).

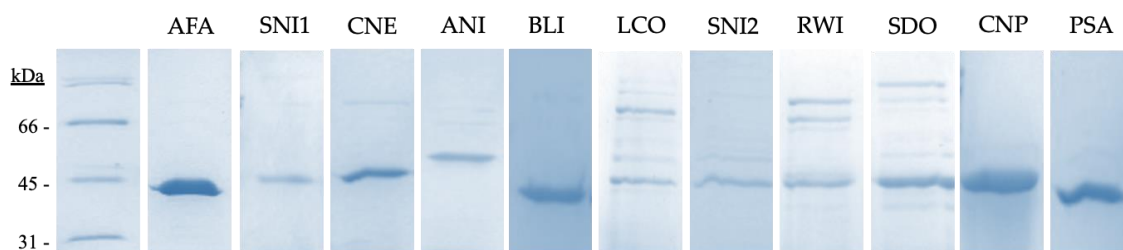


Figura 8. Producción y purificación de proteínas potenciales transformadoras de OTA. Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (*Bio-Rad*, EEUU) aparece a la izquierda. Las proteínas son N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T (AFA), amidohidrolasa de *S. nitritireducens* DSM 12575^T (SNI1), amidohidrolasa de *C. necator* DSM 13513^T (CNE), ocratoxinasa de *A. niger* CBS 513.88 (ANI), amidohidrolasa de *B. linens* DSM 20425^T (BLI), amidohidrolasa de *L. concretionis* DSM 16239^T (LCO), amidohidrolasa de *S. nitritireducens* DSM 12575^T (SNI2), amidohidrolasa de *R. wittichii* DSM 6014^T (RWI), amidohidrolasa de *S. dokdonensis* DSM 21029^T (SDO), peptidasa M38 de *C. necator* DSM 13513^T (CNP) y salicilato 1,2 dioxigenasa de *P. salicylatoxidans* DSM 6986^T (PSA).

La proteína que mejor se produjo fue la amidohidrolasa de *B. linens*, mientras que en el extremo opuesto se sitúan las amidohidrolasas de *L. concretionis* y *S. nitritireducens* (amidohidrolasa 2), para las que se obtuvieron los rendimientos más bajos (alrededor de 2 mg/L). Cabe destacar que, en la mayoría de los casos, fue necesario el uso de medio LB suplementado con sorbitol y glicina-betaína para la obtención de proteínas solubles. Únicamente en el caso de la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T y de las dos proteínas de *C. necator* DSM 13513^T se obtuvieron las proteínas de forma soluble realizando la inducción durante 18 h a 22 °C en medio LB.

3 Caracterización de enzimas destoxicadoras de ocratoxina A

Tras la hiperproducción y purificación de las proteínas recombinantes se llevó a cabo la evaluación de su capacidad para transformar OTA. En los casos en los que ésta se confirmó se procedió a la caracterización de la enzima. El estudio de las características fisicoquímicas de las enzimas es relevante ya que permite elucidar las condiciones en las que éstas son capaces de trabajar de forma más eficiente y, por ende, su capacidad para ser usadas en diferentes procesos tecnológicos con distintos requerimientos. Los parámetros fisicoquímicos que se estudiaron fueron la temperatura y pH óptimos, así como la termoestabilidad de cada una de las enzimas. Asimismo, se evaluó la actividad específica y el efecto de diferentes aditivos sobre la actividad de las mismas, entre los que se incluyeron iones metálicos e inhibidores de metaloproteasas. Finalmente, se estudió la especificidad de sustrato de cada enzima, evaluando su actividad frente a una colección de sustratos sintéticos de carboxipeptidasas y aminoacilasas que presentan diferentes aminoácidos en su estructura.

El análisis de la presencia de OTA y de sus productos de degradación se realizó mediante HPLC (Apartado 6.1.3 de Materiales y métodos). Para la determinación de la actividad específica y la caracterización de los parámetros fisicoquímicos se utilizó 4MF, análogo de OTA (**Anexo I**). Este sustrato fue utilizado previamente por Dobritsch y colaboradores (2014) en la caracterización de la ocratoxinasa de *A. niger*. Considerando el riesgo biológico de trabajar con OTA, el 4MF permite trabajar en condiciones más seguras (Dobritsch et al., 2014). Otra ventaja de la utilización de este compuesto es que permite medir la actividad enzimática mediante un ensayo colorimétrico.

3.1 Enzimas pertenecientes a la familia M20 (M20D) de peptidasas

Como se ha comentado anteriormente, el estudio *in silico* realizado al comienzo de esta tesis condujo a la identificación de dos proteínas debido a su similitud de secuencia con la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* DSM 16503^T (ocratoxinasa AfOTasa de *A. faecalis*) (**Figura 9A**), descrita como degradadora eficiente de OTA (Zhang et al., 2019). Estas dos proteínas candidatas están anotadas en las bases de datos como “amidohidrolasas” y provienen de *C. necator* DSM 13513^T y de *S. nitritireducens* DSM 12575^T, bacterias para las cuales se confirmó su capacidad de degradación de OTA (**Tabla 12**).

En primer lugar, se predijeron los dominios proteicos con el programa *InterPro* del EMBL-EBI. El programa sitúa a las tres proteínas como miembros de la familia M20 de peptidasas y, para todas ellas, predice los dominios “peptidasa M20” y “dominio de dimerización peptidasa”.

La base de datos *MEROPS* recoge información sobre peptidasas. El principio organizativo de esta base de datos es una clasificación jerárquica, en la que los conjuntos de proteínas homólogas a una determinada proteína se agrupan en familias y las familias homólogas en clanes; las familias se agrupan en un clan si existen indicios, principalmente a partir de comparaciones de estructuras terciarias, de la existencia de un ancestro común (Rawlings et al., 2004). En esta base de datos, la familia M20 de peptidasas aparece dentro del clan MH. Este clan engloba peptidasas de tipo co-catalítico que presentan dos iones metálicos (generalmente zinc) por monómero de proteína (Rawlings & Barret, 2013a).

Con el objetivo de encontrar motivos conservados, se realizó un alineamiento con la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis*, las amidohidrolasas de *C. necator* y *S. nitritireducens* identificadas en este estudio y proteínas representativas de la familia M20 (**Figura 9**).

Entre las características más relevantes atribuidas a las enzimas de la familia M20, se encuentra la capacidad de hidrolizar diferentes sustratos, a pesar de poseer conformaciones del sitio activo similares con los mismos residuos coordinando el metal (Jamdar et al., 2015). Entre las diferentes actividades enzimáticas descritas para los miembros de la familia M20, las más comunes son aminoacilasa y/o carboxipeptidasa (Lin et al., 2007; Ishikawa et al., 2001). La característica estructural común entre los miembros de esta familia es que el monómero consiste en un dominio de oligomerización y un dominio catalítico con un plegamiento $\alpha\beta\alpha$ sándwich, donde se encuentra el centro bimetálico del sitio activo (Jamdar et al., 2015) (**Figura 10**). El dominio de oligomerización contiene un residuo conservado de arginina (Arg-303 en *AfOTasa*). Se ha descrito que este residuo interactúa con el carboxilato α del sustrato, ayudando a su orientación en el sitio activo (Jamdar et al., 2015). El dominio de oligomerización adopta un plegamiento $\alpha\beta$ y desempeña un papel importante en la asociación cuaternaria (Jozic et al., 2002).

conservativo. Los guiones representan espacios introducidos para maximizar similitudes. La secuencia de aminoácidos que conforman el péptido señal se señala en verde oscuro. El dominio de oligomerización está marcado con un recuadro azul (Jamdar et al., 2015). Los recuadros rojos indican los dominios conservados "RADXDALP" y "HACGHDXH" (Natsch et al., 2003). 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 involucrados en la unión al sustrato están resaltados en amarillo. Arg-303 en AFA, que se une al carboxilato α del sustrato, está resaltado en verde. El alineamiento y la matriz de identidad se obtuvieron mediante el programa *Clustal Omega*.

La familia M20 se subdivide en seis subfamilias basándose en la conservación de los residuos de su sitio activo. La subfamilia M20D se identifica por la participación de un residuo de cisteína en la formación del enlace covalente coordinado con los dos iones metálicos; dicho residuo aparece en el motivo "CGH". En la **Figura 9**, se puede observar que tanto AfOTasa como las dos proteínas identificadas en este estudio pertenecen a esta subfamilia, ya que presentan la cisteína en el motivo conservado "CGH" y conservan la secuencia alrededor de los residuos de unión al metal que forman parte del sitio activo, como por ejemplo el motivo "DXD" (Rawlings & Barret, 2013a, 2013b). Como se puede observar en la **Figura 9**, este motivo "DXD" es parte del motivo conservado "RADXDALP" que, junto con el motivo "HACGHDXH", está conservado entre las peptidasas de la subfamilia M20D procedentes de especies de arqueas, eubacterias y plantas (Natsch et al., 2003). Las proteínas de la subfamilia M20D presentan cinco residuos implicados en la coordinación de los iones metálicos (Bitto et al., 2009). Estos incluyen una cisteína, un glutamato y tres residuos de histidina. Los dos iones metálicos están fuertemente unidos por tres residuos de histidina (His-141, His-206 e His-406 en AfOTasa) y unidos entre sí por el residuo de cisteína altamente conservado (Cis-139 en AfOTasa), el cual actúa como un ligando coordinando ambos iones (Natsch & Emter, 2020) (**Figura 10**). A su vez, el grupo carboxilato del residuo de ácido glutámico conservado (Glu-174 en AfOTasa) interviene en la coordinación de uno de los iones metálicos. Además, se cree que este residuo de ácido glutámico, conservado en todas las proteínas de la familia M20, puede actuar como base para facilitar la desprotonación de una molécula de agua coordinada con el metal durante la catálisis (Bitto et al., 2009). También están conservados los residuos Arg-104, Gln-171, Glu-376 y Asp-377 en AfOTasa (**Figura 9**), los cuales parecen estar involucrados en una red de puentes de hidrógeno cercana al sitio activo, cerca del residuo Glu-174 (Bitto et al., 2009). La presencia de estos residuos y dominios conservados apoya la clasificación de las proteínas identificadas como peptidasas M20D.

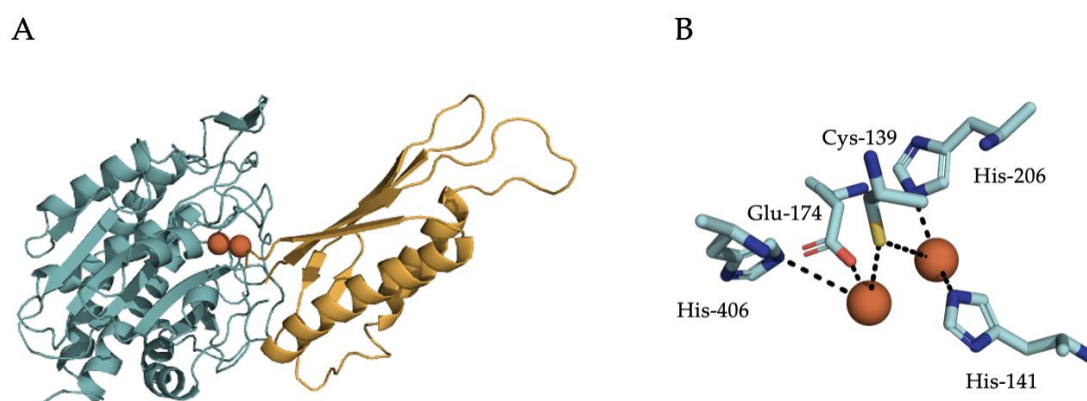


Figura 10. Modelo de la estructura tridimensional (A) y representación esquemática del centro catalítico (B) de una subunidad de la enzima *AfOTasa* construido con el software *AlphaFold*. En amarillo se muestra el dominio de oligomerización que adopta un plegamiento $\alpha\beta$ y en azul el dominio catalítico que adopta un plegamiento $\alpha\beta\alpha$ sándwich. Las esferas marrones representan los iones metálicos del centro activo. Las figuras han sido obtenidas con el software *PyMOL* versión 2.5.0.

Una vez verificada la clasificación de las proteínas identificadas como peptidasas M20D, se procedió a evaluar su capacidad para transformar OTA. Como muestra la **Figura 11**, se confirmó la actividad de *AfOTasa* sobre OTA. Respecto a las proteínas identificadas en este estudio, la actividad transformadora de OTA se confirmó también para la amidohidrolasa de *C. necator* (ocratoxinasa *CnOTasa* de *C. necator*); sin embargo, en el caso de la amidohidrolasa de *S. nitritireducens* (amidohidrolasa *SnAH* de *S. nitritireducens*), aunque se observa aparición de $OT\alpha$, la enzima es incapaz de degradar la mayor parte de la OTA presente. Las proteínas *AfOTasa* y *CnOTasa* transforman la OTA por completo mediante la hidrólisis del enlace amida, como indica la aparición de $OT\alpha$ como único producto de degradación (**Figura 11**). La $OT\alpha$ se identificó por comparación con el compuesto comercial; la L- β -fenilalanina producida, también como resultado de la hidrólisis, no se puede detectar con este método de análisis.

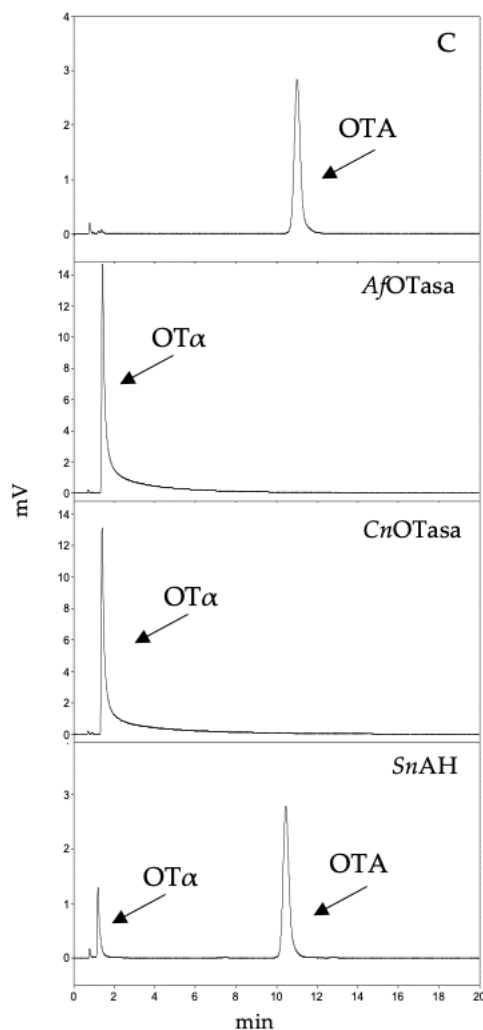


Figura 11. Degradación de OTA por peptidasas de la familia M20 (M20D). Las proteínas se incubaron con OTA (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 18 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se indica el control (C), reacción sin enzima.

A continuación, se determinó la actividad específica de las enzimas transformadoras de OTA sobre el análogo 4MF (**Tabla 14**), entendiendo por actividad específica los μmoles de 4MF que desaparecen por minuto y por mg de proteína en condiciones de saturación de sustrato. En el caso de la *SnAH*, se realizaron varios ensayos de actividad sobre 4MF, incubándola durante distintos intervalos de tiempo. Únicamente se observó actividad tras la incubación más prolongada estudiada (18 h), indicando que la proteína aunque posee actividad ésta es muy baja, por lo que no se continuó su caracterización. La actividad transformadora de 4MF de *AfOTasa* es 31,8 veces mayor que la actividad mostrada por *CnOTasa* en las condiciones ensayadas. Cabe señalar que la actividad específica de las metaloenzimas puede variar dependiendo de las condiciones del experimento. En un estudio realizado por Ferreira y colaboradores (2006), en el que analizaron la cantidad de iones metálicos presentes en la enzima metalodependiente N-acetilglucosamina-6-fosfato deacetilasa de *E. coli*, hallaron que la enzima contenía 1,4 átomos de Zn^{+2} por

subunidad. El hecho de no obtener un número entero de átomos sugiere que la enzima puede acomodar más de un átomo en su centro activo y que el segundo sitio de unión al átomo metálico podría tener una constante de disociación alta. Como resultado, este segundo átomo puede perderse parcialmente durante la purificación de la enzima (Ferreira et al., 2006). En la misma línea, un estudio realizado con la enzima dihidropirimidina amidohidrolasa de *Saccharomyces kluyveri* describió que la actividad específica de la enzima después de la purificación fue de 7,5 U/mg, sin embargo, su actividad específica aumentó a 23,2 U/mg cuando ésta se saturó con Zn^{+2} (Lohkamp et al., 2006). Estos estudios indican que la interpretación de los resultados obtenidos en la actividad específica de metaloenzimas, especialmente aquellas con dos metales en su sitio catalítico, debe hacerse de forma cautelosa, puesto que puede estar influida por las condiciones experimentales utilizadas.

Tabla 14. Actividad específica de las proteínas de la familia M20 (M20D) de peptidasas.

Enzima	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	RSD ^a (%)
AfOTasa	53,18	6,58
CnOTasa	1,67	6,20

^aRSD desviación estándar relativa

3.1.1 Efecto del pH

A pesar de que ambas proteínas presentan actividades específicas muy diferentes, se continuó la caracterización de ambas estudiando, en primer lugar, el efecto de diferentes valores de pH sobre su actividad. La **Figura 12** muestra el efecto del pH sobre la actividad de las proteínas AfOTasa y CnOTasa utilizando 4MF como sustrato. Ambas proteínas presentan un perfil similar, con un pH óptimo alrededor de valores neutros, siendo 7 el pH óptimo de AfOTasa y 6,5 el pH óptimo de CnOTasa. En los valores de pH ácidos, entre 3 y 5, CnOTasa presenta una actividad baja (oscilando entre el ~10-15%), mientras que AfOTasa se encuentra completamente inactiva. En el valor más básico estudiado, pH 9, se observa en ambas un acusado descenso de la actividad, llegando a valores en torno al 30% respecto a la máxima actividad observada en sus valores de pH óptimos (**Figura 12**).

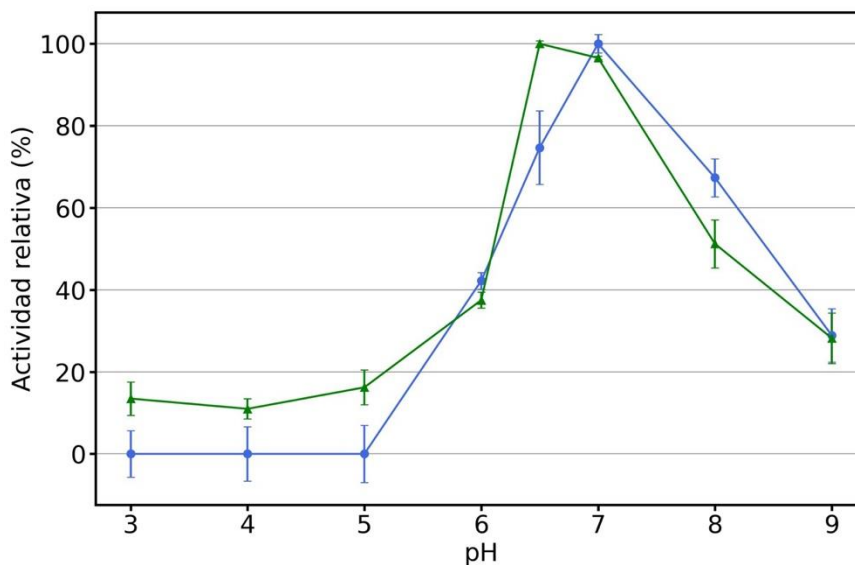


Figura 12. Efecto del pH sobre la actividad de las peptidasas de la familia M20 (M20D) que degradan OTA, AfOTasa (azul) y CnOTasa (verde). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

En el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2019), en el que describieron por primera vez la capacidad de AfOTasa para degradar OTA, también evaluaron la actividad de la enzima frente a variaciones de pH y temperatura. Estos investigadores realizaron la caracterización utilizando OTA como sustrato. El comportamiento de AfOTasa observado en el presente estudio es similar al descrito por Zhang y colaboradores (2019), ya que éstos obtuvieron niveles altos de actividad entre los valores de pH 6-7 y un pH óptimo de 6,5. Las pequeñas diferencias encontradas entre ambos estudios se pueden deber a variaciones en las condiciones experimentales, como el uso de diferente sustrato o tampones de reacción.

Los valores neutrales de pH óptimos exhibidos tanto por AfOTasa como por CnOTasa no coinciden con los valores básicos descritos como pH óptimo en proteínas bacterianas pertenecientes a la familia M20 (M20D). Así, en diversas proteínas de la subfamilia M20D se ha descrito un pH óptimo de 8, como es el caso de la peptidasa BcepM20D de *Burkholderia cepacia* (Jamdar et al., 2015), la enzima HmrA de *Staphylococcus aureus* (Jamdar et al., 2015) y una N-acilamidohidrolasa DradM20D de *Deinococcus radiodurans* R1 (Jamdar et al., 2015; Lin et al., 2007).

3.1.2 Efecto de la temperatura y estudio de la termoestabilidad

En lo que respecta al efecto de la temperatura, *AfOTasa* presenta una actividad superior al 90% entre los valores de 37 y 55 °C (**Figura 13**); comportamiento que resulta similar a los resultados obtenidos cuando se empleó OTA como sustrato (Zhang et al., 2019). En el estudio realizado por Zhang y colaboradores (2019) no se analizaron temperaturas inferiores a 30 °C, sin embargo, en el estudio descrito en esta tesis se observa que *AfOTasa* presenta también actividad a 5 y 20 °C, siendo un 33 y un 63% de su actividad máxima, respectivamente. La proteína *CnOTasa* también presenta un 36% de su actividad a 5 °C. Además, esta enzima muestra una actividad superior al 90% en un intervalo más amplio de temperaturas, entre los 20 y los 65 °C, en comparación con *AfOTasa*. Ambas enzimas presentan como temperatura óptima 55 °C (**Figura 13**).

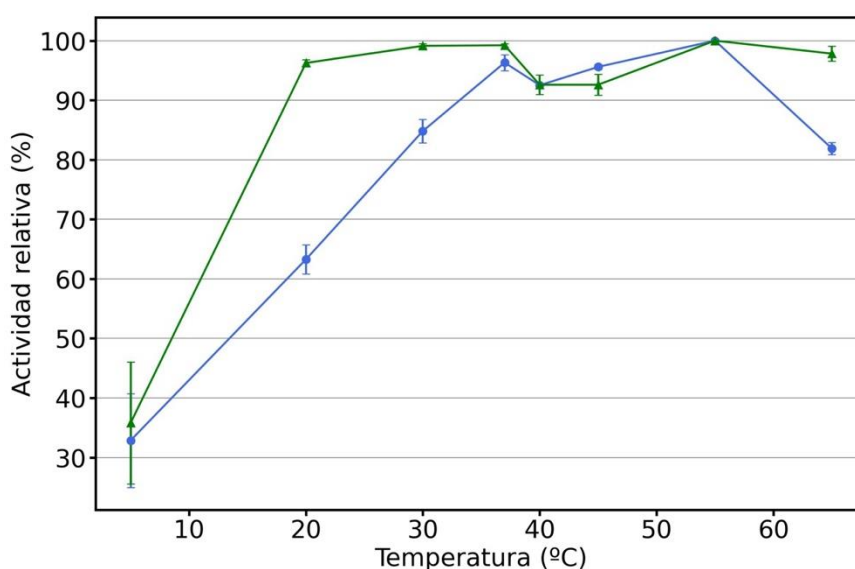


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las peptidasas de la familia M20 (M20D) que degradan OTA, *AfOTasa* (azul) y *CnOTasa* (verde). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

Con relación a la termoestabilidad, Zhang y colaboradores (2019) describieron a la proteína *AfOTasa* como una enzima termoestable, al observar que era capaz de retener más de un 90% de su actividad tras 150 min de incubación a 40 °C. En este estudio y utilizando 4MF como sustrato, se observa que la enzima mantiene alrededor de un 70% de su actividad inicial tras 150 min de incubación a diferentes temperaturas (**Figura 14A**). Extendiendo el tiempo de preincubación a 6 h, se observa que a 20 °C mantiene un 62% de su actividad máxima, mientras que, a 30, 37 y 45 °C la enzima retiene un 40% de actividad. En cambio, por encima de 55 °C de preincubación, *AfOTasa* pierde rápidamente su actividad, mostrando un 65% de su actividad máxima a los 15 min y habiéndola perdido por completo tras 30 min de incubación a dichas temperaturas.

La proteína *CnOTasa* presenta una mayor termoestabilidad a temperaturas moderadas, ya que tras incubarla durante 6 h a 20, 30 y 37 °C sigue manteniendo el 100% de actividad. Además, después de 20 h de incubación a 20 y 30 °C todavía conserva su actividad máxima; sin embargo, tras 20 h a 37 °C retiene únicamente un 14% de actividad. La actividad de la enzima disminuye rápidamente al preincubarla a temperaturas superiores a los 45 °C. Tras una incubación de 6 h a 45 °C, *CnOTasa* conserva un 27% de su actividad, mientras que, tras 1 h a 65 °C, la proteína se inhibe por completo (**Figura 14B**).

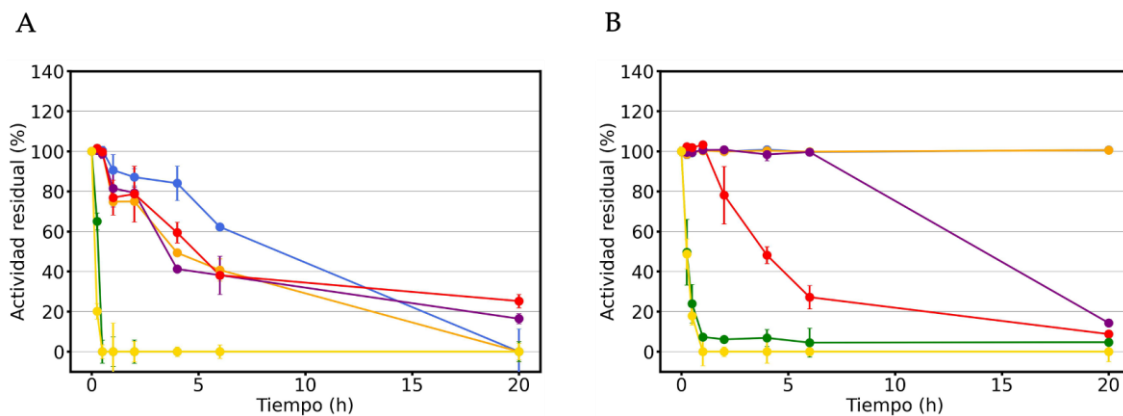


Figura 14. Termoestabilidad de las peptidasas de la familia M20 (M20D) que degradan OTA, *AfOTasa* (A) y *CnOTasa* (B). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. El control sin preincubación de la enzima se tomó como el 100% de actividad. Preincubación a 20 °C (azul), 30 °C (naranja), 37 °C (morado), 45 °C (rojo), 55 °C (verde) y 65 °C (amarillo).

El comportamiento observado para ambas enzimas, temperaturas óptimas altas y termoestabilidad, coincide con las características descritas previamente en proteínas bacterianas de la subfamilia M20D. Entre las proteínas caracterizadas de esta subfamilia, la temperatura óptima más baja (40 °C) la muestra *DradM20D* de *Deinococcus radiodurans* R1 (Lin et al., 2007), siendo 55 °C la temperatura óptima de *BcepM20D* de *Burkholderia cepacia* y *HmrA* de *Staphylococcus aureus* (Jamdar et al., 2015).

3.1.3 Efecto de aditivos

Una vez determinados los valores de pH y temperatura óptimos para la actividad de *AfOTasa* y *CnOTasa*, así como su termoestabilidad, se estudió el efecto de diferentes aditivos en la actividad de ambas enzimas. La **Figura 15** muestra que el comportamiento de las enzimas en presencia de diferentes tipos de aditivos a una concentración final de 1 mM produce tendencias similares en términos de activación/inhibición de la actividad de ambas. La incubación con iones metálicos se traduce en efectos diferentes dependiendo del metal. La incubación de

*Af*OTasa con Ca^{+2} tiene un ligero efecto potenciador de la actividad (112% respecto de su actividad original); en presencia de K^{+} y Mn^{+2} la enzima conserva su actividad original. Sin embargo, la actividad de la enzima disminuye al incubarla con Cu^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} y Mg^{+2} , conservando sólo un 5,5%, 6%, 15,5%, 32,5%, 45% y 75% de actividad, respectivamente. *Cn*OTasa se inhibe en presencia de los mismos iones metálicos, pero en diferentes proporciones: Hg^{+2} (0% de actividad), Fe^{+2} (0%), Zn^{+2} (4,6%), Cu^{+2} (5,9%), Ni^{+2} (34%) y Mg^{+2} (43%). Como en el caso de *Af*OTasa, su actividad se mantiene en presencia de Ca^{+2} y de Mn^{+2} ; sin embargo, contrariamente a *Af*OTasa, en presencia de K^{+} la actividad de *Cn*OTasa se reduce en un 20% respecto de su actividad original. En el estudio realizado con la peptidasa BcepM20D de *Burkholderia cepacia* también observaron inhibición de la actividad enzimática en presencia de determinados iones metálicos. Por ejemplo, se describe que la actividad de la enzima se inhibe en presencia de concentraciones superiores a 0,1 mM de Zn^{+2} o en presencia de concentraciones superiores a 0,4 mM de Co^{+2} . Asimismo, observaron que utilizando concentraciones entre 0,05 y 0,1 mM de Zn^{+2} la actividad de la enzima se restaura (Jamdar et al., 2015). En el estudio descrito en esta tesis también se obtiene que el Zn^{+2} inhibe la actividad de *Af*OTasa y *Cn*OTasa. Existen otras referencias en la literatura que sugieren que un exceso de zinc inhibe la actividad de las metaloenzimas que presentan este mismo metal en su centro catalítico (Rawlings & Barrett, 2013b).

Finalmente, se estudió la actividad de las enzimas en presencia de inhibidores de proteasas y agentes quelantes. La subfamilia de peptidasas M20D está formada por metaloproteínas (Jamdar et al., 2015). Por ello, sería de esperar que los inhibidores de metaloproteínas ejerciesen un efecto inhibitorio en las proteínas de esta familia. La **Figura 15** muestra que la actividad de *Af*OTasa se ve inhibida por los compuestos ensayados, observándose la mayor inhibición en presencia de EDTA y 1,10-fenantrolina. La proteína *Cn*OTasa disminuye su actividad tras incubarla con 8-hidroxiquinolina y 1,10-fenantrolina; aunque el efecto más evidente se observa en presencia de EDTA, compuesto en presencia del cual muestra una actividad de alrededor de un 45% respecto de su actividad original (**Figura 15**). El EDTA, la 8-hidroxiquinolina y la 1,10-fenantrolina son agentes quelantes de iones metálicos; la inhibición de la actividad, aunque moderada, observada tras la incubación con estos compuestos sugiere la participación de iones metálicos en el proceso catalítico. Por el contrario, el PMSF no tiene efecto sobre la actividad de las enzimas (ambas enzimas mantienen más de un 90% de su actividad original), ya que este compuesto es un inhibidor de peptidasas pertenecientes a la familia de serín proteasas. La ausencia de inhibición en presencia de PMSF sobre estas proteínas era esperable puesto que, como se observa en el alineamiento con proteínas de la familia M20 (**Figura 9**), la serina no forma parte de su centro activo.

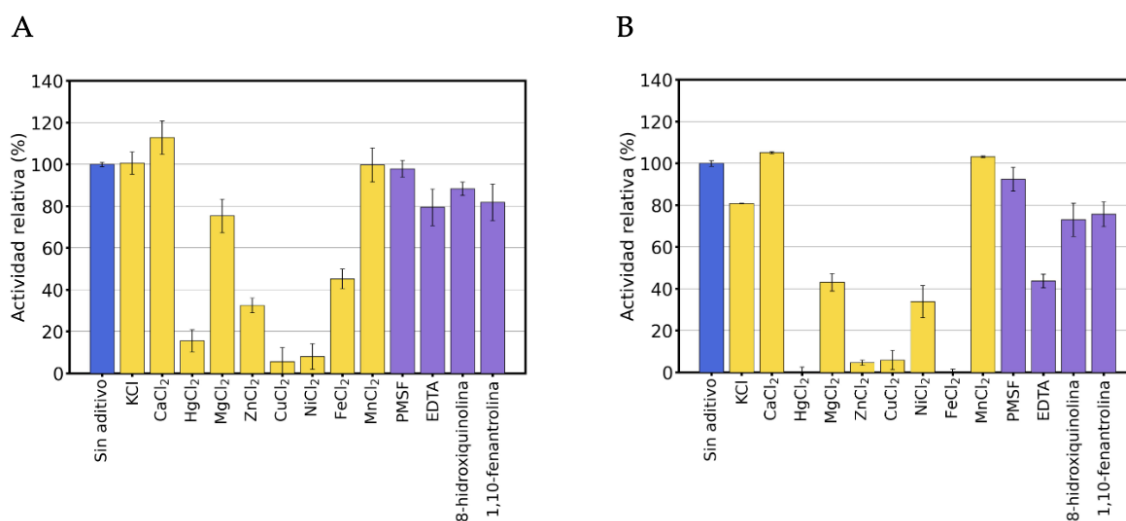


Figura 15. Efecto de distintos aditivos (1 mM) sobre la actividad de peptidasas de la familia M20 (M20D) que degradan OTA, AfOTasa (A) y CnOTasa (B). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. El control sin presencia de aditivo se consideró como el 100% de actividad. Se indican: control sin aditivo (azul), iones metálicos (amarillo) e inhibidores de proteasas y agentes quelantes (morado).

3.1.4 Especificidad de sustrato

Como se ha mencionado anteriormente, la familia M20 (M20D) constituye un grupo heterogéneo de peptidasas que incluye aminoacilasas y carboxipeptidasas (Jamdar et al., 2015). Para conocer la actividad hidrolítica de las enzimas identificadas en este estudio se ensayaron diferentes tipos de sustratos. La actividad endopeptidasa se evaluó empleando como sustrato seroalbúmina bovina (BSA), la actividad aminoacilasa se ensayó sobre 11 N-acetil-L-aminoácidos y la actividad carboxipeptidasa sobre dos ocratoxinas (OTA y OTB), dos N-benzoil-glicil aminoácidos, dos glicil aminoácidos y 13 N-benciloxicarbonil (o carbobenciloxi) aminoácidos.

Puesto que la actividad hidrolítica sobre OTA se confirmó para ambas enzimas en la primera parte de este estudio (**Figura 11**), también se analizó la capacidad de las enzimas para degradar OTB, derivado no clorado de OTA (Steyn, 1995). Como era de esperar por la similitud de las estructuras químicas de OTA y OTB, se demostró la actividad hidrolítica de las dos enzimas sobre esta micotoxina (**Figura 16**).

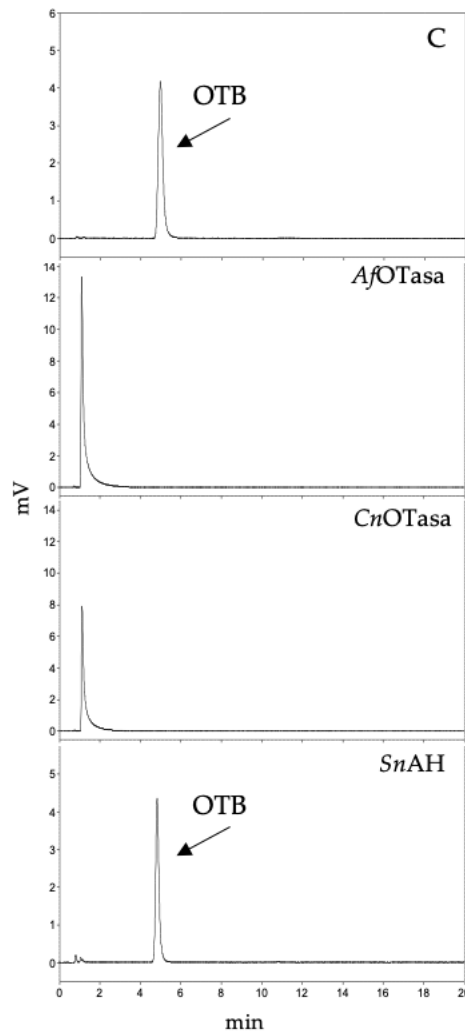


Figura 16. Degradación de OTB por peptidasas de la familia M20 (M20D). Las proteínas se incubaron con OTB (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 18 h a 37 °C. Se indica el control (C), reacción sin enzima.

La actividad endopeptidasa de las proteínas se ensayó utilizando BSA como sustrato. No se observó actividad endopeptidasa con ninguna de las proteínas al incubarlas con BSA durante 18 h, como reveló la ausencia de productos de hidrólisis de esta proteína en un gel SDS-PAGE (**Anexo II**). Por lo tanto, ninguna de las dos enzimas posee actividad endopeptidasa, al menos frente al sustrato empleado en este estudio.

La acetilación N-terminal de las proteínas es un proceso muy extendido y conservado que está involucrado en la protección y estabilidad de éstas (Vandrisse & Escalante-Semerena, 2019). La proteína *AβOTasa* está anotada como una N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa, por lo que se decidió comprobar su actividad aminoacilasa frente a 11 N-acetil-L-aminoácidos. Las aminoacilasas difieren en su preferencia por distintos aminoácidos. Dos proteínas de la subfamilia M20D, *HmrA* de *S. aureus* y *BcepM20D* de *B. cepacia*, presentan su mayor actividad frente a N-acetil-L-alanina, un aminoácido de tamaño pequeño, neutro, no polar, así como frente a aminoácidos cargados negativamente. Por su

parte, la proteína DradM20D de *Deinococcus radiodurans* R1 es activa frente a aminoácidos no polares o no cargados (Jamdar et al., 2015). En este estudio se ha observado que AfOTasa puede liberar diferentes aminoácidos de los sustratos ensayados. La **Figura 17A** muestra la actividad relativa de AfOTasa respecto al sustrato frente al que presentó mayor actividad de cada uno de los grupos (considerado como el 100% de actividad). De los sustratos ensayados, AfOTasa presenta la mayor actividad frente a AF, seguido de AY. Estos resultados sugieren que, para su actividad aminoacilasa, AfOTasa muestra preferencia por aminoácidos con carácter aromático. AM y AL también fueron hidrolizados, aunque en un porcentaje menor. De este modo, se observa que AfOTasa puede eliminar el grupo acetilo de aminoácidos neutros polares (tirosina), así como aminoácidos hidrofóbicos no polares con un anillo aromático (fenilalanina) o con un grupo alquilo (metionina o leucina).

La actividad hidrolítica de AfOTasa también se ensayó frente a 13 derivados N-benciloxicarbonil. Los aminoácidos hidrolizados preferentemente en el caso de los sustratos N-benciloxicarbonil, fueron los mismos que se hidrolizan de forma preferente en el caso de los sustratos N-acetil (tirosina, fenilalanina y metionina) (**Figura 17A**). Este resultado confirma que AfOTasa presenta preferencia por sustratos que poseen aminoácidos neutros con un grupo aromático o alquilo.

La actividad carboxipeptidasa de AfOTasa sobre la fenilalanina en el extremo C-terminal también se ha puesto en evidencia por su capacidad para hidrolizar OTA y OTB. Además, se demostró de nuevo utilizando como sustratos dos grupos adicionales de compuestos en los que varía su residuo C-terminal, GF, comparado con GA, y HF comparado con HR. Entre estos sustratos, sólo los derivados de fenilalanina se hidrolizan eficientemente (**Figura 17A**).

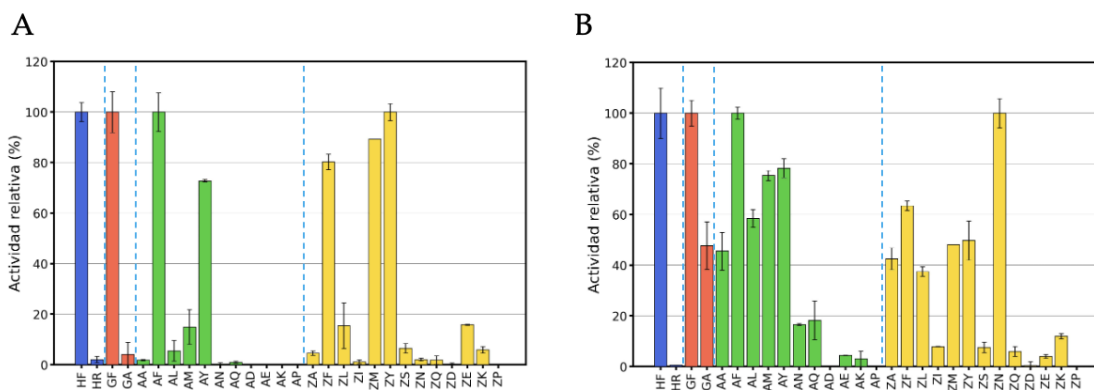


Figura 17. Especificidad de sustrato de las peptidasas de la familia M20 (M20D) que degradan OTA, AfOTasa (A) y CnOTasa (B). Los experimentos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. Para cada sustrato se realizó un control sin añadir enzima. Se tomó como 100% la reacción con el sustrato para el que la enzima presentó mayor actividad de cada uno de los grupos. Se representan los sustratos derivados de hipuril (azul), glicil (rojo), N-acetil (verde) y N-carbobenciloxi (amarillo).

La actividad de *Cn*OTasa se ensayó sobre los mismos sustratos utilizados para caracterizar *Af*OTasa (**Figura 17B**). Como se ha mencionado anteriormente, pese a la similitud de secuencia y la presencia de motivos conservados, la subfamilia M20D presenta una gran diversidad hidrolítica entre las proteínas que la forman (Jamdar et al., 2015). Por este motivo, *Cn*OTasa no tendría necesariamente que presentar un perfil hidrolítico similar al observado para *Af*OTasa. La **Figura 17B** muestra la actividad de *Cn*OTasa frente a los diferentes sustratos evaluados. En este caso, se observa una mayor promiscuidad, ya que la enzima es capaz de hidrolizar en mayor o menor proporción todos los sustratos ensayados, excepto los derivados que contienen ácido aspártico y prolina. En el caso de los sustratos GF, GA, HF y HR, *Cn*OTasa no muestra actividad sobre el derivado de arginina, mientras que sí se observa actividad sobre los dos derivados de fenilalanina, y, en menor medida, sobre GA (**Figura 17B**). Los resultados indican que *Cn*OTasa es capaz de hidrolizar una mayor variedad de sustratos que *Af*OTasa.

El ensayo funcional llevado a cabo en este estudio aporta datos relevantes sobre la especificidad de sustrato de *Af*OTasa de *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T y de *Cn*OTasa de *C. necator* DSM 13513^T. En el presente estudio, se ha demostrado que ambas proteínas pertenecen a la familia M20 (M20D) de peptidasas y presentan actividad aminoacilasa y carboxipeptidasa, lo que se debe a su capacidad para acomodar diferentes tipos de grupos químicos en su centro catalítico, comportamiento que ha sido descrito previamente en proteínas de esta familia (Jamdar et al., 2015). El hecho de que ambas proteínas no presenten actividad exclusivamente sobre derivados que contienen fenilalanina parece indicar que OTA no es su sustrato natural. Las dos enzimas presentan preferencia por sustratos con residuos de fenilalanina, tirosina, metionina o leucina; *Cn*OTasa muestra además preferencia por alanina. En las proteínas M20D, aunque se desconozca su sustrato fisiológico, las diferencias que existen en su asociación cuaternaria, la elección del metal que actúa como cofactor y las preferencias de sustrato sugieren diversos roles funcionales y mecanismos regulatorios. Estas enzimas hidrolizan varios aminoácidos N-acetilados y aminoácidos en el extremo C-terminal de diferentes sustratos. Estos compuestos se pueden generar tanto por degradación de proteínas celulares como por el metabolismo de sustratos proteicos. En hábitats naturales donde la disponibilidad exógena de aminoácidos es baja, la capacidad para reciclar aminoácidos que proporcionan a las bacterias este tipo de enzimas es importante para el mantenimiento de las funciones celulares.

3.1.5 Estudio *in silico* de alergenicidad

Para finalizar el estudio de las proteínas *AfOTasa* y *CnOTasa*, puesto que presentan una potencial aplicación en la industria alimentaria por su capacidad para degradar OTA, se decidió evaluar su posible alergenicidad. En la alergia están involucradas una serie compleja de reacciones y factores intrínsecos y extrínsecos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad y al desencadenamiento de los síntomas. La alergenicidad se define como el potencial de una sustancia para provocar sensibilidad y reacciones alérgicas relacionadas con la respuesta de los anticuerpos IgE (Sadeghian & Hemmati, 2021). Existe un amplio espectro de moléculas que pueden actuar como alérgenos, entre las que se incluyen moléculas químicas de pequeño tamaño o moléculas biológicas como proteínas.

La predicción de proteínas alergénicas ha adquirido gran relevancia en la actualidad debido al uso de proteínas modificadas en alimentos, en compuestos terapéuticos y biofármacos. En 2003, el *Códex Alimentarius* sugirió el uso de varios test para examinar el comportamiento alergénico de las proteínas, lo que incluye el estudio de factores como la similitud de secuencia con alérgenos conocidos, la estabilidad de las proteínas o los sitios de unión a IgE (Saha & Raghava, 2006). En los últimos años, se ha empleado la bioinformática como instrumento para la predicción de alérgenos desarrollándose diversas herramientas, muchas de las cuales se encuentran disponibles *online* (Dimitrov et al., 2014).

Con el objetivo de disponer de una información preliminar sobre la alergenicidad de las proteínas descritas en este estudio, se utilizaron los programas informáticos *AllerTOP v.2* y *AlgPred 2.0* (Sharma et al., 2021; Dimitrov et al., 2014). Ambos programas predicen la alergenicidad de las proteínas de interés basándose en secuencias de proteínas alérgenas y no alérgenas. El programa *AllerTOP v.2*, en primer lugar, evalúa las proteínas de acuerdo con descriptores de aminoácidos, después convierte las cadenas de diferente longitud en vectores uniformes y, por último, aplica métodos computacionales de aprendizaje automático (*machine-learning*) para clasificar y diferenciar los alérgenos de los no alérgenos. Para los descriptores de aminoácidos, analizan 237 propiedades fisicoquímicas, entre las que se incluyen la hidrofobicidad de los aminoácidos, su tamaño, su tendencia a formar hélices o láminas beta y su abundancia relativa (Sharma et al., 2021; Dimitrov et al., 2014). Por su parte, *AlgPred 2.0* hace uso de varios métodos. En primer lugar, realiza un BLAST para identificar alérgenos basándose en su similitud con alérgenos conocidos. En segundo lugar, localiza epítomos IgE para predecir alérgenos en función de la presencia de estos epítomos en la secuencia de la proteína a estudio. Seguidamente, *MOTIF scanning* busca motivos conservados en las proteínas de

interés que también estén presentes en proteínas alérgenas conocidas. Como último test, el programa calcula una puntuación híbrida basada en la combinación de: (i) un método basado en la similitud de secuencia (empleando BLAST), (ii) un método basado en la búsqueda de motivos (mediante el programa MERCI) y (iii) un método basado en *machine-learning* (Sharma et al., 2021).

Introduciendo la secuencia de *AfOTasa* y *CnOTasa* en *AllerTOP v.2*, el programa predice que se trata de proteínas probablemente no alérgicas. En el caso de *AlgPred 2.0*, realizando el BLAST no encuentra identidad de secuencia con ninguna de las proteínas identificadas como alérgenos en la base de datos, y encuentra *hits* con proteínas identificadas como no alérgenos. El programa no encuentra epítomos de IgE en *AfOTasa*, mientras que en *CnOTasa* encuentra dos epítomos formados por tres aminoácidos. Sin embargo, para considerar que la proteína pueda ser un alérgeno, sólo se tienen en cuenta epítomos superiores a cinco aminoácidos (Sharma et al., 2021). Al realizar el *MOTIF scanning*, el programa predice ambas proteínas como alérgenos, si bien es cierto que los autores señalan este método como el menos discriminatorio (Sharma et al., 2021). La puntuación híbrida obtenida indica que *AfOTasa* y *CnOTasa* no serían proteínas alérgicas (**Tabla 15**). Considerados en su conjunto, y como aproximación inicial, los resultados obtenidos mediante estas dos herramientas indican, a falta de confirmación con estudios *in vivo*, que tanto *AfOTasa* como *CnOTasa* probablemente no son proteínas alérgicas.

Tabla 15. Test de alergenidad de las enzimas pertenecientes a la familia M20 (M20D) de peptidasas.

Proteína	<i>AllerTOP v.2</i>	<i>AlgPred 2.0</i>			Puntuación híbrida	
		BLAST	IgE	MOTIF scanning	A	B
<i>AfOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	-	Alérgeno	-0,34	No alérgeno
<i>CnOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	2 epítomos (IAT, PSN)	Alérgeno	0,14	No alérgeno

Los ensayos de caracterización de las peptidasas de la familia M20 (M20D) capaces de degradar OTA, *AfOTasa* y *CnOTasa*, revelan que se trata de dos proteínas que, por sus características fisicoquímicas y por su probable carencia de alergenidad, resultan potencialmente adecuadas para su uso sobre matrices alimentarias.

3.2 Enzimas pertenecientes a la familia M38 de peptidasas

La búsqueda de proteínas con alta similitud de secuencia a la ocratoxinas de *A. niger* UVK143 (*AnOTasa*) condujo a la identificación de siete proteínas candidatas para la transformación de OTA (**Tabla 11** y **Figura 18A**). Entre ellas se encuentran seis proteínas anotadas como “amidohidrolasas” pertenecientes a *Brevibacterium linens* DSM 20425^T, *Rhizorhabdus wittichii* DSM 6014^T, *Sphingomonas dokdonensis* DSM 21029^T, *Lysobacter concretionis* DSM 16239^T y *Stenotrophomonas nitritireducens* DSM 12575^T (diferente a la descrita en el apartado anterior como similar a *AfOTasa*), y una proteína anotada como “peptidasa M38” de *Cupriavidus necator* DSM 13513^T.

Del mismo modo que para las peptidasas identificadas de la familia M20 (M20D), en primer lugar, se predijeron los dominios proteicos presentes en estas proteínas mediante el programa *InterPro* del EMBL-EBI. El programa predijo un dominio “relacionado con amidohidrolasas” e “hidrolasas metalodependientes” presente en todas ellas. Como en el caso de las proteínas similares a la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* DSM 16503^T, y al estar anotada la proteína identificada de *C. necator* como “peptidasa M38”, se realizó una búsqueda en la base de datos de peptidasas *MEROPS*. Esta base de datos clasifica a las proteínas identificadas dentro de esta misma familia de peptidasas (M38). Con el objetivo de encontrar motivos conservados, se realizó un alineamiento con la ocratoxinas de *A. niger* UVK143, las proteínas similares a ella identificadas en este estudio y otras proteínas con función conocida clasificadas dentro de la familia M38 (**Figura 18B**). Tal y como se ha comentado previamente, durante el transcurso de esta tesis, Luo y colaboradores (2022) identificaron la amidohidrolasa ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 como una enzima eficiente en la degradación de OTA. Al realizar un alineamiento de la secuencia de ADH3 con las secuencias de las proteínas identificadas en este estudio, se observó que esta nueva enzima se agrupa dentro del conjunto de proteínas similares a *AnOTasa*, por lo que también se añadió en este alineamiento (**Figura 18B**). Además, como se ha comentado previamente, esta enzima comparte un 90,87% de identidad de secuencia con la amidohidrolasa de *S. nitritireducens* identificada en este trabajo, lo que indica que se trataría de la proteína equivalente en ambas cepas.

A

ANI	SNI	LCO	RWI	SDO	BLI	CNE	Proteína
100	30,57	29,47	30,59	30,37	28,79	29,70	ANI
	100	73,89	41,81	40,47	35,55	31,92	SNI
		100	39,72	40,37	37,66	32,51	LCO
			100	44,32	36,50	33,92	RWI
				100	36,83	33,17	SDO
					100	40,05	BLI
						100	CNE

B

```

ANI      MVRRIASATPMVQSPMSPLGTTTCVVRPNPVSINLQRRPLVIASTDEAKVTIIYA-GLLIP 59
BLI      -----MVTVLTHATVFD----- 12
Sgx9260b -----MTTFVLRNGALLDP----- 14
CNE      -----MSQSPQILFHGGDVLEP----- 17
Sgx9260c -----MTITVLQGGNVLDL----- 14
Sgx9359b -----MSLTSEDFLIKSKGYLDI----- 18
Cc2672   MRMG----MKIATLMAGAAVGLTL-----CG-AASAIEIKAVSAARLLDV 40
Cc0300   -----MSLDVDSKTLIHAGKLIDG----- 19
LCO      MTV-----RLVRTAVCTALALSCL-----SFASHAASGSTATLHCGQLFDS 40
SNI      MPM-----PIMRRHLAVLLLLLACA-----PACAEFPVAVHCGRLFDA 36
SCW      --M-----PI-RRRFASLLLLLACA-----PAWAEPVAVQCGRFLDA 33
RWI      MAG-----FLSSRLLRVAALALACA-----TS-TAALARVAVVHAGHLIDG 39
SDO      MKT-----MFLAALLAAATPALAQ-----TAAPPAPPVAVYIHAGALLDR 40

          1 HxH
ANI      GDGEPLRNAALVSDKIIAFVSGEAD-IPKKYLRSTQSTHRVFLVMPGLWDCMHHFGGDD 118
BLI      GTRFLPGTRDVVVDGGRIAAVTEGGQGSNAG--DNHIDCTGQTIIPGVIDCHVLTSSG 70
Sgx9260b TRADLLEGFEIILEDGFVREVSDKPINS--SK--AHVIDVKGKTIMPLIDIVHVVVAIE 72
CNE      GTGELLRCHDVLVEGERIAAV-GPAIDA--PS--AQRIDARGKTVMPGLIDCHVHVLASL 72
Sgx9260c ERGVLLDHHHVIDGDRIVEVTDPRVDF--PN--AQVIDVRGKTVMPGFIDCHVHVLASN 70
Sgx9359b QTGEI IKADL-LIRNGKIAEIGK----INTKD--ATVISIPDLILIPGLMDSHVHIVGND 91
Cc2672   ASGKYVDPNLVIVTDGRITSIIGKKG-APVAG--ATAVDLPGVTLPLGLIDMHHVHLSLA 97
Cc0300   KSDQVQSRISIVIDGNIIISDIKKGFI--SSNDF--EDYIDLRDHTVPLGLMDMHHVHGOEY 76
LCO      RSGDVLGPHTVLIIRDDRIAAVTAGH--AEVPG--TPGIDLSGHTCTPGWTDIHHVHLSQS 96
SNI      RSQQLKGPHTLVVHAGRIQVLSGAD-ADGGG--VRSVDLRDKVCLPGWTDIHHVHLSQS 93
SCW      RSQQLKGPHTLVVADGRIRQVLPGTG-ADAAG--ARVVDLGDVKVCLPGWTDIHHVHLSQS 90
RWI      VSAKPRDKVSIHIDDRITAVQDGFV-TPA-G--AEVVDLSSATVLPGLIDMHHHITGQY 95
SDO      PQQAPRGNSTIIIVRDGKIAEVRDGFV-PPEAG--AKLVALNDKFLVPLGLIDHHVHLGI- 96

          2
ANI      DYYNDY---TSLGATHPASSGARLARGCWEALQNGYTSYRDLAGYGC--EVAKAINDGT 172
BLI      AAATS-----NFHDPFSLQFYNSVKNMEATLKGGVTVVRDAGGTDL--GAKVAVETGV 121
Sgx9260b FNLPR-----VATLPNVLTVLRAVPIMRAMLRGFTTVRDAGGAGY--PFKQAVESGL 121
CNE      ANLGL-----NAVQPNLVAIRALPIMQRLMERGFTTVRDAGGADW--GLSQAVATGL 123
Sgx9260c ANLGA-----NATQPNILAAIRSLPILDAMLSRGFTSVRDAGGADW--SIMQAVETGL 121
Sgx9359b SKGE-----ESIADSSHMGTVWGVVNAEKTLMAGFTTVRNVGAANYADVSVRDAIERGV 125
Cc2672   EVGGY-----NSLEYSRDFVSVVQTANAKTLEAGFTTVRNVGAADYDDVGLREAI DAGY 152
Cc0300   QSKAQ-----A-PIKVEREMQAILATQHAVYVTFKSGFTTVRQVGDGSLVAISLRDAINSK 131
LCO      SPDSY----SEGFRLLDVEDYAFRSVGYAKKTLLAGFTSVRDLG--GEVSPHLRDAINQGL 150
SNI      SPQSY----SEGFRLLDVEDYAFRAVGYAEKTLMAGFTSVRDLG--GEVSPHLRDAISQGL 147
SCW      SPQSY----SEDFRLLDVEDYAFRAVGYAEKTLMAGFTSVRDLG--GEVSPHLRDAINQGL 144
RWI      TGKNPIAERFTTNNL---DTAYESVAVKRTLDAGFTSVRVDGDDTVVVALKRAIKSGE 152
SDO      -GGDPLRARMTALNTEQADDVLYGAGNAKATLNAGFTTVRDLGGDPRGIRALRDAVDRGD 155

          3
ANI      IVGPNVYSSGAALSQTAGIGDIFALPAGEVLGSGYVMNPRPGYWGAGPLCIADGVEVRR 232
BLI      VRGPRLTIAVNIMSQTGGHGDHFLVSGAESP----FLAPH----PGRPSGVADGLEEVQK 173
Sgx9260b IEGPRLFVSGRALSTGGHADPRARSDYMPDAPCGCCVR---VGLGRVADGVDEVRR 177
CNE      VPGPRIFAAGKALSQTGGHGDHFLVSGAESP----EPCSCAFR---AGAIARVVDGVDAVRL 176
Sgx9260c VSGPRIFPSGKALSQTGGHGDHFLVSGAESP----EPCSCCFR---TGAIARVVDGVEVRL 174
Sgx9359b INGPTMLVSGPALGITGGHGDHFLVSGAESP----PEF---NYSSEGVDVSPWEARK 170
Cc2672   VPGPRIVTAASIFGATGGHGDHFLVSGAESP----PSM---DQKNPFNSDSPDEARK 197
Cc0300   LAGPRIFAAGKTIATGGHADPTNGKAVD-----DYDY----PVPEQGVVNGPVEVYA 180
LCO      VDGPRIWAAGKSIATGGHADPTNGYNSLS----HLLGP----PGPTEGVNSVADARQ 202
SNI      LKGPRIFAAGKSIATGGHADPTNGWNDQLS----HLIGP----PGPTEGVNSVDDARQ 199
SCW      VRGPRIFAAGKSIATGGHADPTNGWNERLA----HLVGA----PGPAEGVNSVDEARQ 196
RWI      ISGPRLVWSVYPLGPGSGHGDPRNGIRTDLD---L-----HSENKVVVDGPEAAVR 199
SDO      VTGPTIVNAGTASVITGGHGDPLNGLAEPYA---HAVA-----QSDNLCDDGPADCVR 205

          4
ANI      AVRLQIRGAKVIVMASGCVMSRDDNPNFAQFSPEELKVIVEEAARQNRIVSAHVHIGKA 292
BLI      KARELLRAGADHIKICSTGCVLSPRDDPRHSQFTAEISVIVAEAAAQGAHVMSHAGGAP 233
Sgx9260b AVREELQMGADQIKIMASGCVASPTDPVGFAGFYSEDEIRAIVAEAEGRGTYYVLAHAHTPA 237
CNE      AVREEIQKASQIKIMASGCVASPTDPIGNTQYSEDEIRAIVAEAEAAQTYVMAHAHTGR 236
Sgx9260c AVREEIQKATQIKIMASGCVASPTDPIANTQYSEDEIRAIVDEAEAAANTYVMAHAHTGR 234
Sgx9359b MVRKNRKYGADLIKFCATGCVMSRNTDVNAKQFTLEEMKAVIIDEAHHNMGKVAHAHGLI 230
Cc2672   AVRTLKKYGAQVIKICATGCVSRGNEPQQQLTYEEMKAVVDEAHMAGIKVAHAHAGTE 257
Cc0300   AVRQRYKDGADGKIKITATGCVLVAKSGQNPQFTQEEVDVAVSAAKDYGMVAVVAHAGAE 240
LCO      AVRQRYKDGSDVIKITATGCVLSYARSGDAPQFRVDEIQAIIVDTAKDYGYHVAHAHAGTE 262
SNI      AVRQRYKEGSDVIKITATGCVLSYARSGDAPQFTVDEIKAVVDTARDYGFVVAHAHAGTE 259
SCW      AVRQRYKEGSDLLKITATGCVLSYARSGDAPQFTVDEIKAVVDTARDYGFVVAHAHAGTE 256
RWI      IVREMRHDGVDLIKIMPSGCVLSIGDDPNVTLMSDAEIKAVVDTAHLNLMRVAHAHAGQN 259
SDO      ATRRQIGLGAQVIKITATGCVLSNVSGGLGRAFTPEEMKAVIIVDTAHLNLMRVAHAHAGN 265

          5
ANI      AVRLQIRGAKVIVMASGCVMSRDDNPNFAQFSPEELKVIVEEAARQNRIVSAHVHIGKA 292
BLI      KARELLRAGADHIKICSTGCVLSPRDDPRHSQFTAEISVIVAEAAAQGAHVMSHAGGAP 233
Sgx9260b AVREELQMGADQIKIMASGCVASPTDPVGFAGFYSEDEIRAIVAEAEGRGTYYVLAHAHTPA 237
CNE      AVREEIQKASQIKIMASGCVASPTDPIGNTQYSEDEIRAIVAEAEAAQTYVMAHAHTGR 236
Sgx9260c AVREEIQKATQIKIMASGCVASPTDPIANTQYSEDEIRAIVDEAEAAANTYVMAHAHTGR 234
Sgx9359b MVRKNRKYGADLIKFCATGCVMSRNTDVNAKQFTLEEMKAVIIDEAHHNMGKVAHAHGLI 230
Cc2672   AVRTLKKYGAQVIKICATGCVSRGNEPQQQLTYEEMKAVVDEAHMAGIKVAHAHAGTE 257
Cc0300   AVRQRYKDGADGKIKITATGCVLVAKSGQNPQFTQEEVDVAVSAAKDYGMVAVVAHAGAE 240
LCO      AVRQRYKDGSDVIKITATGCVLSYARSGDAPQFRVDEIQAIIVDTAKDYGYHVAHAHAGTE 262
SNI      AVRQRYKEGSDVIKITATGCVLSYARSGDAPQFTVDEIKAVVDTARDYGFVVAHAHAGTE 259
SCW      AVRQRYKEGSDLLKITATGCVLSYARSGDAPQFTVDEIKAVVDTARDYGFVVAHAHAGTE 256
RWI      IVREMRHDGVDLIKIMPSGCVLSIGDDPNVTLMSDAEIKAVVDTAHLNLMRVAHAHAGQN 259
SDO      ATRRQIGLGAQVIKITATGCVLSNVSGGLGRAFTPEEMKAVIIVDTAHLNLMRVAHAHAGN 265

```

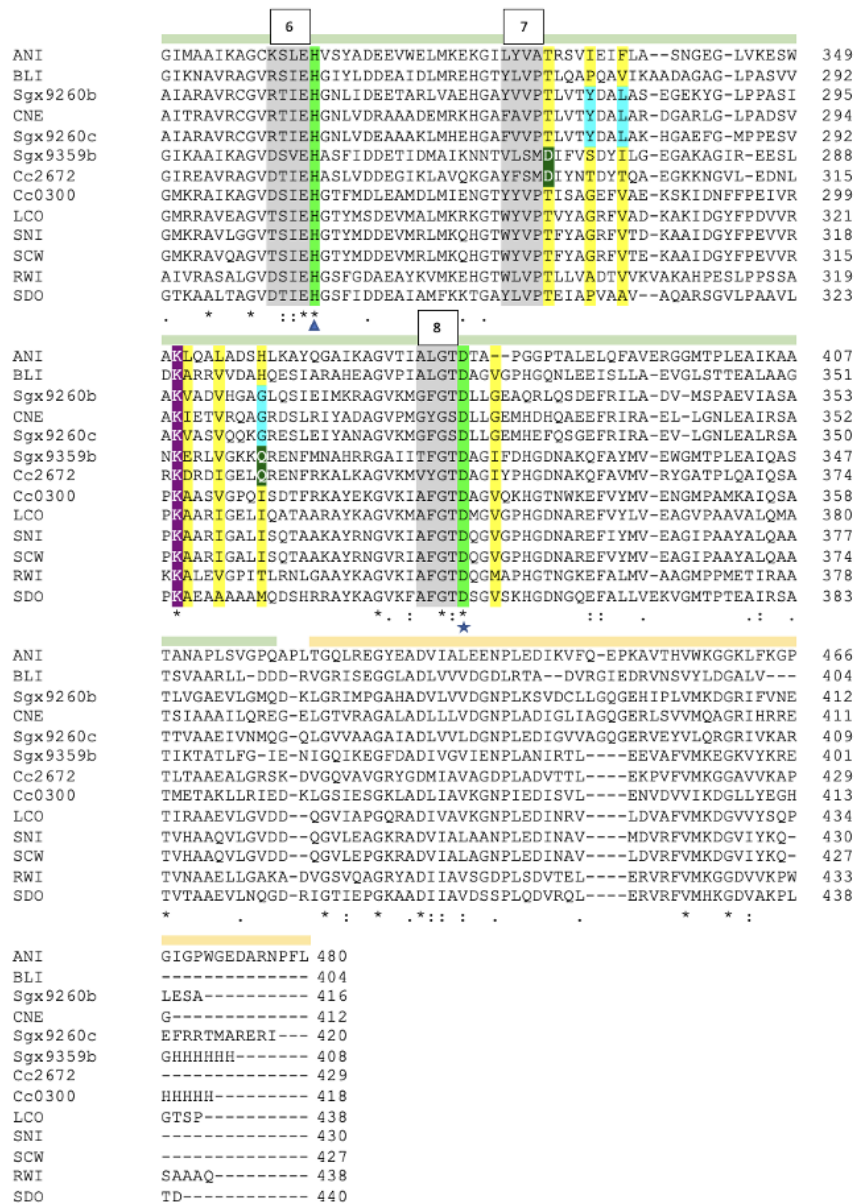


Figura 18. Matriz de identidad (A) y alineamiento (B) de las proteínas identificadas en este trabajo pertenecientes a la familia M38 de peptidasas y similares a la ocratoxinas de *A. niger* UVK143. El nombre de cada secuencia corresponde a la primera letra del género y las dos primeras letras de la especie del microorganismo del que procede. Se incluyen las secuencias de proteínas descritas previamente y pertenecientes a la familia M38 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 (SCW) (Luo et al., 2022) y las proteínas caracterizadas Sgx9260c y Sgx9260b (caracterizadas como prolidasas), Sgx9359b y Cc2672 (especificidad por sustratos de Arg/Leu) y Cc0300 (especificidad por sustratos hidrofóbicos) (Xiang et al., 2010; Xiang et al., 2009a, 2009b). Se indica (*) identidad entre aminoácidos, (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo. Los guiones representan espacios introducidos para maximizar similitudes. La secuencia de aminoácidos que conforman el péptido señal se señala en verde oscuro. El barril β aparece indicado con una barra amarilla y el barril TIM ((α/β)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 para los que se ha descrito su participación en la unión al sustrato (Dai et al., 2023; Leitão & Enguita, 2021; Xiang et al., 2010; Xiang et al., 2009a, 2009b). El alineamiento y la matriz de identidad se obtuvieron mediante el programa Clustal Omega.

La familia M38 pertenece al clan MJ de peptidasas de acuerdo con la base de datos *MEROPS*. Este clan engloba enzimas de tipo co-catalítico con dos iones metálicos (comúnmente zinc) por monómero de proteína, característica compartida con las proteínas del clan MH. La característica estructural común entre los miembros de este clan es que el dominio catalítico del monómero presenta un plegamiento en forma de barril TIM, formado por ocho láminas β rodeadas de ocho α hélices. Las proteínas pertenecientes a la familia M38 presentan, además, un segundo dominio barril β más pequeño que consta de una lámina externa, formada por el segmento N-terminal, y una lámina interna, formada por el segmento C-terminal de cada monómero. El segmento N-terminal está expuesto al solvente y constituye la parte más flexible de la molécula. Por su parte, los residuos de la capa interna forman un sándwich entre la capa externa del barril β y el barril TIM (**Figura 19**) (Xiang et al., 2009a).

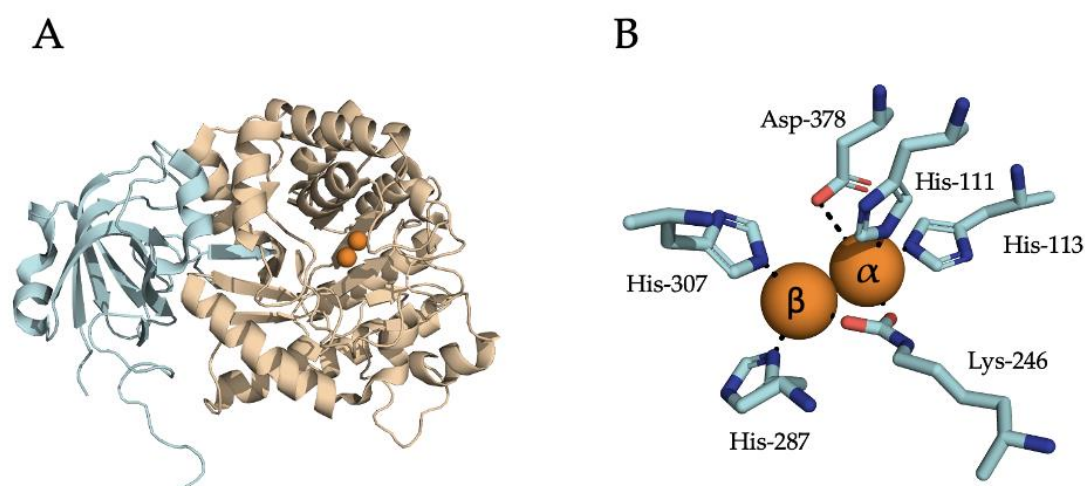


Figura 19. Estructura tridimensional (A) y representación esquemática del centro catalítico (B) de una subunidad de *AnOTasa* (código PDB: 4C5Y). El barril β aparece representado en azul y en beige el barril TIM. Las esferas marrones representan los iones metálicos del centro activo, se indican el metal α y β . Las figuras han sido obtenidas con el software *PyMOL* versión 2.5.0.

El clan MJ se caracteriza porque dos de los residuos de unión al metal se localizan en el motivo “HXH”. En las proteínas de la familia M38 los ligandos metálicos incluyen cuatro histidinas, un ácido aspártico y una lisina, correspondientes a His-111, His-113, Lys-246, His-287, His-307 y Asp-378 en *AnOTasa* (Dobritzsch et al., 2014; Thoden et al., 2003) (**Figura 19**). Los dos iones metálicos están inmovilizados por el residuo de lisina, que se encuentra carboxilado en presencia del metal. En la **Figura 18B**, se indican con un triángulo y una estrella los residuos de unión a cada metal, siendo el metal β el que se encuentra más expuesto al solvente (Leitão & Enguita, 2021). El sitio de unión al sustrato está localizado próximo al centro binuclear metálico, el cual es accesible

desde el exterior por un canal estrecho y está formado por una combinación de residuos hidrofóbicos y polares (Leitão & Enguita, 2021).

Además de los residuos del sitio activo, en estudios de especificidad de sustrato de proteínas pertenecientes a esta familia, se han descrito otros residuos que pueden desempeñar un papel importante. Por ejemplo, se ha descrito que la histidina equivalente a His-191 en *AnOTasa* polariza el grupo carbonilo del enlace que se va a hidrolizar (**Figura 18B**) (Xiang et al., 2010). Asimismo, se ha descrito que los residuos equivalentes a Thr-329, Ile-333, Phe-336, Leu-353, Leu-355 e His-359 en *AnOTasa* también pueden participar en la unión al sustrato (Xiang et al., 2009b). Del mismo modo que los residuos equivalentes a Val-253 y Met-254 en *AnOTasa*, cuyos grupos amida se unen por puentes de hidrógeno con el carboxilato α del sustrato (Xiang et al., 2010). Leitão y Enguita (2021) identifican el residuo His-289 de *AnOTasa* como un residuo que también participa en la formación de estos mismos puentes de hidrógeno. De tal forma que, todas estas interacciones contribuirían a estabilizar el sustrato en el centro catalítico.

Recientemente, se ha resuelto la estructura tridimensional de la enzima ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 (código PDB: 8IHQ), proteína que degrada OTA de forma eficaz. En el estudio, se demuestra que la estructura de esta proteína es similar a la de *AnOTasa*, habiéndose identificado también los residuos involucrados en el sitio activo, los cuales se encuentran conservados (Dai et al., 2023). Asimismo, en dicho trabajo se realizaron una serie de experimentos de mutagénesis con objeto de profundizar en el papel de diversos residuos en la catálisis. Así, se evidenció que la sustitución por un residuo de alanina de los aminoácidos que forman el sitio activo provocaba la abolición de la actividad de la enzima. Además, la sustitución por este mismo aminoácido en las posiciones His-163, Val-217, Leu-218 e His-253 en ADH3 (equivalentes a His-191, Val-253, Met-254 e His-289 en *AnOTasa*) también condujo a una pérdida significativa de la actividad de ADH3. Por el contrario, la sustitución de Ile-325 (His-359 en *AnOTasa*) por alanina dio lugar a un aumento del 34% de la actividad para degradar OTA, probablemente debido a que la cadena lateral del residuo de alanina (de menor tamaño que la del residuo de isoleucina) da lugar a mayor espacio en la cavidad para acomodar OTA. En un intento por aumentar la actividad de la enzima, se construyeron mutantes en los residuos Ser-88, Val-347 y Leu-218 en ADH3. Entre los mutantes, encontraron que el intercambio del residuo Ser-88 por un residuo de ácido glutámico, lisina o histidina conducía a un aumento de 3,7-, 2,4- y 1,3- veces la actividad de la enzima, respectivamente; sugiriendo que este aumento puede ser debido a interacciones polares adicionales que contribuyen a la estabilización de OTA en el bolsillo catalítico (Dai et al., 2023).

En el alineamiento que muestra la **Figura 18B**, se observa que todos los residuos catalíticos implicados en la unión al metal se encuentran conservados. Sin embargo, aparecen diferencias al observar los residuos identificados como relevantes en la unión al sustrato. Las posiciones señaladas por estar implicadas en la unión al sustrato en el estudio realizado por Dai y colaboradores (2023) no se encuentran completamente conservadas entre las proteínas recogidas en este estudio. Este hecho podría traducirse en diferentes niveles de actividad o diferentes espectros de especificidad de sustrato.

En el alineamiento se han incluido proteínas identificadas como carboxipeptidasas cuya especificidad de sustrato se ha descrito previamente. Entre ellas, la enzima Cc0300 que presenta preferencia por residuos hidrofóbicos, Sgx9359b y Cc2672 que muestran preferencia por residuos de arginina y lisina, y Sgx9260c y Sgx9260b que prefieren residuos de prolina (Xiang et al., 2010, 2009a, 2009b). Al observar el alineamiento, se comprueba que las proteínas identificadas en este estudio comparten las regiones involucradas en el sitio de unión al sustrato con la carboxipeptidasa descrita con preferencia por residuos hidrofóbicos (Cc0300), a excepción de la enzima de *C. necator*, que tiene más residuos en común con las proteínas identificadas bioquímicamente como prolidasas. La **Figura 18B** muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos con proteínas pertenecientes a la familia M38, la conservación de motivos y de residuos catalíticos apoya la clasificación de las nuevas proteínas descritas en esta tesis como peptidasas M38.

La caracterización de estas enzimas de la familia M38 de peptidasas se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia empleada con las proteínas similares a AfOTasa y pertenecientes a la familia M20 (M20D) de peptidasas. Una vez que las proteínas recombinantes se hiperprodujeron y purificaron, se evaluó su capacidad para degradar OTA (**Figura 20**). Para ello, se incubaron en presencia de OTA (2 µg/ml) y se comprobó que las proteínas identificadas son capaces de degradar la micotoxina, excepto en el caso de la peptidasa candidata de *C. necator* (*Cnp* de *C. necator* peptidasa). Debido a la inactividad de *Cnp* sobre OTA, no se continuó con su caracterización. De manera similar al caso de AfOTasa y CnOTasa, se observó que el mecanismo de acción de las enzimas es la hidrólisis del enlace amida, dando lugar a L-β-fenilalanina y OTα (**Figura 20**). Debido a su actividad confirmada sobre OTA, se decidió denominar a estas proteínas: BlOTasa (de ocratoxinasa de *B. linens* DSM 20425^T), LcOTasa (de *L. concretionis* DSM 16239^T), SdOTasa (de *S. dokdonensis* DSM 21029^T), SnOTasa (de *S. nitritireducens* DSM 12575^T) y RwOTasa (de *R. wittichii* DSM 6014^T).

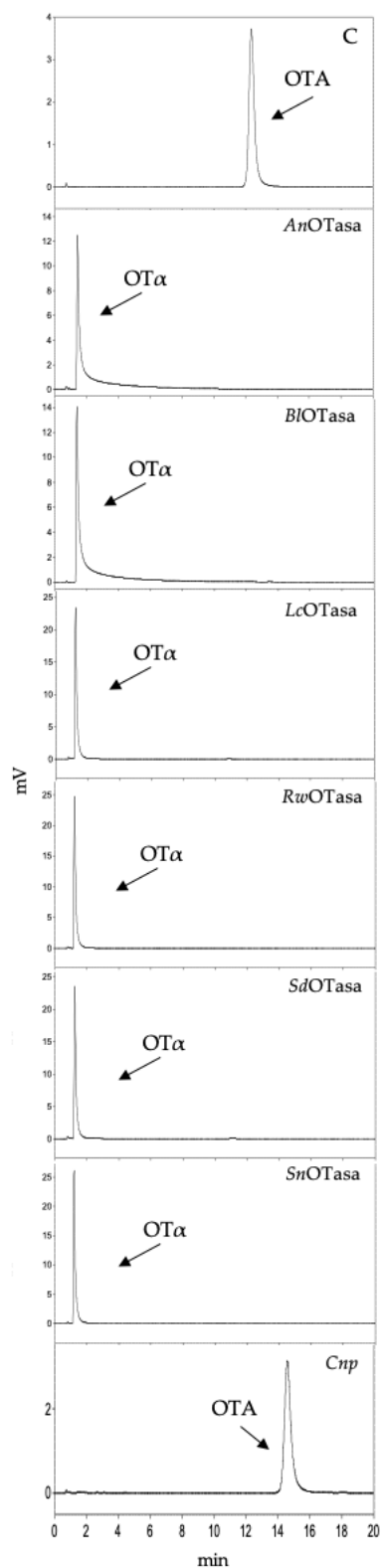


Figura 20. Degradación de OTA por peptidasas de la familia M38. Las proteínas se incubaron con OTA (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 18 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se indica el control (C), reacción sin enzima.

Una vez demostrada la actividad de las proteínas sobre OTA, se determinó la actividad específica de estas enzimas utilizando para ello el análogo 4MF, en condiciones de saturación de sustrato (**Tabla 16**). Las enzimas que muestran una

mayor actividad específica son *AnOTasa* y *BLOTasa*, siendo muy superior a la presentada por el resto de las enzimas identificadas de esta familia. Como se ha mencionado en el Apartado 3.1 de Resultados y discusión, cabe señalar que la comparación de la actividad de enzimas metalodependientes que poseen un centro activo binuclear debe hacerse con cautela, ya que ésta puede verse afectada por la posible pérdida de parte los metales de su centro activo.

Tabla 16. Actividad específica de las proteínas de la familia M38 de peptidasas.

Enzima	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)	RSD ^a (%)
<i>AnOTasa</i>	6,38	5,69
<i>BLOTasa</i>	6,85	7,36
<i>LcOTasa</i>	0,31	12,31
<i>RwOTasa</i>	0,28	11,65
<i>SdOTasa</i>	0,04	6,11
<i>SnOTasa</i>	0,10	10,68

^aRSD desviación estándar relativa

3.2.1 Efecto del pH

Las enzimas que mostraron actividad sobre OTA fueron caracterizadas, en primer lugar, estudiando el efecto de diferentes valores de pH sobre su actividad. En la **Figura 21**, se puede observar un comportamiento similar entre las enzimas, presentando la mayoría de ellas un pH óptimo de 6,5 (*AnOTasa*, *LcOTasa*, *SdOTasa*, *SnOTasa* y *RwOTasa*). Sin embargo, la enzima *BLOTasa* rompe con esta tendencia, presentando como pH óptimo un valor más básico, pH 8. En los valores de pH más ácidos (3-4), las enzimas no presentan actividad o ésta se encuentra por debajo del 10%. A pH 5, *AnOTasa*, *SdOTasa* y *RwOTasa* presentan una baja actividad (5-15%); en cambio, *BLOTasa*, *LcOTasa* y *SnOTasa* muestran una actividad en torno al 40%. En la zona neutra del intervalo (pH 6-7), la mayoría de las enzimas presentan su pH óptimo o una actividad superior al 70%, excepto *BLOTasa* que presenta una actividad ligeramente menor (alrededor del 60%). A pH 8, todas las enzimas conservan más del 40% de su actividad, *LcOTasa* mantiene un 90% y, como ya se ha mencionado, éste es el valor de pH óptimo de *BLOTasa*. Finalmente, a pH 9, las enzimas más activas son *BLOTasa*, *LcOTasa* y *RwOTasa*, las cuales retienen entre el 60 y el 70% de su actividad máxima; mientras que el resto conservan entre el 30 y el 40%. Los resultados indican que, entre las enzimas analizadas, existen ligeras variaciones en su comportamiento, la mayoría de ellas presentan mayor actividad a valores de pH neutros, mientras que la enzima con alta actividad en un intervalo más amplio de pH es *LcOTasa*.

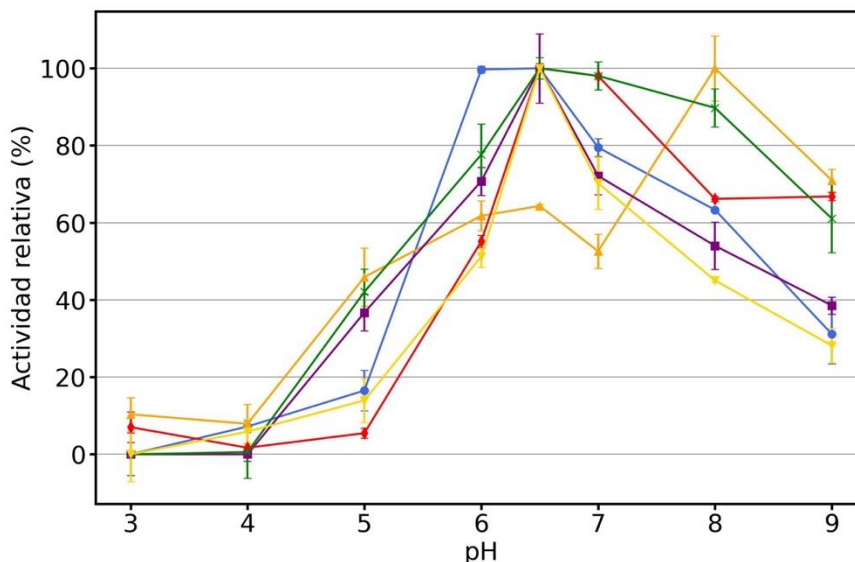


Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad de las peptidasas de la familia M38 que degradan OTA, *AnOTasa* (azul), *BlOTasa* (naranja), *SnOTasa* (morado), *RwOTasa* (rojo), *LcOTasa* (verde) y *SdOTasa* (amarillo). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de *AnOTasa* se describió previamente por Dobritsch y colaboradores (2014), en el mismo estudio en el que describieron esta enzima por primera vez. Para la caracterización emplearon el mismo método colorimétrico utilizado en esta tesis, basado en el seguimiento de la degradación del análogo de OTA, 4MF. El comportamiento de *AnOTasa* observado en el presente estudio es similar al descrito por estos investigadores, ya que obtuvieron la actividad más alta (>95%) entre los valores de pH 5,5 y 6,5 (Dobritsch et al., 2014). De nuevo, las pequeñas diferencias encontradas entre los ensayos pueden deberse a variaciones en las condiciones experimentales, como el uso de diferentes tampones. De hecho, en ese mismo estudio se obtuvo un pH óptimo de 7 cuando se analizó la actividad de *AnOTasa* utilizando OTA como sustrato, los investigadores justifican esta diferencia basándose en los diferentes tiempos de incubación empleados en ambos ensayos (Dobritsch et al., 2014). Luo y colaboradores (2022) también estudiaron el efecto de parámetros fisicoquímicos sobre la actividad de la enzima ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 utilizando OTA como sustrato. Con relación al efecto del pH, observaron que entre los valores de pH 3 y 5 la enzima ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 no presenta actividad, sin embargo, ésta incrementa gradualmente hasta llegar a su máximo a pH 8 (Luo et al., 2022). Este valor coincide con el encontrado como pH óptimo para *BlOTasa* en el presente estudio. Sin embargo, ADH3 pierde rápidamente su actividad a pH 9 (mantiene alrededor del 30%) frente al 70% de actividad que conserva *BlOTasa* (Figura 21). Por su parte, la isoaspartil dipeptidasa (*IadA*) de *E. coli*, proteína tipo de la familia M38 de peptidasas, también alcanza su actividad óptima en valores de pH ligeramente básicos (7,4-8) (Haley, 1968).

3.2.2 Efecto de la temperatura y estudio de la termoestabilidad

Respecto al efecto de la temperatura, todas las enzimas presentan una temperatura óptima alta, superior a los 40 °C (**Figura 22**). La proteína *AnOTasa* presenta la temperatura óptima más alta (65 °C), siendo, asimismo, la que presenta mayor actividad a temperaturas más altas, superior al 90% entre los 55 y 65 °C. Este comportamiento coincide con los resultados observados por Dobritzsch y colaboradores (2014). De forma general en el trabajo descrito en esta tesis, la temperatura más alta ensayada fue 65 °C, sin embargo, en el caso de *AnOTasa* fue necesario ampliar el intervalo ensayado para evaluar la temperatura a la que esta enzima empieza a disminuir su actividad. A 75 °C, *AnOTasa* sigue conservando un 59% de su actividad, en cambio, se observa que la enzima se inactiva por completo al incubarse a 85 °C. En lo que respecta al resto de proteínas, la temperatura óptima es de 55 °C para *BLOTasa* y *SdOTasa*. Si bien, las enzimas *SdOTasa*, *RwOTasa* y *SnOTasa* muestran un intervalo amplio de actividad máxima, con actividades superiores al 90% entre los 40 y 55 °C. Por su parte, *LcOTasa* exhibe su máximo de actividad a los 45 °C y es la enzima que presenta menor actividad al aumentar la temperatura a 55 °C (54%).

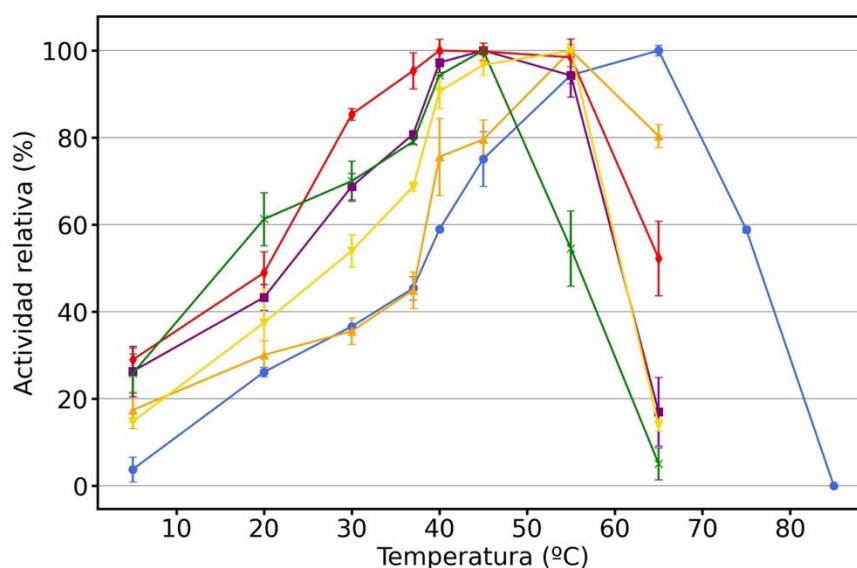


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las peptidasas de la familia M38 que degradan OTA, *AnOTasa* (azul), *BLOTasa* (naranja), *SnOTasa* (morado), *RwOTasa* (rojo), *LcOTasa* (verde) y *SdOTasa* (amarillo). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

Se ha descrito que la enzima ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117 presenta una temperatura óptima de 40 °C, resultando similar a la mostrada por las enzimas ensayadas en este estudio. No obstante, para el resto de las temperaturas, ADH3 presenta pérdidas de actividad acusadas al alejarse del valor de temperatura óptima (Luo et al., 2022).

En lo que respecta a la termoestabilidad, la enzima *AnOTasa* fue descrita por Dobritsch y colaboradores (2014) como una proteína termoestable. El ensayo que realizaron consistió en preincubar la enzima a 80 °C durante diferentes periodos de tiempo, hasta los 10 min; pasados 3 min, no detectaron pérdida de actividad y, tras 10 min de incubación, la enzima seguía conservando un 50% de su actividad inicial.

En el presente trabajo, la termoestabilidad se estudió sometiendo a las enzimas a tratamientos térmicos a diferentes temperaturas y durante periodos de tiempo comprendidos entre los 15 min y las 20 h (**Figura 23**). Entre las enzimas estudiadas, *AnOTasa* resultó ser la más termoestable. Tras 6 h de incubación a todas las temperaturas ensayadas, la enzima sigue conservando su actividad máxima, excepto a 65 °C donde muestra un 83% de su actividad original. Asimismo, después de 20 h de incubación a 20, 30 y 37 °C, la actividad de la enzima continúa siendo superior al 80%; a 45 °C, conserva más de la mitad de su actividad original (62%), mientras que la preincubación durante 20 h a 55 y 65 °C disminuye su actividad en gran medida (<20%). Las enzimas *BlOTasa* y *LcOTasa* son menos termoestables en comparación con *AnOTasa*. Estas proteínas conservan su actividad original después de una incubación durante 6 h a 20, 30 y 37 °C. Tras 6 h a 45 °C, *LcOTasa* mantiene un 70% de su actividad, mientras que *BlOTasa* mantiene un 43%. Por el contrario, la preincubación durante 6 h a 55 y 65 °C inhibe marcadamente a *LcOTasa* (>10%), mientras que *BlOTasa* conserva entre un 40 y un 30% de actividad respecto a la de la enzima sin tratamiento térmico. Las enzimas que muestran menor termoestabilidad del grupo son *SnOTasa*, *RwOTasa* y *SdOTasa*. Tras 6 h de incubación a temperaturas entre los 20 y 45 °C, *SnOTasa* y *RwOTasa* muestran actividades en torno al 45 y 60%. Al aumentar la temperatura de preincubación a los 55 y 65 °C, ambas enzimas conservan menos de un 10% de actividad. La preincubación de 20 h entre los 20 y 37 °C disminuye la actividad, manteniendo entre el 30 y el 60% de su actividad original; la preincubación a 45 °C conlleva valores de actividad alrededor del 25% y, por encima de los 55 °C, *RwOTasa* conserva menos de un 5% de actividad, mientras que *SnOTasa* se inactiva por completo. Los resultados obtenidos indican que la enzima menos termoestable es *SdOTasa*, la cual presenta un 77, 55 y 29% de actividad tras una preincubación durante 6 h a 20, 30 y 37 °C, respectivamente; además, la preincubación de 6 h a 45 °C conlleva una pérdida completa de la actividad de la enzima. De igual modo, tras 20 h de incubación, esta enzima presenta menos de un 5% de actividad a todas las temperaturas ensayadas (**Figura 23**).

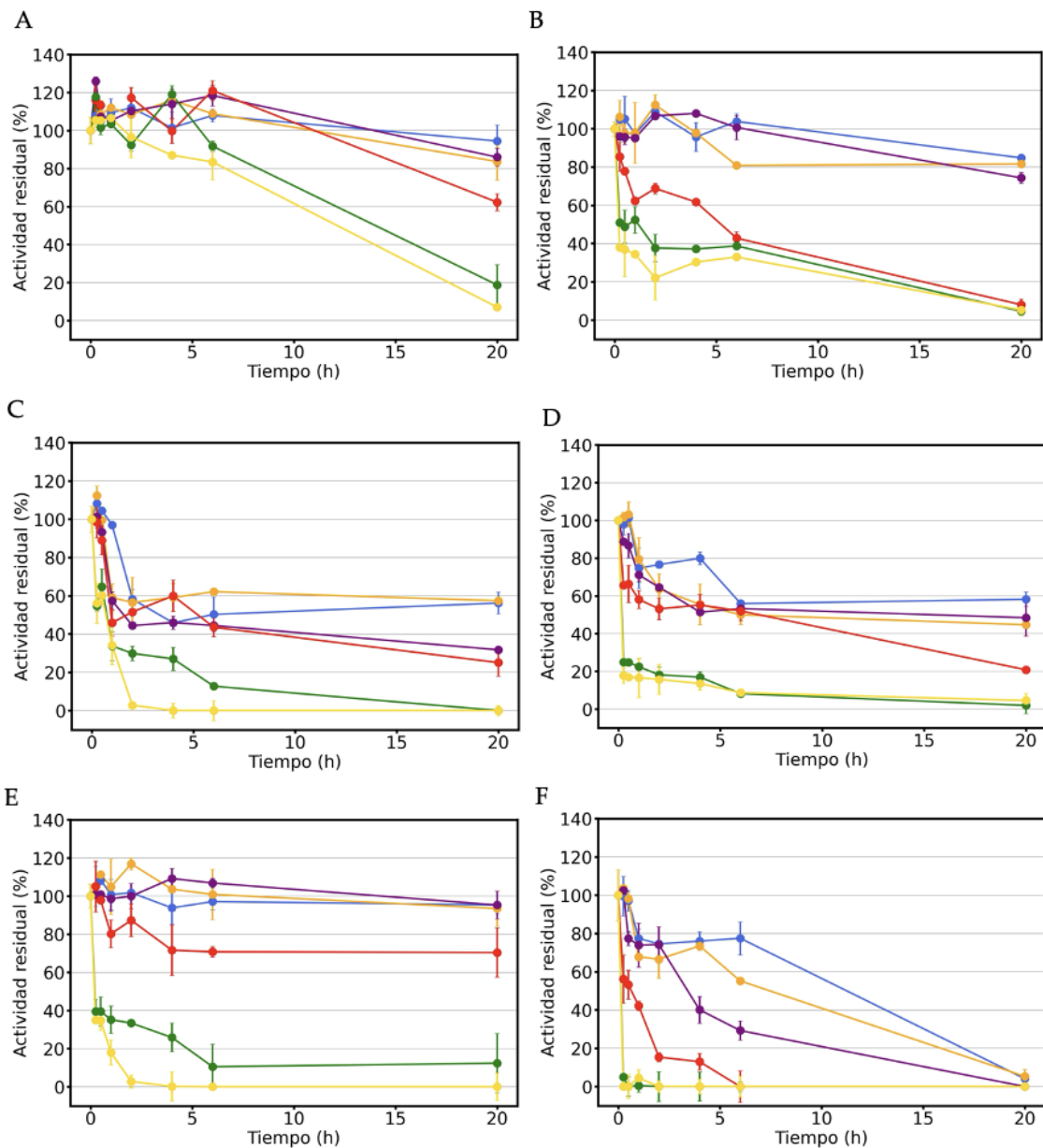


Figura 23. Termoestabilidad de las peptidasas de la familia M38 que degradan OTA, *AnOTasa* (A), *BIOTasa* (B), *SnOTasa* (C), *RwOTasa* (D), *LcOTasa* (E) y *SdOTasa* (F). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. El control sin preincubación de la enzima se tomó como el 100% de actividad. Preincubación a 20 °C (azul), 30 °C (naranja), 37 °C (morado), 45 °C (rojo), 55 °C (verde) y 65 °C (amarillo).

3.2.3 Efecto de aditivos

Una vez caracterizado el comportamiento de las enzimas de la familia M38 de peptidasas frente a variaciones de pH y temperatura, así como su termoestabilidad, se continuó con el estudio del efecto de la incubación con diferentes aditivos sobre la actividad de las enzimas. Se observan diferentes comportamientos en función del compuesto añadido (**Figura 24**). La incubación

con iones metálicos se traduce en efectos diferentes, si bien, todas ellas se inhiben tras la incubación con Hg^{+2} y Cu^{+2} . *AnOTasa* y *BLOTasa* presentan una tendencia similar, inhibiéndose por todos los iones metálicos ensayados, en proporciones que van desde una disminución del 100% hasta el 20%; a modo de excepción, la enzima *BLOTasa* mantiene su actividad original en presencia de Ca^{+2} y un 90% en presencia de K^+ . *SnOTasa* también se inhibe en presencia de cinco de los nueve iones metálicos estudiados, manteniendo su actividad en presencia de K^+ , Zn^{+2} , Ni^{+2} y Mn^{+2} . Por el contrario, la actividad del resto de enzimas del grupo aumenta en presencia de algunos de estos metales. El caso más llamativo es el de la incubación de *LcOTasa* en presencia de Zn^{+2} , que duplica su actividad original. La actividad de esta enzima incrementa o se mantiene tras la incubación con todos los metales estudiados, excepto con los ya mencionados, Hg^{+2} y Cu^{+2} , y con Mg^{+2} , cuya presencia supone la pérdida de un 20% de su actividad original. *SdOTasa* se inhibe en presencia de los mismos metales que *LcOTasa*, y su actividad se ve potenciada por la incubación con Ni^{+2} y Mn^{+2} . Ni^{+2} también es el ión metálico que incrementa la actividad de *RwOTasa* en mayor proporción. *RwOTasa* es la única enzima para la que la presencia de K^+ inhibe por completo su actividad.

En último lugar, se estudió la actividad de las enzimas en presencia de inhibidores de proteasas y agentes quelantes. La enzima *AnOTasa* está descrita como una metaloenzima (Dobritzsch et al., 2014) y el alineamiento que aparece en la **Figura 18B** apoya la clasificación de las proteínas identificadas en este estudio dentro de la misma familia de metalopeptidasas (M38). Por este motivo, al igual que con las enzimas pertenecientes a la familia M20 (M20D), es de esperar que este tipo de inhibidores disminuyan la actividad de las enzimas. Los resultados indican que *LcOTasa* es la enzima menos afectada por la presencia de estos inhibidores, manteniendo un 100% de actividad en presencia de todos ellos; en cambio, las otras enzimas sí que se ven afectadas en distintas proporciones. De manera general, el compuesto que ejerce un efecto menor es el PMSF, inhibidor de serín proteasas, lo que indica que la serina no forma parte del centro catalítico de estas enzimas; este hecho concuerda con el sitio catalítico descrito en el análisis de la secuencia de aminoácidos (**Figura 18B**). Por el contrario, los compuestos con mayor efecto son 8-hidroxiquinolina y 1,10-fenantrolina, agentes quelantes de iones metálicos. La inhibición de la actividad observada por estos dos compuestos junto con el efecto potenciador de algunos iones sobre la actividad de las enzimas confirmaría la participación de iones metálicos en el proceso catalítico.

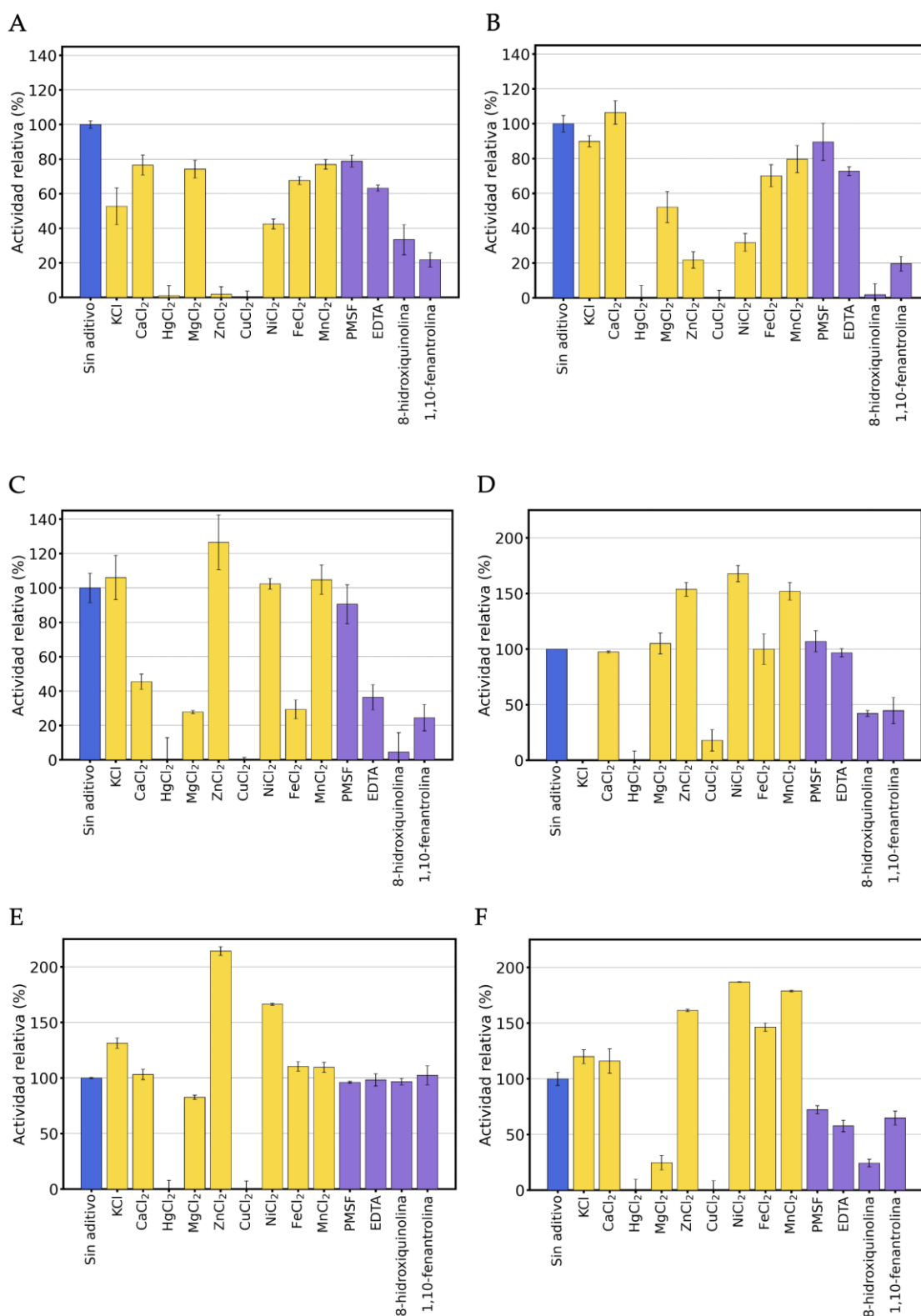


Figura 24. Efecto de distintos aditivos sobre la actividad de las enzimas pertenecientes a la familia M38, *AnOTasa* (A), *BfOTasa* (B), *SnOTasa* (C), *RuOTasa* (D), *LcOTasa* (E) y *SdOTasa* (F). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. El control sin presencia de aditivo se consideró como el 100% de actividad. Se indican: control sin aditivo (azul), iones metálicos (amarillo) e inhibidores de proteasas y agentes quelantes (morado).

Dobritzsch y colaboradores (2014) también analizaron la actividad de *Av*OTasa en presencia de EDTA (10 y 20 mM) y 1,10-fenantrolina (0,25; 0,5; 2,5; 5 y 10 mM). En su ensayo, el EDTA no originó ningún efecto sobre la actividad de la enzima y la 1,10-fenantrolina inhibió completamente su actividad (Dobritzsch et al., 2014). Sin embargo, en el trabajo realizado en esta tesis, se observa una disminución de actividad en presencia de EDTA (1 mM) (aproximadamente un 30% menos) y el compuesto 1,10-fenantrolina (1 mM) tiene un fuerte efecto inhibitorio, pero no causa una pérdida completa de la actividad, puesto que la enzima mantiene un 20% de su actividad original. Nuevamente, las diferencias observadas entre ambos ensayos se pueden deber a diferencias en las condiciones experimentales empleadas.

En el caso de la enzima ADH3 degradadora de OTA de *Stenotrophomonas* sp. CW117, Luo y colaboradores (2022) observaron pérdida de actividad sobre OTA en presencia de una concentración 10 mM de iones divalentes de Ca^{+2} , Mg^{+2} y Fe^{+3} , además, la presencia de Zn^{+2} y Cu^{+2} inhibió prácticamente por completo la actividad de la enzima. Asimismo, estudiaron el efecto de la presencia de EDTA, EGTA (agente quelante específico de Ca^{+2}), SDS y proteinasa K (proteasa con amplia especificidad de sustrato). La actividad de la enzima desaparecía al incubarse con SDS y proteinasa K. La presencia de EGTA disminuía su actividad un 25% aproximadamente, mientras que el EDTA no causó ningún efecto (Luo et al., 2022). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio donde se observa que, a pesar de tratarse de metaloproteasas, en ocasiones los agentes quelantes no tienen un efecto claro sobre la actividad de estas enzimas y su actividad puede verse inhibida en presencia de iones metálicos.

3.2.4 Especificidad de sustrato

Para completar la caracterización de las enzimas de la familia M38 de peptidasas identificadas en este trabajo, se evaluó su actividad sobre los sustratos empleados previamente en el estudio de las proteínas *Af*OTasa y *Cn*OTasa de la familia M20 (M20D) de peptidasas (Apartado 3.1.4 de Resultados y discusión). Se estudió la capacidad de las enzimas de la familia M38 para degradar OTB y, nuevamente, se confirmó la actividad de todas ellas frente a esta micotoxina (**Figura 25**). Por el contrario, ninguna de las enzimas presentó actividad endopeptidasa al utilizar BSA como sustrato, puesto que no se observaron productos de hidrólisis tras analizar las reacciones en un gel SDS-PAGE (**Anexo II**).

Respecto a su posible actividad aminoacilasa frente a los N-acetil-L-aminoácidos analizados, se observa que cada una de las proteínas ensayadas presenta un perfil de degradación específico. La **Figura 26** muestra la actividad

relativa de las enzimas respecto al sustrato por el que cada una de ellas exhibe mayor actividad de cada uno de los grupos (considerado como el 100% de actividad). Se puede observar que *An*OTasa no es capaz de degradar ninguno de los N-acetil-L-aminoácidos ensayados, lo que sugiere que esta enzima carece de actividad aminoacilasa, al menos sobre los sustratos incluidos en este estudio. Por el contrario, el resto de las enzimas sí que tienen la capacidad de degradar al menos uno de ellos. Tal es el caso de *Sn*OTasa y *Rw*OTasa que únicamente degradan AM. Por su parte, las enzimas *Bl*OTasa y *Sd*OTasa degradan AL y AF; *Bl*OTasa también es capaz de degradar, aunque en menor medida, AY y, así mismo, *Sd*OTasa muestra actividad frente a AM. *Lc*OTasa resultó ser la enzima más promiscua con relación a su actividad aminoacilasa, puesto que es capaz de degradar parcialmente todos los sustratos ensayados excepto AD, AE y AP. Los resultados obtenidos indican que estas proteínas presentan un perfil de degradación muy variado (**Figura 26**).

La actividad hidrolítica de estas enzimas se ensayó también frente a 13 derivados N-benciloxicarbonil. Las enzimas *Sn*OTasa y *Rw*OTasa no presentan actividad frente a ninguno de los sustratos evaluados (**Figura 26**). Por su parte, *Sd*OTasa es activa frente a ZF, ZL y ZY, repitiendo preferencia por los residuos de fenilalanina y leucina, como en el caso de la actividad aminoacilasa mostrada por esta enzima. Asimismo, *Bl*OTasa presenta preferencia de nuevo por los sustratos con residuos de leucina, fenilalanina y tirosina (ZL, ZF y ZY) y, además, en el caso de este tipo de compuestos, presenta una actividad más heterogénea, siendo capaz de degradar parcialmente todos los derivados carbobenciloxi-ensayados excepto ZE, ZD y ZP. *Lc*OTasa muestra preferencia por los derivados de leucina, metionina, serina y lisina (ZL, ZM, ZS y ZK), sin embargo, no es capaz de hidrolizar algunos sustratos cuyo derivado N-acetil sí que fue capaz de degradar; por ejemplo, la enzima muestra actividad frente al sustrato AF, pero no frente a ZF. *An*OTasa, que no presentó actividad frente a ningún sustrato N-acetil, sí que presenta actividad frente a los compuestos carbobenciloxi- con un residuo de fenilalanina o leucina (ZF y ZL), principalmente.

El ensayo de degradación de OTA y OTB confirmó previamente en este estudio la actividad amidohidrolítica de estas enzimas sobre residuos de fenilalanina situados en el extremo C-terminal. Dicha actividad se demostró nuevamente empleando GF y HF, sustratos frente a los que las enzimas muestran actividad y preferencia respecto al otro derivado ensayado (HR y GA), excepto *Sn*OTasa que no degrada GF (**Figura 26**). Esta enzima tampoco degrada GA, por lo que la falta de actividad puede deberse a la presencia de glicina en el extremo N-terminal de la molécula; no obstante, sería necesario ensayar su actividad frente a un mayor número de derivados para poder establecer una conclusión a este respecto.

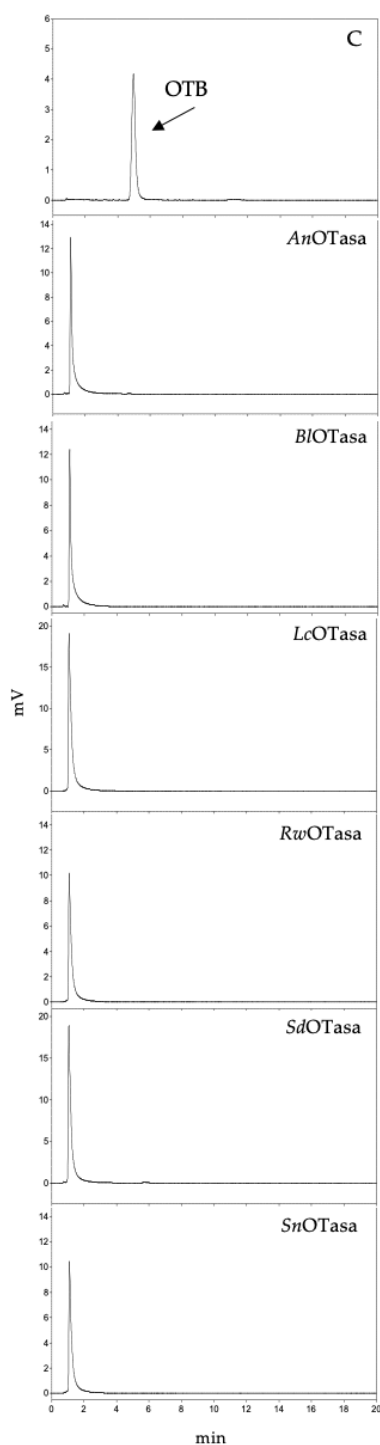


Figura 25. Degradación de OTB por peptidasas de la familia M38. Las proteínas se incubaron con OTB (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 18 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se indica el control (C), reacción sin enzima.

Los resultados obtenidos confirman la actividad carboxipeptidasa de estas enzimas pertenecientes a la familia M38 de peptidasas (**Figura 26**). En conjunto, los resultados demuestran el variado perfil hidrolítico de las peptidasas de la familia M38. Esta diversidad hace que sea relevante analizar la especificidad de sustrato de estas peptidasas como paso previo a su posible utilización para la detoxificación de OTA sobre un sustrato alimentario. En este sentido, la enzima más adecuada sería aquella que tuviese una alta especificidad hacia sustratos con

fenilalanina y una baja especificidad hacia los demás, con el fin de minimizar la hidrólisis de otros componentes de la matriz alimentaria. De todas las proteínas analizadas, *AnOTasa* muestra la actividad hidrolítica más específica hacia sustratos con residuos de fenilalanina en la molécula. Por lo tanto, su especificidad de sustrato la convierte en la enzima más adecuada para la degradación de OTA en un sustrato alimentario.

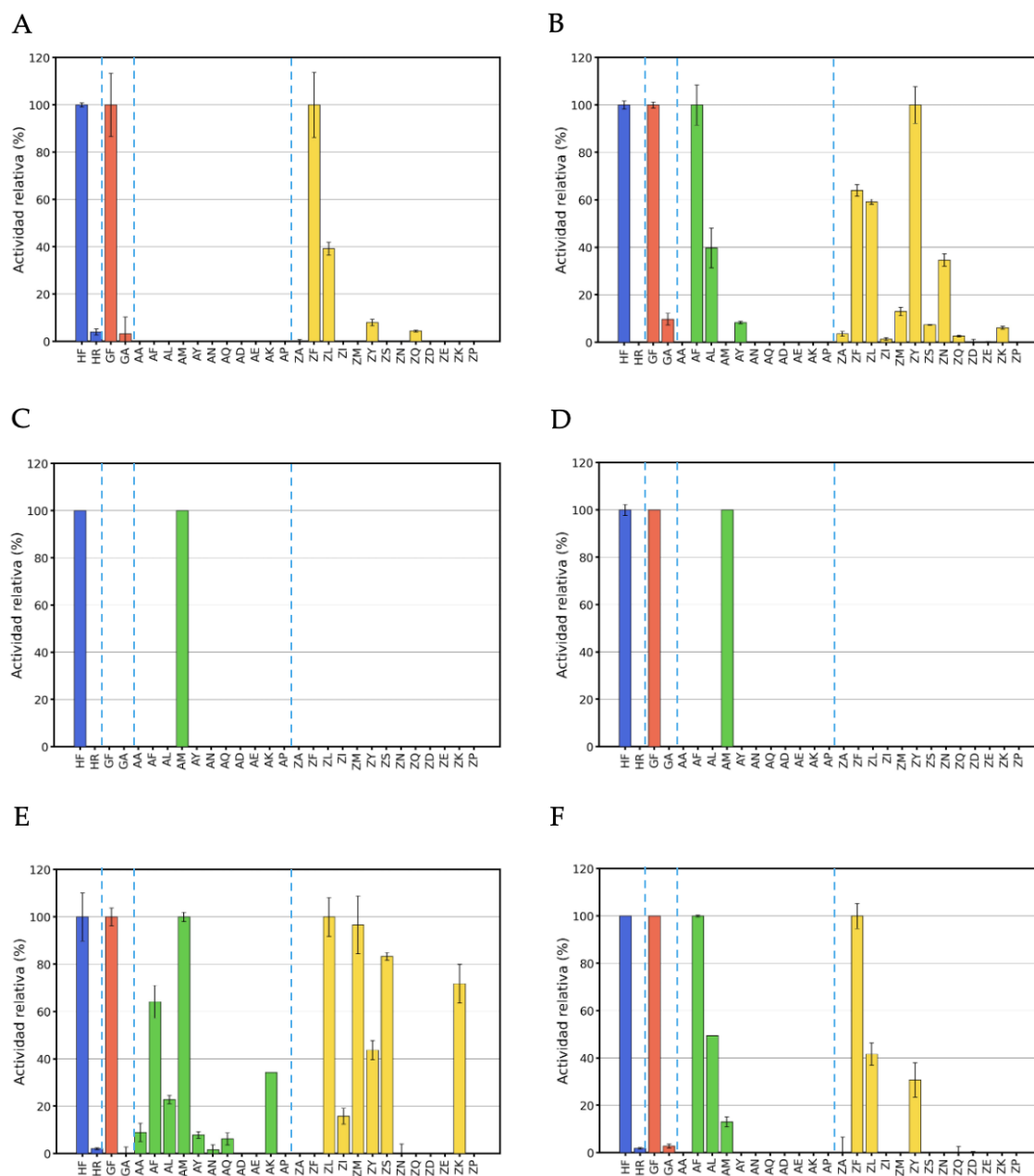


Figura 26. Especificidad de sustrato de las enzimas pertenecientes a la familia M38. *AnOTasa* (A), *BIOTasa* (B), *SnOTasa* (C), *RwOTasa* (D), *LcOTasa* (E) y *SdOTasa* (F). Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. Para cada sustrato se realizó un control sin añadir enzima. Se tomó como 100% la reacción con el sustrato para el que la enzima presentó mayor actividad de cada uno de los grupos. Se representan los sustratos derivados de hipuril (azul), glicil (rojo), N-acetil (verde) y N-carbobenciloxi (amarillo).

Anteriormente se ha descrito que la peptidasa M38 de *C. necator* (*Cnp*) no presenta actividad sobre OTA (Apartado 3.2 de Resultados y discusión), por lo que no se continuó con su caracterización fisicoquímica. Esta incapacidad puede deberse a su incapacidad de hidrolizar sustratos con residuos de fenilalanina, sin embargo, este hecho no implica que la enzima no muestre preferencia por otro tipo de sustratos peptídicos. Como se observó previamente en el alineamiento realizado con otras proteínas de la familia M38 (**Figura 18B**), el alto grado de conservación de los residuos involucrados en la unión al sustrato entre *Cnp* y las proteínas Sgx9260c y Sgx9260b, pertenecientes a la familia M38 e identificadas bioquímicamente como prolidasas (Xiang et al., 2010), podría indicar su preferencia por sustratos que presentan unido un residuo de prolina. Para comprobar esta hipótesis, se decidió estudiar la especificidad de sustrato de *Cnp*. Al realizar el ensayo, los resultados mostraron que *Cnp* no presenta actividad frente a ninguno de los sustratos N-benciloxycarbonil ensayados (**Figura 27**). En el caso de los derivados N-acetil, se observó que la enzima es capaz de hidrolizar algunos de ellos, presentando la mayor actividad sobre AP, sustrato sobre el cual ninguna de las enzimas anteriormente ensayadas muestra actividad. Asimismo, *Cnp* es capaz de hidrolizar AM (20% respecto a AP), AA (33% respecto a AP) y GA. Su incapacidad para hidrolizar los sustratos que contienen fenilalanina coincide con su incapacidad para hidrolizar OTA (**Figura 20**). Este resultado añade valor al alineamiento de secuencias realizado, ya que, a pesar de compartir un grado de identidad con *AnOTasa* similar al mostrado por otras enzimas (por ejemplo, *BIOTasa* presenta un 28,93% de identidad frente a *Cnp* que presenta un 29,93%), se ha demostrado que la variación de determinados residuos implicados en la especificidad de sustrato puede imposibilitar su acción sobre sustratos con fenilalanina.

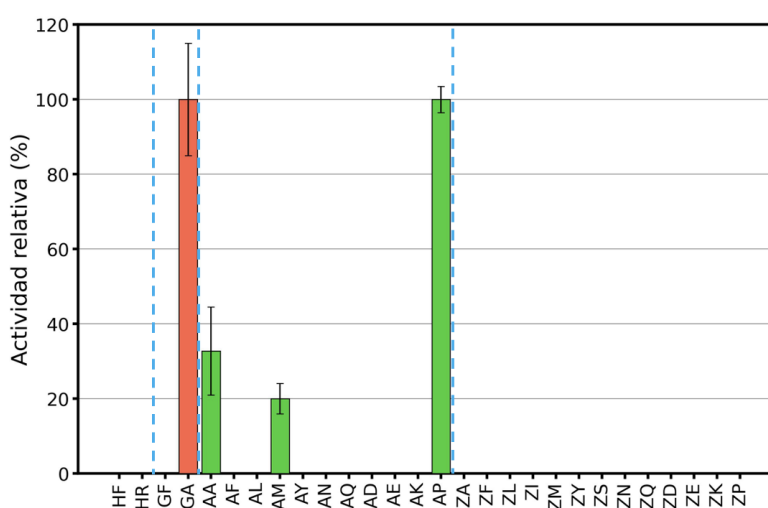


Figura 27. Especificidad de sustrato de la enzima *Cnp*. Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. Para cada sustrato se realizó un control sin añadir enzima. Se tomó como 100% la reacción con el sustrato para el que la enzima presentó mayor actividad de cada uno de los grupos. Se representan los sustratos derivados de hipuril (azul), glicil (rojo), N-acetil (verde) y N-carbobenciloxi (amarillo).

El estudio de la especificidad de sustrato realizado muestra datos relevantes sobre la especificidad de las proteínas identificadas en este trabajo pertenecientes a la familia M38 de peptidasas. En el presente estudio se ha demostrado que estas enzimas presentan actividad aminoacilasa y carboxipeptidasa frente a los sustratos ensayados, excepto en el caso de *AnOTasa* que no presentó actividad frente a ninguno de los derivados N-acetil utilizados. Así, los resultados obtenidos para estas enzimas muestran una preferencia generalizada por residuos hidrofóbicos no polares. En el caso de la enzima *Cnp*, el alineamiento reveló la conservación de aminoácidos específicos implicados en la unión al sustrato con otras enzimas anotadas como prolidasas (Xiang et al., 2010). La supuesta actividad prolidasa de *Cnp* se demostró experimentalmente al observarse su actividad sobre el sustrato AP. Del mismo modo que en el caso de las proteínas pertenecientes a la familia M20 (M20D), se observa que, aunque todas estas enzimas conservan la arquitectura primaria del sitio activo, la parte del bolsillo catalítico implicada en la especificidad del sustrato muestra variabilidad (Seibert & Raushel, 2005); esta variabilidad entre proteínas de una misma familia representa adaptaciones posteriores para diferentes especificidades de sustrato en diferentes contextos celulares (Holm & Sander, 1997). Se ha observado que estas enzimas hidrolizan varios aminoácidos N-acetilados y aminoácidos en el extremo C-terminal de diferentes sustratos. Si bien, el sustrato fisiológico de las enzimas aquí descritas es desconocido, las diferencias observadas en sus preferencias de sustrato sugieren diversos roles funcionales. Es interesante señalar que la proteína *AnOTasa*, que proviene de una especie fúngica con cepas productoras de OTA, es la que presenta un espectro de actividad más reducido, siendo mayoritariamente específica hacia sustratos con residuos de fenilalanina, este hecho podría indicar una posible especialización de la proteína para la hidrólisis de OTA en esta especie fúngica. No obstante, de forma general, las peptidasas están distribuidas por todos los reinos de la vida, actuando sobre enlaces peptídicos de proteínas y/o péptidos, catalizando diversos procesos proteicos, como la digestión o degradación de las proteínas ingeridas y el desarrollo, mantenimiento y remodelación de los tejidos (Cerdà-Costa & Gomis-Rüth, 2014). En el caso de las bacterias, este tipo de proteínas resultan de utilidad para la adaptación a diferentes hábitats naturales donde la disponibilidad exógena de aminoácidos es baja. De este modo, la capacidad para reciclar aminoácidos es esencial para el mantenimiento de las funciones celulares.

3.2.5 Estudio *in silico* de alergenicidad

De forma similar al estudio realizado previamente con las proteínas de la familia M20 (M20D) de peptidasas, *AfOTasa* y *CnOTasa*, se evaluó la posible alergenicidad de las proteínas de la familia M38 mediante las herramientas bioinformáticas *AllerTOP v.2* y *AlgPred 2.0*. Los resultados obtenidos con

AllerTOP v.2 predicen que se trata de proteínas probablemente no alergénicas. En el caso de *AlgPred 2.0*, realizando el BLAST no encuentra identidad de secuencia con ninguna de las proteínas identificadas como alérgenos en la base de datos. En el caso de *BLOTasa*, *SnOTasa* y *SdOTasa* encuentra *hits* con proteínas identificadas como no alergénicas. El programa encuentra epítomos de IgE en *LcOTasa* y *SnOTasa*. Sin embargo, al igual que en el caso de *CnOTasa*, los epítomos que encuentra en estas proteínas están formados por tres aminoácidos, número que los autores consideran insuficiente para que la proteína sea considerada como alérgena (Sharma et al., 2021). Al realizar el *MOTIF scanning*, el programa predice como alérgenos todas las proteínas evaluadas, si bien, este método es considerado por los autores como el menos discriminatorio (Sharma et al., 2021). Finalmente, la puntuación híbrida obtenida para todas ellas indica que no se trataría de proteínas alérgenas (Tabla 17).

Tabla 17. Test de alergenicidad de las enzimas pertenecientes a la familia M38 de peptidasas.

Proteína	<i>AllerTOP v.2</i>	<i>AlgPred 2.0</i>				
		BLAST	IgE	MOTIF scanning	Puntuación híbrida	
					A	B
<i>AnOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	-	Alérgeno	0,11	No alérgeno
<i>BLOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	-	Alérgeno	0,12	No alérgeno
<i>SnOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	1 epítomo (IAT)	Alérgeno	0,65	No alérgeno
<i>LcOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	1 epítomo (IAT)	Alérgeno	0,65	No alérgeno
<i>RwOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	-	Alérgeno	0,13	No alérgeno
<i>SdOTasa</i>	Probable no alérgeno	No alérgeno	-	Alérgeno	0,09	No alérgeno

En su conjunto, los resultados obtenidos por estas dos herramientas indican, a falta de confirmación con estudios *in vivo*, que tanto *AnOTasa* como las proteínas bacterianas pertenecientes a la familia M38 de peptidasas identificadas en este estudio probablemente no son proteínas alergénicas.

3.3 Salicilato 1,2 dioxigenasa de *Pseudaminobacter salicylatoxidans*

La enzima salicilato 1,2 dioxigenasa de *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986^T (*PsSDO* de *P. salicylatoxidans* salicilato dioxigenasa), tal y como se ha comentado previamente (Apartado 1 de Resultados y discusión), se identificó como una proteína con potencial actividad transformadora de OTA en un estudio *in silico* de *target fishing* realizado por Dellafiora y colaboradores (2020). Con objeto de comprobar la validez de este método de búsqueda de nuevas enzimas, así como de evaluar la posible actividad transformadora de OTA de una enzima no anotada como hidrolasa, se decidió estudiar la actividad de *PsSDO* sobre la micotoxina.

Las dioxigenasas son una familia de enzimas capaces de romper enlaces carbono-carbono (C-C) de dioles vecinales. Esta actividad enzimática es importante en las rutas de degradación de compuestos aromáticos, ya que éstas normalmente transcurren a través de intermedios dihidroxilados como catecol, hidroquinona o gentisato (Matera et al., 2008). Las dioxigenasas se clasifican en tres clases dependiendo del enlace C-C sobre el que son capaces de actuar. La Clase I la forman aquellas dioxigenasas que catalizan la ruptura del enlace C-C entre los dos grupos hidroxilos (intradiol u *ortho-cleaving* dioxigenasas). La Clase II incluye aquellas que catalizan la ruptura del enlace C-C adyacente a los grupos hidroxilo (extradiol o *meta-cleaving* dioxigenasas) (Que & Ho, 1996). Por último, la Clase III está compuesta por dioxigenasas que actúan sobre compuestos aromáticos con dos hidroxilos en orientación *para* (como el gentisato o la hidroquinona) o con un grupo hidroxilo adyacente al carboxilato (como el salicilato) (Qu & Spain, 2011; Hintner et al., 2004; Adachi et al., 1999). Desde una perspectiva estructural, está última clase de dioxigenasas pertenece a la superfamilia *cupin* (Fetzner, 2012), ya que presentan dos dominios *cupin*, cada uno caracterizado por un barril β distorsionado compuesto de 8 láminas β antiparalelas (Ferraroni et al., 2013; Matera et al., 2008).

Dentro de las gentisato dioxigenasas, se ha descrito que la enzima *PsSDO* presenta unas características atípicas, ya que es capaz de oxidar el gentisato y también una gran variedad de derivados del salicilato, los cuales presentan un solo grupo hidroxilo en el carbono-2 (Ferraroni et al., 2012, 2013; Matera et al., 2008). La estructura cristalizada de *PsSDO* se encuentra disponible (código PDB: 2PHD) y revela que la enzima forma un homotetrámero en el que la región N-terminal de cada subunidad se apoya sobre la entrada al sitio catalítico de la subunidad adyacente. El dominio *cupin* N-terminal de cada subunidad posee un ion Fe^{+2} coordinado por los residuos His-119, His-121 e His-160 (Ferraroni et al., 2012) (**Figura 28**).

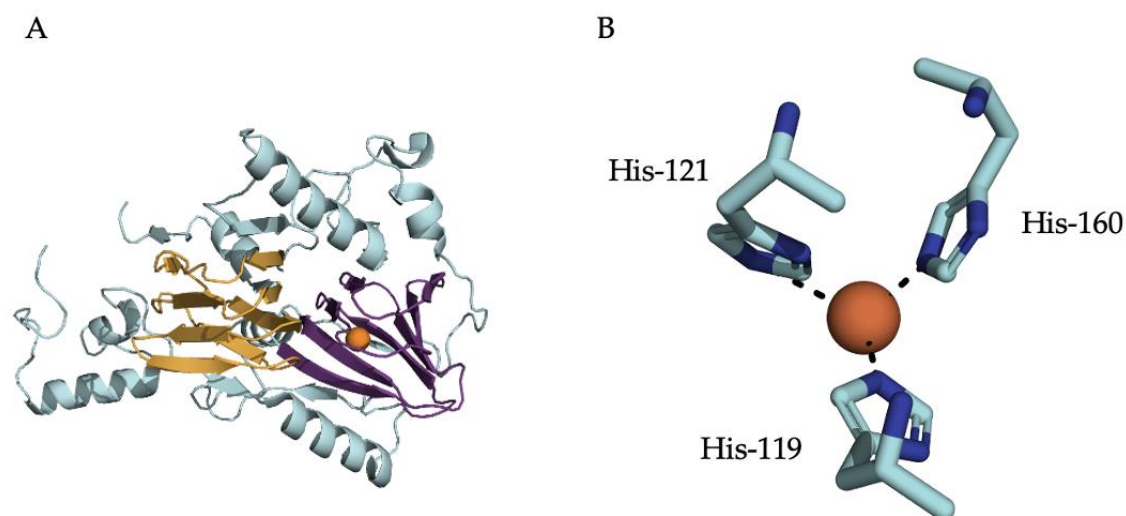


Figura 28. Estructura tridimensional (A) y representación esquemática del centro catalítico (B) de una subunidad de *PsSDO* (código PDB: 2PHD). Aparecen destacados los dos dominios *cupin*: el dominio N-terminal (morado) contiene un ión Fe^{2+} (esfera marrón), el C-terminal (naranja) no une metales. La esfera marrón representa el ión metálico del centro activo. Las figuras han sido obtenidas con el software *PyMOL* versión 2.5.0.

En primer lugar, se decidió verificar la actividad dioxigenasa de la enzima *PsSDO* producida heterológicamente en este trabajo sobre ácido gentísico y ácido salicílico. Para ello, la enzima se incubó durante 4 h en presencia de estos dos ácidos. Tras la incubación, los productos de reacción se analizaron mediante HPLC (Apartado 6.3.1 de Materiales y métodos). En la **Figura 29**, se puede observar que el gentisato se oxida completamente, mientras que parte del salicilato permanece sin degradar en la reacción. Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura, la actividad relativa de *PsSDO* frente a salicilato, 1-hidroxi-2-naftoato y gentisato es aproximadamente 1:40:120 (Hintner et al., 2004), lo que confirmaría que se trata de una enzima gentisato 1,2-dioxigenasa adaptada a la conversión de sustratos monohidroxilados como el salicilato (Matera et al., 2008).

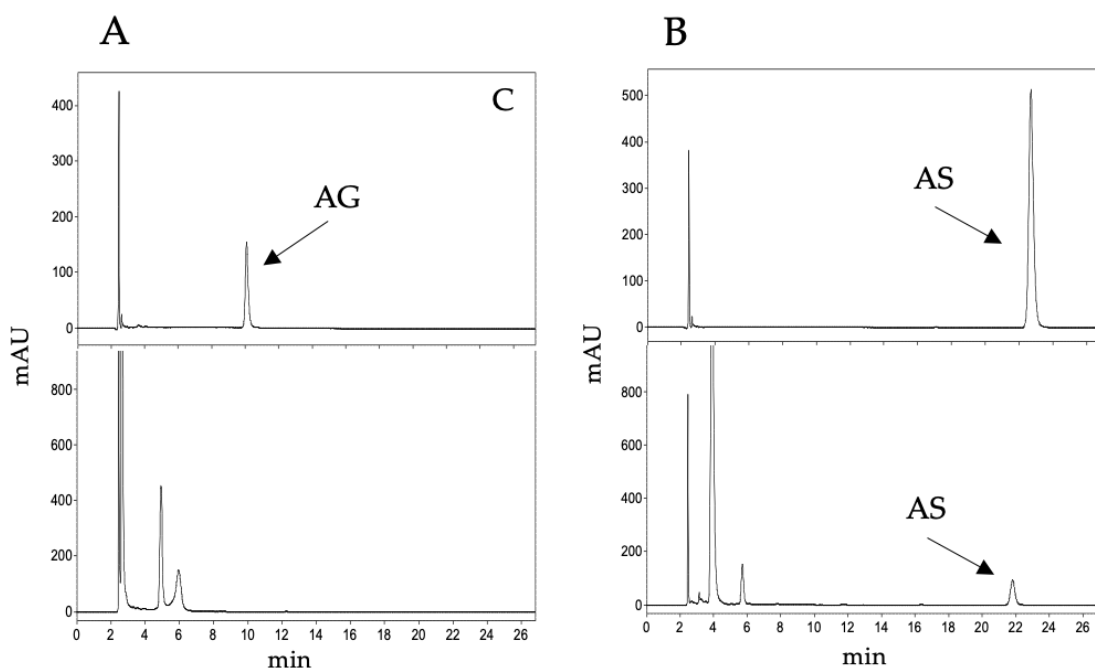


Figura 29. Degradación de ácido gentísico (AG) (A) y ácido salicílico (AS) (B) por *PsSDO*. *PsSDO* se incubó con dichos ácidos (1 mM) durante 4 h a 37 °C. Se indica el control (C), reacción sin enzima.

A continuación, la enzima se incubó en presencia de OTA durante 18 h para estudiar su posible capacidad de transformación de la micotoxina. En la **Figura 30A**, se observa que la incubación produce la desaparición total de OTA y la formación de OT α . Dellaflora y colaboradores (2020) identificaron *PsSDO* como una enzima potencial transformadora de OTA mediante un mecanismo distinto a la hidrólisis. Por ello, la identificación de OT α es un resultado inesperado, ya que implica la degradación de OTA mediante hidrólisis del enlace amida y no mediante otro mecanismo. Adicionalmente, la enzima se incubó con OTB confirmándose igualmente su actividad hidrolítica sobre este sustrato (**Figura 30B**).

Al poner a punto el ensayo con 4MF para la caracterización de la enzima, se observó que para este sustrato la actividad mostrada por *PsSDO* era muy inferior respecto al resto de enzimas estudiadas en esta tesis. *PsSDO* no es capaz de transformar 4MF en el tiempo de incubación establecido para las otras proteínas (15 min). Se probaron diferentes tiempos de incubación comprendidos entre 15 min y 4 h y, en ninguno de los casos, se detectó actividad suficiente para llevar a cabo los ensayos de caracterización. Al prolongar la incubación con 4MF durante 18 h, como en el caso del ensayo con OTA, sí que se observó la degradación total del compuesto. La necesidad de un tiempo prolongado de incubación con 4MF imposibilitaba el estudio previo de la temperatura y pH óptimos, termoestabilidad y el efecto de aditivos, por lo que la caracterización de esta

enzima se limitó a estudiar su actividad hidrolítica sobre la colección de sustratos utilizados en la caracterización de las otras enzimas incluidas en este estudio.

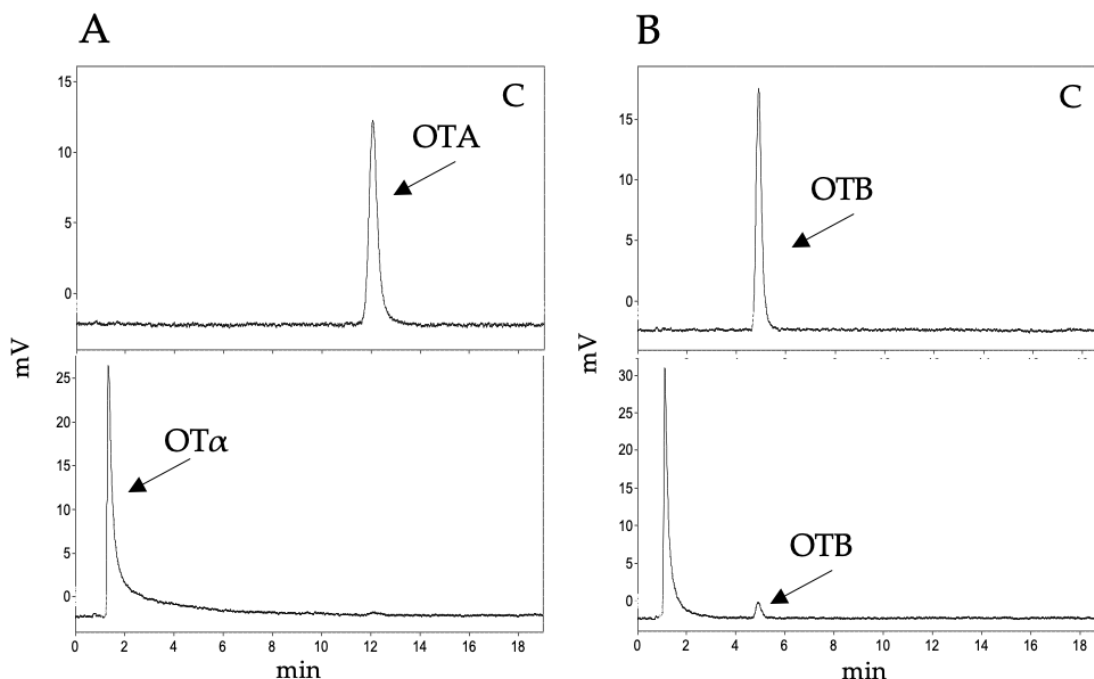


Figura 30. Degradación de OTA (A) y OTB (B) por *PsSDO*. *PsSDO* se incubó con las micotoxinas (2 µg/ml) durante 18 h a 37 °C. Se indica el control (C), reacción sin enzima.

Como en las proteínas anteriores, la evaluación de la actividad endopeptidasa de *PsSDO* sobre BSA demostró que esta enzima carece de este tipo de actividad, al menos sobre el sustrato ensayado, al no detectarse la presencia de productos de hidrólisis tras analizar la reacción en un gel SDS-PAGE (**Anexo II**).

La **Figura 31** muestra la actividad de la enzima sobre la colección de sustratos sintéticos tras 18 h de incubación. Respecto a los sustratos característicos de aminoacilasas, *PsSDO* muestra la actividad más alta frente a AF, seguida por AY. Además, es capaz de degradar parcialmente todos los derivados N-acetil ensayados excepto AN y AP. Los resultados sugieren que la enzima muestra principalmente preferencia por aminoácidos no cargados y de gran tamaño, como es el caso de tirosina y fenilalanina. En el caso de los derivados N-benciloxycarbonil, *PsSDO* presenta preferencia por ZF, siendo también capaz de hidrolizar, aunque en menor proporción (inferior al 30% de actividad frente a ZF), ZE, ZA, ZK, ZY, ZQ y ZI. Respecto a los otros tipos de compuestos, *PsSDO* muestra preferencia por HF y GF respecto al otro derivado ensayado de cada grupo (HR y GA).

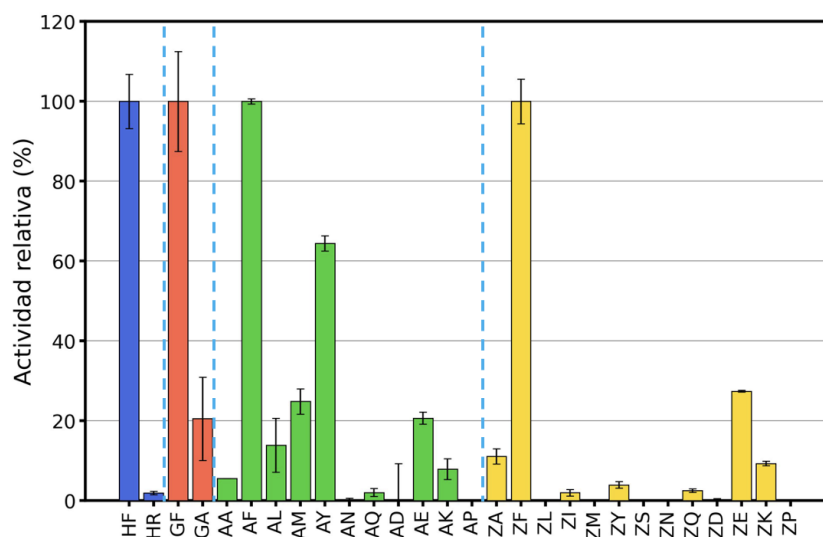


Figura 31. Especificidad de sustrato de *PsSDO*. Los ensayos se realizaron por triplicado, se representa la media y la desviación estándar. Para cada sustrato se realizó un control sin añadir enzima. Se tomó como 100% la reacción con el sustrato para el que la enzima presentó mayor actividad de cada uno de los grupos. Se representan los sustratos derivados de hipuril (azul), glicil (rojo), N-acetil (verde) y N-carbobenciloxi (amarillo).

Los ensayos realizados confirman la actividad amidasa de *PsSDO* debido a su capacidad de hidrólisis de las micotoxinas OTA y OTB y de varios sustratos sintéticos de peptidasas. Sin embargo, su actividad es muy inferior a la observada en el resto de las enzimas de este estudio (excepto en el caso de *SnAH* (**Figura 11**)), como demuestra la necesidad de una incubación prolongada para detectar los productos de hidrólisis.

La presencia de dos actividades enzimáticas diferentes en una misma enzima es un hecho más frecuente de lo que a menudo se reconoce, ya que se han identificado muchas enzimas que catalizan más de una transformación química. Esta característica se denomina “promiscuidad catalítica” y se refiere a la capacidad del sitio activo de una enzima para catalizar más de una transformación química diferente (Kourist et al., 2008; Hult & Berglund, 2007). Frecuentemente, las actividades secundarias de una enzima promiscua son órdenes de magnitud más bajos que la actividad nativa de la enzima (Aharoni et al., 2005). De acuerdo con los resultados descritos en este trabajo, la actividad hidrolasa mostrada por *PsSDO* parece ser una actividad secundaria de la enzima, siendo la principal su actividad dioxigenasa.

Debido a los resultados observados y para ampliar el conocimiento sobre esta actividad secundaria, se realizaron simulaciones de *docking* molecular en colaboración con el Dr. José Miguel Mancheño del Instituto de Química Física Blas Cabrera (CSIC). Estas simulaciones *in silico* demostraron que OTA es un sustrato posible para la interacción con *PsSDO*, ya que encaja en el bolsillo

catalítico en una posición adecuada para que pueda ocurrir la reacción (Sánchez-Arroyo et al., 2023). Además, puesto que la actividad de *PsSDO* como amidohidrolasa se asemeja a la actividad de las carboxipeptidasas, se puede proponer un posible mecanismo catalítico para la hidrólisis de OTA (**Figura 32**). El mecanismo de acción sería similar al de las metalocarboxipeptidasas, el cual consiste en una reacción de hidrólisis siguiendo un mecanismo general de base/ácido, en el que una molécula de agua inicialmente coordinada al metal realiza un ataque nucleófilo sobre el grupo carbonilo del enlace amida del sustrato. En este proceso, el carboxilato del residuo Glu-82 actuaría como base contribuyendo a aumentar la nucleofilia de la molécula de agua, mientras que el grupo carbonilo que constituye el enlace amida de OTA, se encuentra activado por el efecto de atracción del metal. De este modo, se produciría el ataque nucleófilo del oxígeno del agua al átomo de carbono del grupo C=O, dando lugar a un intermedio tetraédrico. Tras este paso, Glu-82, ahora protonado, actuaría esta vez como ácido cediendo su protón al átomo de nitrógeno de la amida. Finalmente, y tras una serie de intercambio de protones entre los distintos participantes, el intermedio tetraédrico evolucionaría dando lugar a la rotura del enlace amida, formándose así los dos productos de reacción, OT α y L- β -fenilalanina (**Figura 32**).

La demostración de la capacidad degradadora de OTA de la enzima *PsSDO*, por un lado, confirma la adecuación de las aproximaciones experimentales basadas en la similitud de ligando, puesto que permite identificar proteínas activas frente a este sustrato. Por otro lado, la actividad de *PsSDO* corrobora la existencia de proteínas que presentan baja actividad sobre OTA, pero que durante incubaciones prolongadas pueden hidrolizar la micotoxina, como se ha demostrado anteriormente en la literatura en diferentes enzimas con actividad hidrolasa (Chen et al., 2022) y carboxipeptidasa (Wei et al., 2020; Hu et al., 2018; Liuzzi et al., 2017; Abrunhosa et al., 2006, 2010), o en esta tesis con la peptidasa M20D *SnAH*.

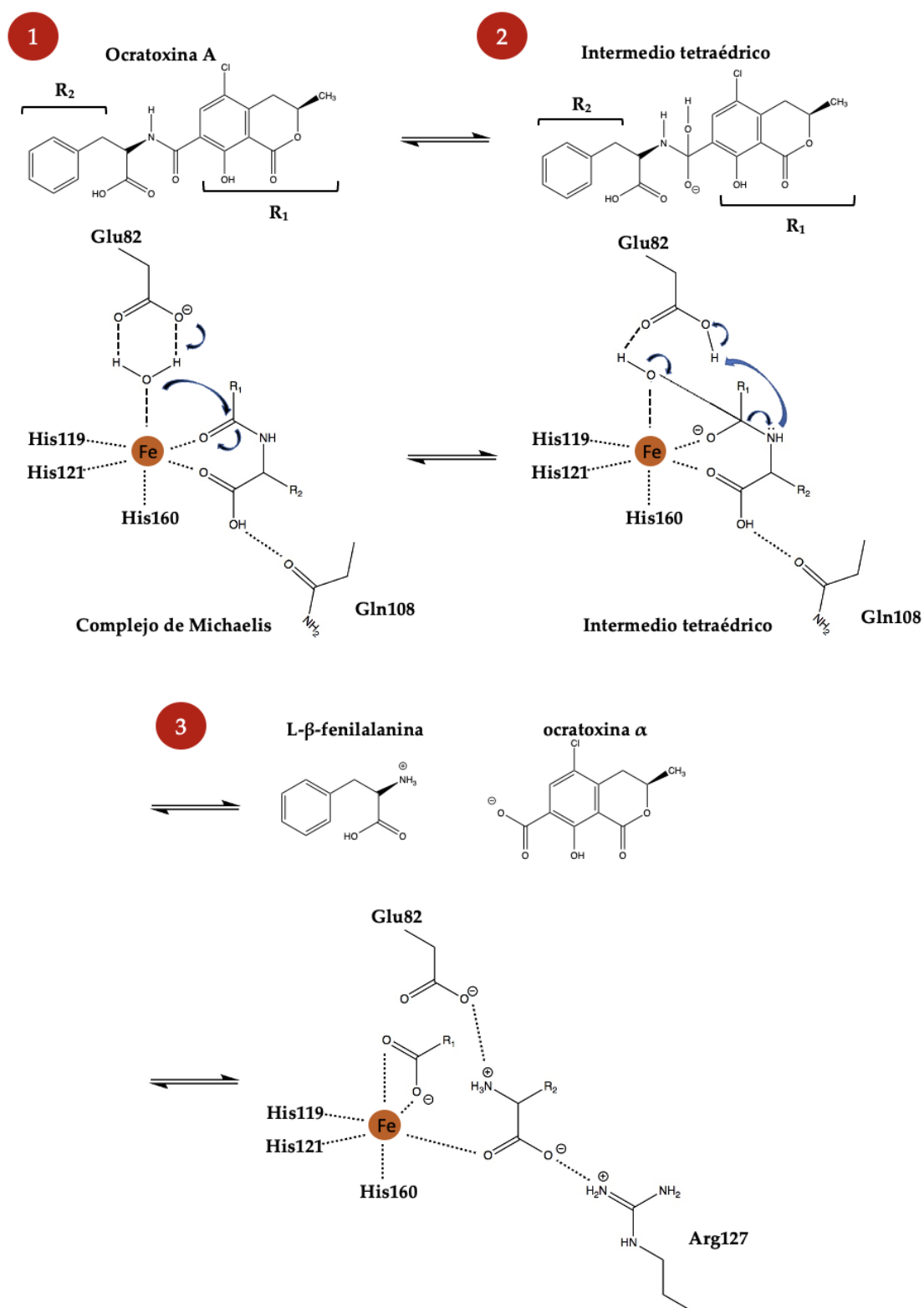


Figura 32. Representación esquemática del posible mecanismo catalítico de hidrólisis de OTA por *PsSDO*. Este mecanismo propone una reacción activada por agua que sigue un mecanismo general base/ácido. Se muestran: el complejo enzima-sustrato (1), el intermedio tetraédrico (2) y la subsiguiente formación de los productos (3). Se muestran las estructuras 2D de los sustratos, intermedios y productos para cada paso del ciclo catalítico (Adaptado de Sánchez-Arroyo et al., 2023).

Además de haber identificado *PsSDO* como una oxigenasa que presenta actividad hidrolasa como actividad secundaria y haber demostrado que posee capacidad de hidrolizar OTA, en este estudio se ha descrito la existencia de numerosas proteínas bacterianas con una actividad hidrolítica sobre OTA adecuada. Las enzimas identificadas pertenecientes a la familia M20 (M20D) y M38 de peptidasas presentan características heterogéneas en lo que respecta a su comportamiento frente a variaciones de pH, temperatura y su termoestabilidad, así como respecto a la colección de sustratos sobre los que actúan. De esta manera, se ha ampliado el catálogo de proteínas potencialmente utilizables para reducir el contenido de OTA en diferentes sustratos y en diferentes contextos tecnológicos. En el **Anexo III** se recoge una tabla resumen con las características de las enzimas producidas en este trabajo.

4 Identificación de bacterias destoxificadoras de ocratoxina A

En este trabajo se ha demostrado la capacidad de determinadas cepas bacterianas para degradar OTA y, en estas cepas, se han identificado proteínas que también poseen dicha actividad. Resulta de interés conocer si la capacidad de transformar esta micotoxina mostrada por estas cepas es un fenotipo característico de esa especie o si, por el contrario, se extiende al resto de las especies del género. También es relevante estudiar si esa capacidad está determinada por la presencia de una única enzima o si son varias las enzimas responsables de dicho fenotipo.

Con el objetivo de elucidar estas cuestiones, se adquirieron cepas tipo de distintas especies pertenecientes a los géneros en los que se habían identificado cepas capaces de transformar OTA y en ellas se evaluó su capacidad para transformar la micotoxina. De manera que se analizaron cepas tipo de especies del género *Alcaligenes* (4 especies/subespecies), *Brevibacterium* (9 especies), *Cupriavidus* (7 especies), *Lysobacter* (8 especies), *Sphingomonas* (5 especies), *Rhizorhizobium* (3 especies) y *Stenotrophomonas* (7 especies). La **Tabla 18** muestra la clasificación taxonómica de las especies incluidas en este estudio. En ella, se observa que la capacidad de degradar OTA es un fenotipo extendido entre distintos grupos taxonómicos, ya que encontramos bacterias con esta capacidad pertenecientes a distintas familias, órdenes, clases y filos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, puesto que las enzimas descritas con esta capacidad son peptidasas, un tipo de enzimas muy frecuente. Las peptidasas identificadas son generalmente inespecíficas y activas sobre enlaces peptídicos que poseen en su extremo C-terminal residuos hidrofóbicos no polares, para las que se desconoce su sustrato natural.

Tabla 18. Clasificación taxonómica de los géneros que poseen cepas con capacidad degradadora de OTA y las cepas analizadas en este estudio.

	Familia	Género	Especie	Cepa
Filo: Proteobacteria				
Clase: α-proteobacteria				
Orden: Sphingomonadales	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Rhizorhabdus</i>	<i>R. argentea</i>	DSM 100912 ^T
			<i>R. dicambivorans</i>	DSM 107650 ^T
			<i>R. wittichii</i>	DSM 6014 ^T
		<i>Sphingomonas</i>	<i>S. adhaesiva</i>	DSM 7418 ^T
			<i>S. canadensis</i>	DSM 29393 ^T
			<i>S. dokdonensis</i>	DSM 21029 ^T
			<i>S. endophytica</i>	DSM 101535 ^T
			<i>S. jeddahensis</i>	DSM 103790 ^T
Clase: β-proteobacteria				
Orden: Burkholderiales	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>A. endophyticus</i>	DSM 100498 ^T
			<i>A. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	DSM 30030 ^T
			<i>A. faecalis</i> subsp. <i>parafaecalis</i>	DSM 13975 ^T
			<i>A. faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i>	DSM 16503 ^T
	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>C. basilensis</i>	DSM 106286 ^T
			<i>C. campinensis</i>	DSM 17293 ^T
			<i>C. malaysiensis</i>	DSM 19416 ^T
			<i>C. necator</i>	DSM 13513 ^T
			<i>C. numazuensis</i>	DSM 15562 ^T
			<i>C. oxalaticus</i>	DSM 1105 ^T
			<i>C. taiwanensis</i>	DSM 17343 ^T
Clase: γ-proteobacteria				
Orden: Xanthomonadales	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>L. capsici</i>	DSM 19286 ^T
			<i>L. concretionis</i>	DSM 16239 ^T
			<i>L. daejeonensis</i>	DSM 17634 ^T
			<i>L. enzymogenes</i>	DSM 2043 ^T
			<i>L. niastensis</i>	DSM 18481 ^T
			<i>L. silvestris</i>	DSM 104734 ^T
			<i>L. soli</i>	DSM 24712 ^T
			<i>L. spongicola</i>	DSM 21749 ^T
		<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. acidaminiphila</i>	DSM 13117 ^T
			<i>S. bentonitica</i>	DSM 103927 ^T
			<i>S. chelatiphaga</i>	DSM 21508 ^T
			<i>S. indicatrix</i>	DSM 28278 ^T
			<i>S. nitritireducens</i>	DSM 12575 ^T
			<i>S. pictorum</i>	DSM 19282 ^T
			<i>S. terrae</i>	DSM 18941 ^T
Filo: Actinobacteria				
Clase: Actinomycetia				
Orden: Micrococcales	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>B. antiquum</i>	DSM 21545 ^T
			<i>B. aurantiacum</i>	DSM 20426 ^T
			<i>B. casei</i>	DSM 20658
			<i>B. casei</i>	DSM 9657
			<i>B. epidermidis</i>	DSM 20660 ^T
			<i>B. jeotgali</i>	DSM 29217 ^T
			<i>B. linens</i>	DSM 20425 ^T
			<i>B. permense</i>	DSM 21546 ^T
			<i>B. sediminis</i>	DSM 102229 ^T
			<i>B. senegalense</i>	DSM 25783 ^T

A continuación, se detallan los resultados obtenidos con cada uno de los géneros bacterianos estudiados.

4.1 Género *Alcaligenes*

Los microorganismos pertenecientes al género *Alcaligenes* se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos y en el suelo, donde están involucrados en procesos de descomposición y mineralización. Además, también aparecen en otros nichos como el tracto intestinal de vertebrados y en algunos alimentos (Batt, 2014). Este género incluye microorganismos Gram-negativos, filogenéticamente situados dentro de la clase de las β -proteobacterias y contiene especies metabólicamente diversas, capaces de utilizar gran variedad de compuestos aromáticos como fuentes de carbono y energía (Batt, 2014). Muchos de estos compuestos son xenobióticos y representan riesgos para el medioambiente, como fenoles, fenantreno, hidrocarburos poliaromáticos y pesticidas (Kong et al., 2013; Bharali et al., 2011; Rehfuss & Urban, 2005; Kiyohara et al., 1990). Por este motivo, las especies del género *Alcaligenes* poseen interés biotecnológico, principalmente en el campo de la biorremediación.

En la literatura existen ejemplos de cepas pertenecientes al género *Alcaligenes* descritas como capaces de degradar OTA. Tal es el caso de la cepa *A. faecalis* ASAGF 0D-1 aislada de suelo (Zhang et al., 2017) y *A. faecalis* ANSA176 aislada de quimo intestinal de burro (Zheng et al., 2022). En esta tesis también se ha demostrado la capacidad para degradar OTA de *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T y se ha caracterizado la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa perteneciente a esta cepa descrita por Zhang y colaboradores (2019), la cual se ha utilizado como control. Como se ha confirmado en esta tesis, esta enzima transforma OTA en metabolitos considerados no tóxicos. Con objeto de conocer la capacidad para degradar OTA entre especies del género *Alcaligenes*, se analizaron cepas tipo pertenecientes a diferentes especies/subespecies de este género. Desde su descubrimiento, el género *Alcaligenes* ha estado sujeto a numerosos cambios en su taxonomía. En la actualidad, este género contiene cinco especies según la Lista de nombres procarióticos con posición en la nomenclatura (LPSN) (www.bacterio.net): *A. faecalis*, *A. aquatilis*, *A. pakistanensis*, *A. endophyticus* y *A. nematophilus*. Además, *A. faecalis* está dividido en tres subespecies: *A. faecalis* subsp. *faecalis*, *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* (Lu et al., 2017). Aunque se han publicado nombres taxonómicos de otras especies, esta descripción no se ha realizado de una forma válida según las normas del Código Bacteriológico, como es el caso de *A. ammonioxydans* (Wu et al., 2021).

Para este trabajo, se adquirieron las cepas tipo de especies pertenecientes a este género y disponibles en la DSMZ: *A. endophyticus* DSM 100498^T y las tres subespecies de *A. faecalis* (*A. faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030^T, *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* DSM 13975^T y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T) (**Tabla 18**). Estas cepas se cultivaron en medio conteniendo OTA y, tras siete días de incubación, se observa la desaparición de la micotoxina en el sobrenadante de los cultivos en todas las subespecies de *A. faecalis*, mientras que en el sobrenadante del cultivo de *A. endophyticus* DSM 100498^T no se observó dicha desaparición (**Figura 33A**). Este resultado reveló que no todas las especies del género *Alcaligenes* presentan capacidad de transformar OTA. Además, no se encontró OTA en el análisis realizado tras el lavado de las células con metanol, confirmando que en ninguno de los casos la reducción de la toxina se debe a un mecanismo de adsorción a las paredes celulares.

Al analizar la presencia de OT α en los sobrenadantes de los medios de cultivo, se observó un comportamiento diferente entre las cepas que transforman la micotoxina. Se ha descrito que tanto *A. faecalis* ASAGF 0D-1 (Zhang et al., 2017) como *A. faecalis* ANSA 176 (Zheng et al., 2022) transforman OTA dando lugar a la acumulación de OT α . En este estudio, se observó la acumulación de OT α en el sobrenadante de los cultivos de *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* DSM 13975^T y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T. Sin embargo, en el sobrenadante del cultivo de la cepa de *A. faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030^T no se observó OT α . Este resultado puede indicar que la cepa DSM 30030^T es capaz de continuar con la transformación bioquímica de OTA. Para confirmar este hallazgo, todas las cepas de *Alcaligenes* estudiadas se cultivaron en presencia de OT α (2 μ g/ml) durante siete días. Tras la incubación, se analizó la presencia de OT α en los sobrenadantes (**Figura 33B**). *A. faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030^T fue la única cepa capaz de transformar la OT α presente en el medio (**Figura 33B**), lo que la convierte en la primera bacteria descrita capaz de transformar dicho metabolito. En este sentido, sería interesante conocer la enzima o ruta metabólica causante de este fenotipo. A pesar de que se han descrito las características fenotípicas que diferencian a las tres subespecies de *A. faecalis* (Reh fuss & Urban, 2005), debido a la amplia variedad de fuentes de carbono utilizables por las cepas de *Alcaligenes* para su crecimiento, no es posible *a priori* asociar una diferencia fenotípica característica que diferencie a estas subespecies (como la asimilación de L-ornitina o la hidrólisis de gelatina) con la capacidad para transformar OT α .

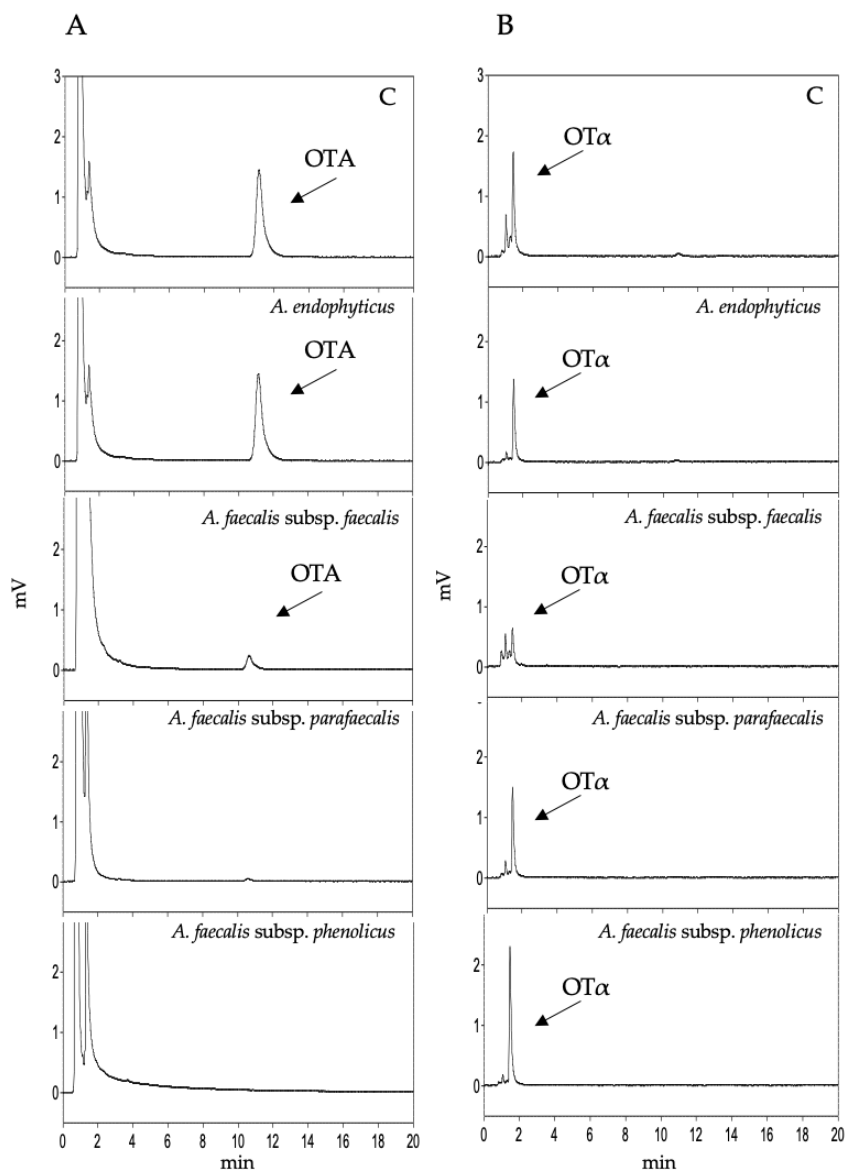


Figura 33. Degradación de OTA (A) y OTα (B) por cultivos de cepas del género *Alcaligenes*. Las cepas analizadas fueron *A. endophyticus* DSM 100498^T, *A. faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030^T, *A. faecalis* subsp. *parafaecalis* DSM 13975^T y *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T. (A) Las cepas se cultivaron en medio de cultivo durante siete días en presencia de OTA (2 µg/ml), y el sobrenadante se analizó por HPLC. (B) Las cepas se cultivaron en presencia de OTα (2 µg/ml) durante siete días, tras ello, el sobrenadante se pasó a través de una columna de inmunoafinidad *OchraTest WB*TM y se analizó por HPLC. Se indican los controles (medio de cultivo con OTA/OTα no inoculado) (C).

Tras analizar la capacidad de las diferentes cepas de *Alcaligenes* ensayadas para transformar OTA, con el objetivo de conocer si la presencia de la proteína AfOTasa identificada se puede asociar con la capacidad de la cepa para degradar la micotoxina, se analizó la presencia del gen que codifica esta proteína en las cepas de *Alcaligenes* estudiadas. En primer lugar, se realizó una búsqueda y posterior alineamiento de secuencia de las proteínas con alto grado de identidad con AfOTasa presentes en cepas de *Alcaligenes* cuyo genoma se encuentra

secuenciado (**Anexo V**). A partir de este alineamiento, se escogieron dos motivos de aminoácidos conservados para diseñar oligonucleótidos degenerados, con el fin de detectar la presencia del gen *afotasa* en las especies del género *Alcaligenes* ensayadas. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos 2049 y 2050 que codifican los motivos conservados DALPVQER y PEFMIDE, respectivamente, que amplifican un fragmento interno de 923 pb del gen que codifica *AfOTasa* (**Tabla 8**). A continuación, se realizó una PCR con dichos oligonucleótidos, utilizando como molde el ADN cromosómico de las cepas de *Alcaligenes* empleadas en este estudio. Como se muestra en la **Figura 34**, todas las subespecies de *A. faecalis* poseen el gen que codifica la proteína *AfOTasa*, sin embargo, *A. endophyticus* DSM 100498^T no muestra banda de amplificación. Estos resultados coinciden con la información obtenida del análisis de la presencia de OTA en los sobrenadantes de los cultivos, lo que indica que, al menos en las cepas analizadas, el fenotipo de hidrólisis de OTA parece estar asociado con la presencia del gen que codifica la proteína *AfOTasa*.

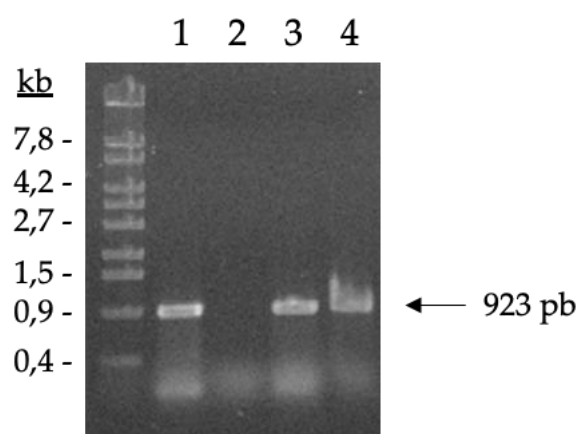


Figura 34. Detección del gen que codifica *AfOTasa* en cepas del género *Alcaligenes*. Las cepas analizadas fueron *A. faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503^T (carril 1), *A. endophyticus* DSM 100498^T (carril 2), *A. faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030^T (carril 3) y *A. faecalis* subsp. *parafoecalis* DSM 13975^T (carril 4). Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos 2049 y 2050 se sometieron a electroforesis en gel. El marcador de tamaño molecular *EcoT14I* (Takara, Japón) aparece en el carril izquierdo. Los números indican algunos de los tamaños moleculares.

Las cepas tipo de las especies *A. aquatilis*, *A. pakistanensis* y *A. nematophilus* no se encuentran disponibles en la colección de la DSMZ, por lo que se realizaron búsquedas en bases de datos genómicas para conocer si también poseen el gen que codifica *AfOTasa*. Como se muestra en la **Figura 35**, los genomas de *A. pakistanensis*, *A. aquatilis* y *A. nematophilus* contienen una proteína similar a *AfOTasa* anotada como “amidohidrolasa” (**Tabla 19**), lo que sugiere que estas cepas también pueden ser capaces de hidrolizar OTA. Además, estos genomas comparten una organización genética similar alrededor del gen que codifica

AfOTasa, lo que apoya que se trate de una proteína equivalente en todas las especies (**Figura 35**).

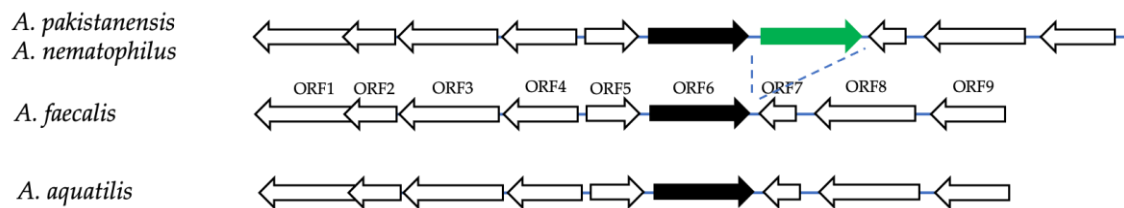


Figura 35. Organización genética de la región cromosómica contigua al gen que codifica *AfOTasa* en especies del género *Alcaligenes*. Se incluyen *A. pakistanensis* (GCF_014652815), *A. nematophilus* (NZ_JAPKMZ010000001.1), *A. faecalis* (NZ_CP013119) y *A. aquatilis* (NZ_CP0022390). Las flechas indican genes. Los genes que codifican proteínas similares a *AfOTasa* están representados por flechas negras. Los genes presentes en todas las cepas analizadas están representados por flechas blancas. Los genes que no están presentes en todas las cepas se indican con diferente color.

Tabla 19. Proteínas similares a *AfOTasa* en el género *Alcaligenes*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	WP_026482608.1	100 / 100
<i>Alcaligenes aquatilis</i>	WP_108727473.1	97,71 / 90,94
<i>Alcaligenes pakistanensis</i>	WP_189390509.1	96,12 / 83,60
<i>Alcaligenes nematophilus</i>	WP_266107694.1	86,99 / 76,69

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Asimismo, se investigó la presencia de la amidohidrolasa equivalente en el genoma de *A. endophyticus*. El BLAST realizado contra el genoma de esta especie no encontró proteínas con alta identidad de secuencia, lo que indicaría que no está presente, resultado que coincide con la ausencia de amplificación del gen mediante PCR. Además, se realizó la búsqueda de los genes que aparecen situados contiguos al gen *afotasa*, según la región cromosómica observada en las otras especies del género *Alcaligenes* analizadas. Como resultado, no se encontró ninguno de dichos genes, aunque sí se observó conservación de los genes que se sitúan 7 kbs *upstream* de la amidohidrolasa y 10 kbs *downstream*, lo que parece indicar la delección de una región de 17 kbs que incluye el gen *afotasa*, así como de sus genes contiguos. Este resultado explicaría la incapacidad de degradar OTA y la no detección del gen mediante PCR en *A. endophyticus*. La **Tabla 20** muestra la organización genética alrededor del gen que codifica *AfOTasa* en *A. faecalis*.

Tabla 20. Organización genética de la región cromosómica contigua a *AfOTasa* en *A. faecalis* (NZ_CP013119.1).

ORF	Locus/gen	Cadena	aa	Anotación	Número de acceso
ORF1	UZ73_RS18535	-	330	Proteína familia VOC	WP_045931364.1
ORF2	UZ73_RS18530	-	287	Alfa/beta hidrolasa	WP_045931365.1
ORF3	UZ73_RS18525	-	412	Transportador MFS	WP_052695821.1
ORF4	UZ73_RS18520	-	374	Transportador MFS	WP_045931366.1
ORF5	UZ73_RS18515	+	257	Regulador transcripcional hélice-giro-hélice	WP_045931367.1
ORF6	UZ73_RS18510	+	438	Amidohidrolasa	WP_026482608.1
ORF7	UZ73_RS18505	-	149	Proteína familia Hsp20/Alfa cristalina	WP_045931368.1
ORF8	UZ73_RS18500	-	510	Purina permeasa	WP_045931369.1
ORF9	UZ73_RS18495	-	458	8-oxoguanina deaminasa	WP_045931370.1

De las cinco especies reconocidas dentro del género *Alcaligenes* por la LPSN, en este trabajo se han analizado las cepas tipo de dos especies pertenecientes a este género, *A. endophyticus* y las tres subespecies de *A. faecalis*, por ser las únicas comercialmente disponibles como cepas tipo en la DSMZ. Los cultivos en presencia de OTA de las cepas ensayadas revelaron la capacidad de degradar la micotoxina de las tres subespecies de *A. faecalis*, y la ausencia de esta misma capacidad en *A. endophyticus*. Como resultado inesperado de este estudio, se observó que la cepa tipo de la especie *A. faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030^T es capaz de metabolizar OT α mediante un mecanismo todavía desconocido. Adicionalmente, los resultados de un estudio *in silico* de los genomas de estas cepas y los resultados de reacciones de PCR realizadas con oligonucleótidos degenerados han identificado la presencia del gen que codifica *AfOTasa* en todas las cepas analizadas que muestran capacidad de degradar OTA. En resumen, estas evidencias sugieren que, al menos en las cepas estudiadas, la capacidad de transformar OTA parece estar asociada con la presencia del gen que codifica la enzima *AfOTasa* en el género *Alcaligenes*.

4.2 Género *Brevibacterium*

El género *Brevibacterium* pertenece a la clase de las actinobacterias y comprende microorganismos Gram-positivos y aerobios, aislados de hábitats tan diferentes como arroz (Komagata & Iizuka, 1964), piel humana (Roux & Raoult, 2009), aves (Pascual & Collins, 1999) y quesos, entre otros. En el caso de los quesos, se estima que *B. linens*, representa entre el 1 y el 30% de las bacterias presentes en la superficie de algunos de ellos (McSweeney, 2007). Las cepas del género *Brevibacterium* son de interés industrial como fuente de varios productos, entre los que se incluyen aminoácidos (especialmente ácido glutámico y lisina), enzimas para la industria alimentaria y compuestos antimicrobianos. Asimismo,

se ha descrito el uso de *B. linens* en el tratamiento de aguas residuales, en la producción de vitaminas y en procesos farmacéuticos (Rattray & Fox, 1999). A pesar de ello, *B. linens* no está recogido en la lista de microorganismos QPS (*Qualified Presumption of Safety*) de la EFSA. Este hecho se debe probablemente a que el listado QPS no es un registro exhaustivo, ya que algunas aplicaciones microbiológicas en la cadena agroalimentaria no requieren de evaluación de seguridad por la EFSA; por ejemplo, este es el caso de cultivos iniciadores de productos fermentados (no novedosos) destinados al consumo humano (Koutsoumanis et al., 2022). En cambio, la Federación Internacional de Productos Lácteos (IDF) sí que recoge a *B. linens*, y a otras especies del género, como microorganismo de uso seguro (Bourdichon et al., 2018). La diversidad metabólica del género *Brevibacterium*, junto con su uso industrial (por ejemplo, *B. linens* está disponible comercialmente como cultivo iniciador para la maduración de quesos), hacen de las cepas de este género candidatos atractivos para su empleo en la destoxificación de OTA en matrices alimentarias.

En el año 2011, la capacidad de cepas del género *Brevibacterium* para transformar OTA en OT α se demostró por el grupo de investigación de Biotecnología Bacteriana del ICTAN (CSIC) (Rodríguez et al., 2011), en el cual se ha realizado esta tesis.

De forma similar al trabajo realizado con el género *Alcaligenes*, se adquirieron las cepas tipo de algunas especies del género *Brevibacterium* para estudiar su capacidad hidrolizadora de OTA. En la actualidad, el género *Brevibacterium* comprende 36 especies según la LPSN, de las cuales se adquirieron ocho cepas tipo disponibles en la DSMZ. Las cepas analizadas fueron: *B. linens* DSM 20425^T, *B. epidermidis* DSM 20660^T, *B. permense* DSM 21546^T, *B. sediminis* DSM 102229^T, *B. antiquum* DSM 21545^T, *B. aurantiacum* DSM 20426^T, *B. senegalense* DSM 25783^T y *B. jeotgali* DSM 29217^T. También se incluyeron las cepas *B. casei* DSM 9657 y DSM 20658, las cuales se encontraban disponibles en la colección de microorganismos del laboratorio (**Tabla 18**). La capacidad para hidrolizar OTA de las cepas se ensayó incubándolas en medio suplementado con la micotoxina. Tras siete días de incubación, se observó la desaparición de OTA del sobrenadante de los cultivos de las cepas ensayadas y la correspondiente acumulación de OT α , excepto en los cultivos de *B. senegalense* y *B. jeotgali* que no fueron capaces de eliminar la micotoxina del medio (**Figura 36**). El lavado con metanol de las células sedimentadas confirmó que en ninguno de los casos la reducción de OTA se debió a un mecanismo de adsorción de la micotoxina, como ya se había descrito previamente para cepas de este género (Rodríguez et al., 2011). Estos resultados revelan que la eliminación de OTA por estas especies se debe a un mecanismo de transformación y que la capacidad de degradar OTA no es una característica común a todas las especies del género *Brevibacterium*.

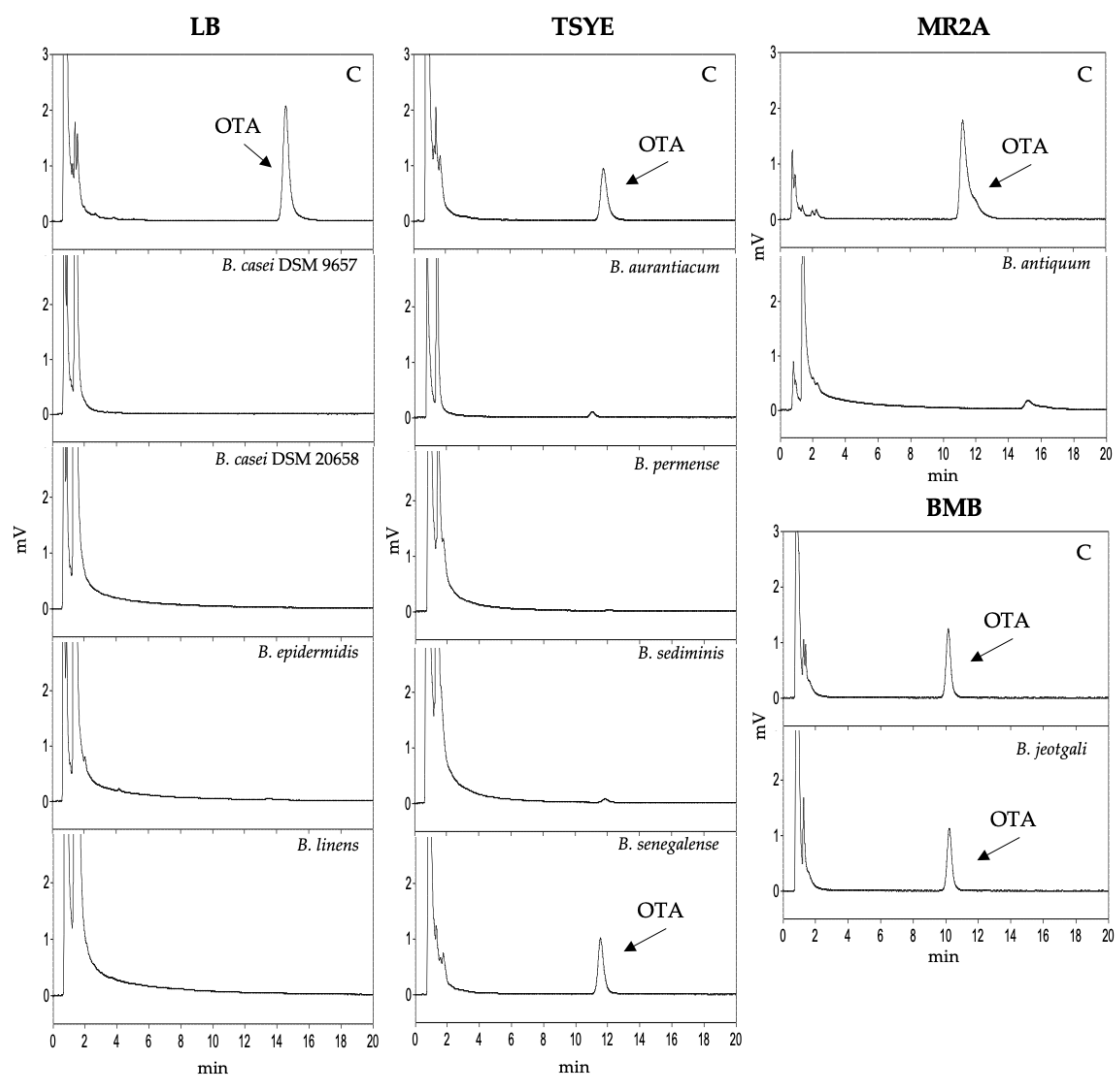


Figura 36. Degradación de OTA por cepas del género *Brevibacterium*. Las cepas analizadas fueron *B. antiquum* DSM 21545^T, *B. aurantiacum* DSM 20426^T, *B. casei* DSM 9657, *B. casei* DSM 20658, *B. epidermidis* DSM 20660^T, *B. jeotgali* DSM 29217^T, *B. linens* DSM 20425^T, *B. permense* DSM 21546^T, *B. sediminis* DSM 102229^T y *B. senegalense* DSM 25783^T. Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente (LB, TSYE, MR2A o BMB) durante siete días en presencia de OTA (2 µg/ml), y el sobrenadante se analizó por HPLC. Se indican los controles (medio de cultivo con OTA no inoculado) (C).

A pesar de que la capacidad para degradar OTA ya se había descrito en cepas del género *Brevibacterium* (Rodríguez et al., 2011), hasta la fecha no se había descrito ninguna enzima con capacidad degradadora de esta micotoxina en este género. Como se explica en el Apartado 1 de Resultados y discusión, en este trabajo se ha identificado una enzima anotada como amidohidrolasa en *B. linens* (*BlOTasa*) para la que se ha confirmado su capacidad hidrolizadora de OTA. Para comprobar la hipótesis de que dicha enzima es la responsable del fenotipo degradador de OTA de estas bacterias, se analizó la presencia del gen que la codifica en las cepas de *Brevibacterium* ensayadas. Para ello, se realizó un abordaje similar al llevado a cabo con las cepas del género *Alcaligenes*. En los genomas de estas especies de *Brevibacterium* se identificaron proteínas similares a *BlOTasa* (Tabla 21) y con ellas se realizó un alineamiento de secuencias en el que se

identificaron motivos conservados (**Anexo V**). Dos de estos motivos conservados se seleccionaron para diseñar oligonucleótidos degenerados. Así, se diseñaron los oligonucleótidos 2047 (motivo IPGVIDCH) y 2048 (motivo NLEEISL) que amplifican un fragmento interno de 844 pb del gen *blotasa* (**Tabla 8**). El ADN cromosómico de las cepas tipo incluidas en el estudio se empleó como molde para llevar a cabo una PCR con dichos oligonucleótidos. En la **Figura 37**, se observa que todas las cepas tipo de las especies ensayadas amplifican el gen que codifica *BlOTasa*, excepto las cepas *B. senegalense* DSM 25783^T y *B. jeotgali* DSM 29217^T, en las cuales no se obtuvo ningún producto de amplificación. Este resultado coincide con los resultados obtenidos al estudiar la capacidad de los cultivos de estas cepas para degradar OTA.

Tabla 21. Proteínas similares a *BlOTasa* en el género *Brevibacterium*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>B. linens</i>	WP_101553338.1	100 / 100
<i>B. permense</i>	WP_173153086.1	95,05 / 91,36
<i>B. epidermidis</i>	WP_062243139.1	93,81 / 91,03
<i>B. sediminis</i>	WP_181271732.1	96,53 / 91,77
<i>B. antiquum</i>	WP_198396426.1	84,41 / 79,09
<i>B. aurantiacum</i>	WP_101557482.1	84,90 / 78,93
<i>B. casei</i>	WP_198499021.1	79,70 / 80,33

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

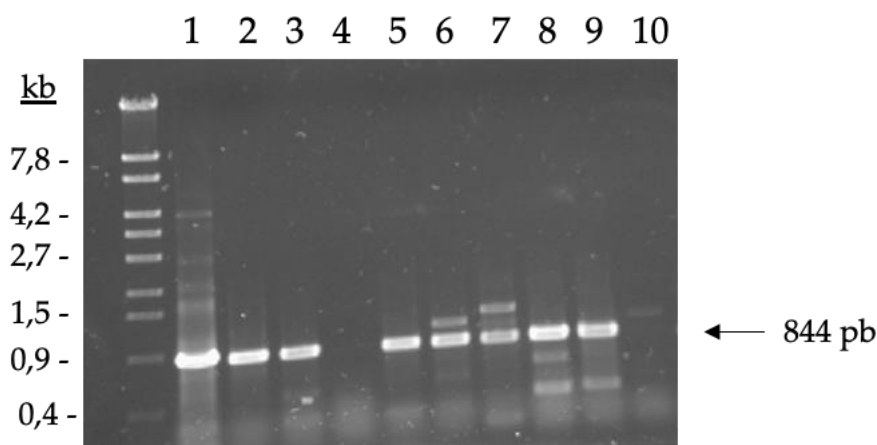


Figura 37. Detección del gen que codifica *BlOTasa* en cepas del género *Brevibacterium*. Las cepas analizadas fueron *B. linens* DSM 20425^T (carril 1), *B. permense* DSM 21546^T (carril 2), *B. sediminis* DSM 102229^T (carril 3), *B. senegalense* DSM 25783^T (carril 4), *B. casei* DSM 9657 (carril 5), *B. casei* DSM 20658 (carril 6), *B. epidermidis* DSM 20660^T (carril 7), *B. antiquum* DSM 21545^T (carril 8), *B. aurantiacum* DSM 20426^T (carril 9) y *B. jeotgali* DSM 29217^T (carril 10). Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos 2047 y 2048 se sometieron a electroforesis en gel. El marcador de tamaño molecular *EcoT14I* (Takara, Japón) aparece en el carril izquierdo. Los números indican algunos de los tamaños moleculares.

Se estudió también la región cromosómica contigua al gen que codifica la proteína *BlOTasa* en las especies ensayadas. Como se muestra en la **Figura 38**, los genomas muestran un entorno genético idéntico en la región *upstream* del gen *blotasa*. Si se toma como referencia el genoma de la especie *B. linens*, en el caso de *B. antiquum*, *B. aurantiacum* y *B. casei* se observa la inserción de un gen *downstream* del gen *blotasa*. Este gen codifica una proteína anotada como “*sugar porter family MFS transporter*”, implicada en el proceso de transporte de diferentes compuestos a través de la membrana citoplasmática, función similar a la observada en los genes contiguos. *B. casei* muestra un gen deletado respecto a las otras cepas, el cual codifica una proteína anotada como “*sodium:proton antiporter*” y, además, presenta una inserción de 13,6 kbs respecto a los demás genomas. En el genoma de las especies *B. senegalense* y *B. jeotgali* no se encontró ninguna proteína similar a *BlOTasa*. El BLAST realizado contra los genomas de estas especies no encontró proteínas con alta identidad de secuencia. Sin embargo, se identificaron los genes conservados alrededor del gen *blotasa* y se comprobó que en ninguno de los dos casos aparece ningún gen que codifique una proteína similar, anotada como “*amidohidrolasa*” o con una denominación equivalente. Estos resultados coinciden con la ausencia de banda de amplificación del gen mediante PCR y con la incapacidad de los cultivos de estas dos especies para degradar OTA. En consecuencia, los resultados indican que, al menos en las especies analizadas, el fenotipo de hidrólisis de OTA parece asociado a la presencia del gen *blotasa*. La organización genética en torno a este gen en *B. linens* aparece detallada en la **Tabla 22**.

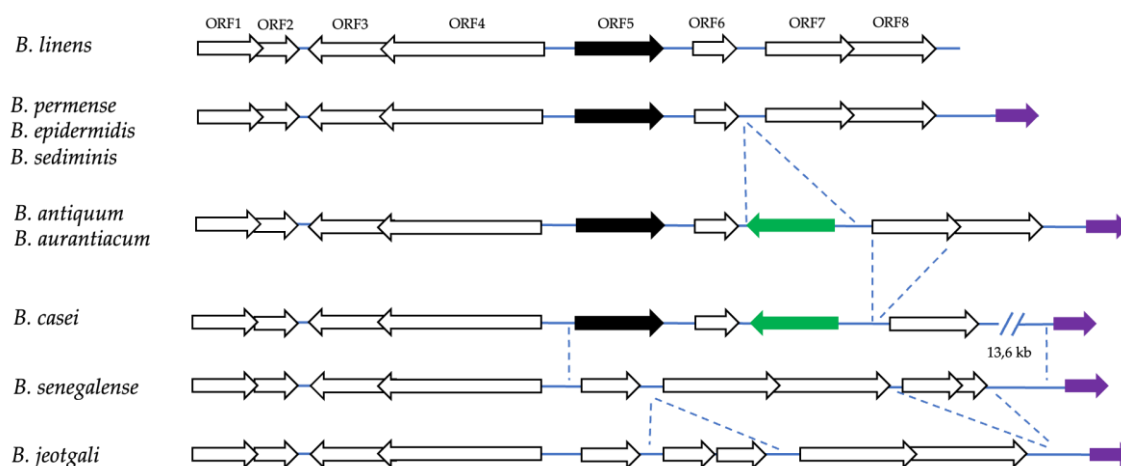


Figura 38. Organización genética de la región cromosómica contigua al gen que codifica *BlOTasa* en especies del género *Brevibacterium*. Se incluyen *B. linens* (NZ_CP026734.1), *B. permense* (NZ_CP013119), *B. epidermidis* (NZ_BCSJ01000015.1), *B. sediminis* (NZ_JAHQRN010000001.1), *B. antiquum* (NZ_JABASX010000003.1), *B. aurantiacum* (NZ_CP025333.1), *B. casei* (NZ_CP065682.1), *B. senegalense* (NZ_HE978607.1) y *B. jeotgali* (NZ_VIUB01000001.1). Las flechas indican los genes. Los genes que codifican proteínas similares a *BlOTasa* están representados por flechas negras.

Tabla 22. Organización genética de la región cromosómica contigua a *BlOTasa* en *B. linens* (NZ_CP026734.1).

ORF	Locus/gen	Cadena	aa	Anotación	Número de acceso
ORF1	CXR29_RS10540	+	438	Transportador de eflujo	WP_101593271.1
ORF2	CXR29_RS10535	+	280	N-acetiltransferasa familia GNAT	WP_127364487.1
ORF3	CXR29_RS17680	-	484	Metalopectidasa familia M1	WP_241241410.1
ORF4	CXR29_RS10525	-	1312	Sintetasa peptídica no ribosomal	WP_101553337.1
ORF5	CXR29_RS10520	+	404	Amidohidrolasa	WP_101553338.1
ORF6	CXR29_RS10515	+	167	Proteína con dominio VTT	WP_101553339.1
ORF7	CXR29_RS10510	+	463	Antiportador sodio:protón	WP_101553340.1
ORF8	CXR29_RS10505	+	417	Transportados MFS	WP_101593276.1

Los ensayos realizados para comprobar la asociación de la presencia de la enzima *BlOTasa* con la capacidad degradadora de OTA del microorganismo constituyen una evidencia indirecta. Con el fin de obtener una evidencia directa que confirmara esta hipótesis, se decidió interrumpir el gen que codifica esta enzima en *B. linens* DSM 20425^T para comprobar si, efectivamente, la interrupción del gen origina la desaparición del fenotipo de degradación de OTA que presenta *B. linens*. Para ello, se clonó un fragmento interno de 420 pb del gen *blotasa* (fg-*blotasa*) en el plásmido conjugativo pK18mob. Este vector carece de un origen de replicación utilizable por *B. linens*, por lo que, al introducirse en la bacteria mediante conjugación, y debido a la presencia de regiones idénticas al gen *blotasa*, debería insertarse en el ADN cromosómico por recombinación homóloga mediante un proceso de inserción-duplicación, dando lugar a la interrupción del gen. Con este fin, se llevaron a cabo numerosos intentos para modificar *B. linens* mediante conjugación con el plásmido recombinante pK18mob-fg-*blotasa*. A pesar de la realización de múltiples intentos, no se consiguió la obtención de dicho mutante en el transcurso de esta tesis. No obstante, como se ha expuesto anteriormente, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que el fenotipo de hidrólisis de OTA por parte de los cultivos de *Brevibacterium* parece estar exclusivamente asociado a la presencia de la enzima *BlOTasa*, al menos en las especies ensayadas.

4.3 Género *Cupriavidus*

El género *Cupriavidus* está formado por microorganismos Gram-negativos, quimioorganotrofos y quimiolitotrofos facultativos. Este género pertenece a la clase de β -proteobacterias y se encuentra en diversos hábitats como el suelo, nódulos radiculares de plantas y ambientes acuáticos. Además, los microorganismos que lo comprenden muestran tolerancia a metales pesados, y algunas especies poseen un importante potencial de degradación de xenobióticos (Janssen et al., 2010; Vandamme & Coenye, 2004; Goris et al., 2001; Makkar & Casida, 1987). Tal es el caso de *C. necator*, que es capaz de degradar compuestos aromáticos clorados y puede usar una amplia variedad de ácidos orgánicos y

alcoholes para su crecimiento quimiorganotrofo (Lykidis et al., 2010; Pérez-Pantoja et al., 2008). *C. necator* es un microorganismo muy estudiado debido a su uso como productor de poli- β -hidroxibutirato, un bioplástico; de hecho, fue la primera especie utilizada industrialmente por *Imperial Chemical Industries* para la producción de este compuesto (Zhang et al., 2022b). El listado QPS de la EFSA incluye la especie *C. necator*; la EFSA admite su empleo “únicamente con fines de producción” lo que posibilita su uso, siempre y cuando, no existan células viables en el producto final (Koutsoumanis et al., 2022). La experiencia en el empleo industrial de esta bacteria junto con la posibilidad de su uso en matrices alimentarias, la convierten en una especie atractiva para su utilización en la destoxificación de OTA.

En la actualidad, el género *Cupriavidus* incluye 20 especies según la LPSN, aunque se estima que se trata de un género *infra* estudiado, de modo que se espera el reconocimiento progresivo de muchas más especies (Arroyo-Herrera et al., 2020). Ferenzci y colaboradores (2014) describieron la capacidad de degradar OTA en cepas pertenecientes al género *Cupriavidus*. Concretamente, describieron la capacidad de la cepa de *C. basilensis* Ö16 para degradar esta micotoxina. Más tarde, Al-nussairawi y colaboradores (2020) realizaron un estudio más amplio de la capacidad de degradar diferentes micotoxinas en cepas tipo de 16 especies pertenecientes a este género. Estos investigadores describieron que las cepas tipo de las especies *C. necator*, *C. basilensis*, *C. numazuensis*, *C. alkaliphilus*, *C. respiraculi*, *C. pinatubonensis* y *C. taiwanensis* son capaces de degradar OTA, dando lugar a OT α y L- β -fenilalanina; mientras que las cepas tipo de las especies *C. oxalaticus*, *C. campinensis*, *C. gilardii*, *C. laharis*, *C. pampae*, *C. pauculus*, *C. plantarum*, *C. yeoncheonensis* y *C. metallidurans* no muestran este fenotipo (Al-nussairawi et al., 2020).

Esta tesis está enfocada en el estudio de la degradación de OTA, sin embargo, cabe destacar que en el trabajo realizado por Al-nussairawi y colaboradores (2020) se han descrito cepas capaces de degradar otras micotoxinas. Tal es el caso de las cepas tipo de *C. basilensis*, que posee la capacidad de degradar zearalenona y OTA, y *C. numazuensis*, que es capaz de destoxificar AFB1, zearalenona, la micotoxina T-2 y OTA (Al-nussairawi et al., 2020). Por ello, las cepas del género *Cupriavidus* pueden ser organismos idóneos para la destoxificación de materias primas contaminadas por una combinación de micotoxinas.

En el presente trabajo, se ensayó la capacidad de transformar OTA de las cepas tipo de siete especies: *C. basilensis* DSM 106286^T, *C. necator* DSM 13513^T, *C. taiwanensis* DSM 17343^T, *C. numazuensis* DSM 15562^T, *C. oxalaticus* DSM 1105^T, *C. campinensis* DSM 17293^T y *C. malaysiensis* DSM 19416^T (**Tabla 18**). Estas cepas se cultivaron en presencia de OTA durante siete días y, pasado este tiempo, se analizó la presencia de OTA en el cultivo. Los resultados del trabajo de Al-

nussairawi y colaboradores (2020) se confirmaron en este estudio, tanto en el caso de las cepas descritas como no degradadoras como en el caso de las que sí degradan (**Figura 39**), por lo que se confirma que la capacidad de degradar OTA no es una característica común a todas las especies pertenecientes al género *Cupriavidus*. Igualmente, se comprobó la acumulación de OT α en los sobrenadantes de los cultivos de las especies transformadoras y la ausencia de OTA tras el lavado de las células con metanol, descartando así la adsorción de la micotoxina a las paredes celulares de estas bacterias.

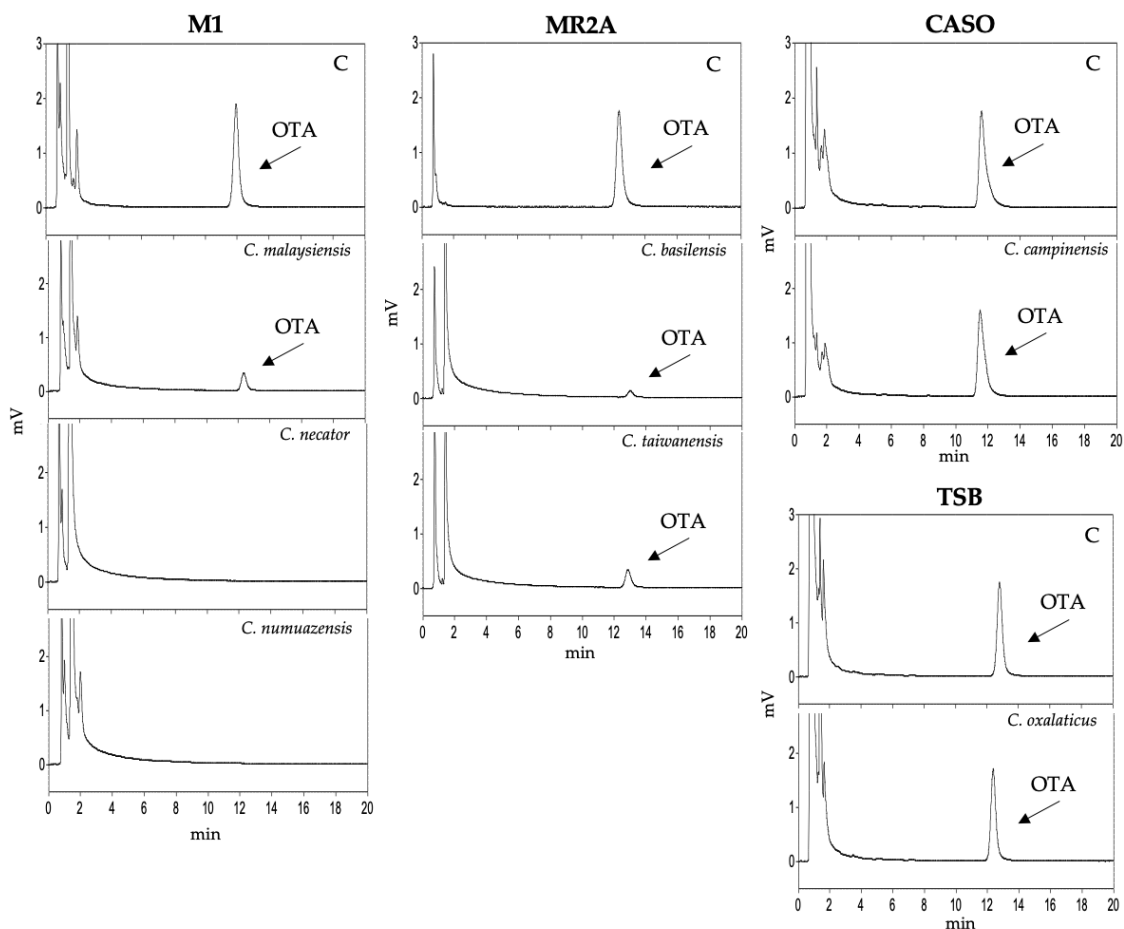


Figura 39. Degradación de OTA por cepas del género *Cupriavidus*. Las cepas analizadas fueron *C. basilensis* DSM 106286^T, *C. campinensis* DSM 17293^T, *C. malaysiensis* DSM 19416^T, *C. necator* DSM 13513^T, *C. numazuensis* DSM 15562^T, *C. oxalaticus* DSM 1105^T y *C. taiwanensis* DSM 17343^T. Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente (M1, MR2A, CASO o TSB) durante siete días en presencia de OTA (2 μ g/ml), y el sobrenadante se analizó por HPLC. Se indican con (C) los controles (medio de cultivo con OTA no inoculado).

Al-nussairawi (2020) realizó un estudio transcriptómico en el que analizó la expresión diferencial de genes en *C. basilensis* al cultivar el microorganismo en presencia y ausencia de OTA. En el experimento en presencia de OTA, el ensayo se realizó cultivando *C. basilensis* en medio mínimo suplementado con OTA como única fuente de carbono, con el objetivo de activar aquellos genes posiblemente implicados en su metabolismo. Como resultado de este estudio, se identificaron

tres proteínas que potencialmente podían transformar OTA; dos de ellas anotadas como D-alanil-D-alanina carboxipeptidasas (CPA1 y CPA3) y otra anotada como una carboxipeptidasa metalodependiente (CPA2). Posteriormente, estas enzimas de *C. basilensis* se clonaron y expresaron heterológamente para estudiar su actividad sobre OTA. Las enzimas recombinantes producidas mostraron porcentajes de degradación alrededor del 60%, tras incubarlas 16 h a 37 °C en presencia de 2 µg/ml de OTA. Además, realizaron un ensayo incubando simultáneamente las tres enzimas en presencia de OTA y el porcentaje de degradación fue del 50% (Al-nussairawi, 2020).

En el presente trabajo, en la búsqueda de proteínas similares a la N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa de *A. faecalis* DSM 16503^T (AfOTasa), se identificó una amidohidrolasa perteneciente a *C. necator* DSM 13513^T (Apartado 1 de Resultados y discusión). Esta peptidasa M20D se produjo heterológamente y se comprobó la capacidad de la enzima para degradar por completo la OTA al incubarla a 37 °C durante 18 h en presencia de 2 µg/ml de micotoxina. En un alineamiento de secuencia, se puede comprobar que las proteínas descritas previamente por Al-nussairawi (2020) muestran entre un 17 y un 34% de identidad de secuencia con la proteína descrita en este trabajo (**Anexo IV**), por lo que se trata de una nueva proteína no estudiada previamente.

Como en los géneros estudiados anteriormente, se analizó la presencia del gen que codifica CnOTasa en las cepas tipo de las especies de *Cupriavidus* ensayadas en este trabajo, mediante una PCR con oligonucleótidos degenerados, utilizando como molde el ADN cromosómico de dichas cepas. En dicha PCR, se utilizaron los oligonucleótidos 2051 y 2052 que codifican los motivos conservados HLRKLG M y HSPEFYV, respectivamente, los cuales dan lugar a un amplicón de 1043 pb (**Tabla 8**) (**Anexo V**). Las proteínas similares a CnOTasa en las diferentes especies de *Cupriavidus* utilizadas para realizar los alineamientos (**Anexo V**) y diseñar los oligonucleótidos degenerados se muestran en la **Tabla 23**. El resultado de las reacciones de PCR se muestra en la **Figura 40**, en la cual se observa que las cepas para las que se confirmó la hidrólisis de OTA también presentan el gen que codifica CnOTasa, mientras que las cepas que no mostraron dicha actividad (*C. oxalaticus* y *C. campinensis*) no muestran este producto de amplificación en la PCR.

Tabla 23. Proteínas similares a CnOTasa en el género *Cupriavidus*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>C. necator</i>	WP_011615094.1	100 / 100
<i>C. malaysiensis</i>	WP_071070808.1	90,40 / 84,36
<i>C. basilensis</i>	WP_150987640.1	88,86 / 85,11
<i>C. taiwanensis</i>	WP_012352648.1	93,90 / 91,23
<i>C. numazuensis</i>	WP_211953016.1	91,29 / 86,88

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

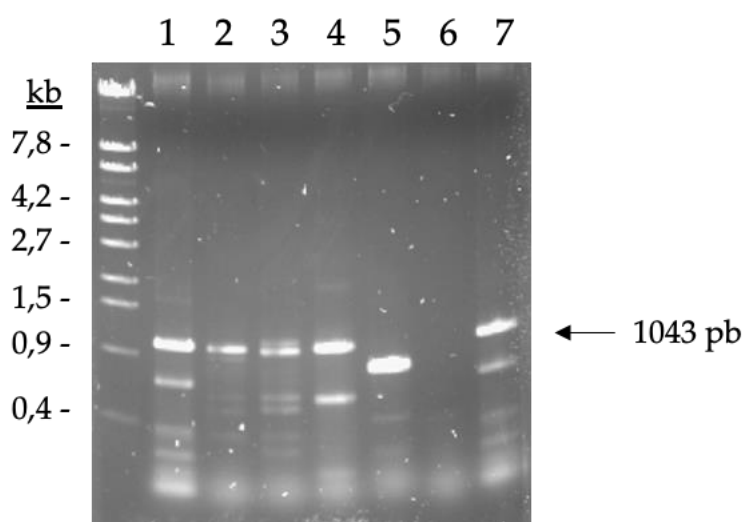


Figura 40. Detección del gen que codifica *CnOTasa* en cepas del género *Cupriavidus*. Las cepas analizadas fueron *C. necator* DSM 13513^T (carril 1), *C. malaysiensis* DSM 19416^T (carril 2), *C. taiwanensis* DSM 17343^T (carril 3), *C. numazuensis* DSM 15562^T (carril 4), *C. oxalaticus* DSM 1105^T (carril 5), *C. campinensis* DSM 17293^T (carril 6) y *C. basilensis* DSM 106286^T (carril 7). Los productos de la PCR obtenidos con los oligonucleótidos 2051 y 2052 se sometieron a electroforesis en gel. El marcador de tamaño molecular *EcoT14I* (Takara, Japón) aparece en el carril izquierdo. Los números indican algunos de los tamaños moleculares.

Con objeto de conocer si la presencia de las proteínas de *Cupriavidus* descritas previamente por Al-nussairawi (2020) se asocian con el fenotipo degradador de OTA, se decidió analizar *in silico* su presencia en las siete especies de *Cupriavidus* estudiadas en esta tesis. Como se puede observar en la **Tabla 24** (CPA1), la **Tabla 25** (CPA2), y la **Tabla 26** (CPA3), las dos D-alanil-D-alanina carboxipeptidasas (CPA1 y CPA3) se encuentran presentes en todas las especies, independientemente de su capacidad para degradar OTA; en el caso de la carboxipeptidasa metalodependiente (CPA2), además de en las especies degradadoras, también encontramos la proteína en *C. oxalaticus*, especie no degradadora de OTA. Estos resultados parecen indicar que la presencia de CPA1, CPA2 y CPA3 no está asociada con el fenotipo de degradación de OTA observado en los cultivos. Por otra parte, cabe señalar que, al realizar este análisis, se observó que la enzima CPA2 está anotada como una aminoacilasa de la familia M20. De acuerdo con los resultados de Al-nussairawi (2020), CPA2 de *C. basilensis* presenta una capacidad degradadora de OTA limitada en comparación con la capacidad de la también peptidasa M20 *CnOTasa* de *C. necator* identificada en esta tesis, capaz de degradar la OTA presente en el medio por completo.

Tabla 24. Proteínas similares a D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (CPA1) de *Cupriavidus basilensis* en el género *Cupriavidus*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>C. necator</i>	WP_042883913.1	87,31 / 87,80
<i>C. malaysiensis</i>	WP_071010855.1	85,82 / 87,17
<i>C. basilensis</i>	WP_006160152.1	100 / 100
<i>C. taiwanensis</i>	WP_116335986.1	86,32 / 87,05
<i>C. numazuensis</i>	WP_211954225.1	87,06 / 87,39
<i>C. oxalaticus</i>	WP_063236616.1	86,57 / 86,85
<i>C. campinensis</i>	WP_144199024.1	84,54 / 85,43

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Tabla 25. Proteínas similares a carboxipeptidasa metalodependiente (CPA2) de *Cupriavidus basilensis* en el género *Cupriavidus*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>C. necator</i>	WP_011299417.1	90,80 / 81,35
<i>C. malaysiensis</i>	WP_071068405.1	94,51 / 86,93
<i>C. basilensis</i>	WP_006157324.1	100 / 100
<i>C. taiwanensis</i>	CAQ72129.1	55,50 / 62,51
<i>C. numazuensis</i>	WP_211956842.1	90,57 / 81,44
<i>C. oxalaticus</i>	WP_133097791.1	90,05 / 83,75
<i>C. campinensis</i>	WP_144201211.1	48,12 / 60,51

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Tabla 26. Proteínas similares a D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (CPA3) de *Cupriavidus basilensis* en el género *Cupriavidus*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>C. necator</i>	WP_011614586.1	72,66 / 76,95
<i>C. malaysiensis</i>	WP_071068652.1	74,95 / 78,98
<i>C. basilensis</i>	WP_006158086.1	100 / 100
<i>C. taiwanensis</i>	WP_116336217.1	80,76 / 75,91
<i>C. numazuensis</i>	WP_211954054.1	80,35 / 79,65
<i>C. oxalaticus</i>	WP_151071193.1	77,97 / 75,78
<i>C. campinensis</i>	WP_144197302.1	70,40 / 75,59

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Con objeto de dilucidar la presencia o ausencia de residuos relevantes en CPA2 de *C. basilensis* que pudieran explicar su baja actividad sobre OTA, se realizó un alineamiento de secuencias entre las proteínas identificadas como M20D similares a CPA2 en las especies de *Cupriavidus* ensayadas, las proteínas similares a *CnOTasa*, las proteínas similares a *AfOTasa* en las especies de *Alcaligenes* ensayadas (por ser también peptidasas M20D con actividad sobre OTA) y la proteína *SnAH* de *S. nitritireducens* (por ser también una peptidasa M20D con una capacidad de degradación de OTA limitada). La **Figura 41** muestra el alineamiento donde se observa que CPA2 tiene conservados los motivos característicos de la subfamilia M20D, así como los residuos del centro catalítico y otros residuos conservados dentro de esta subfamilia. A pesar de la limitación para determinar *in silico* los aminoácidos responsables de las diferencias en actividad observadas entre CPA2 y *CnOTasa*, es posible encontrar

La organización genética de la región contigua al gen que codifica *CnOTasa* se estudió en las cepas ensayadas y se observó que *C. necator*, *C. taiwanensis* y *C. numazuensis* poseen dicho gen en una región muy conservada en todas ellas, flanqueada por los genes denominados *argE* (ORF4) y *serB* (ORF6) (**Figura 42**). Además, comparten una región similar con *C. oxalaticus* y *C. campinensis*, aunque en éstas el gen *cnotasa* está ausente, lo que coincide con su incapacidad para degradar OTA. En el caso de *C. malaysiensis* y *C. basilensis*, en la región *upstream* se observa la presencia de un gen que codifica una proteína anotada como “*MFS transporter*” entre *cnotasa* y *argE*; *downstream*, la organización genética es distinta a la observada en las otras especies de este género (**Figura 42**).

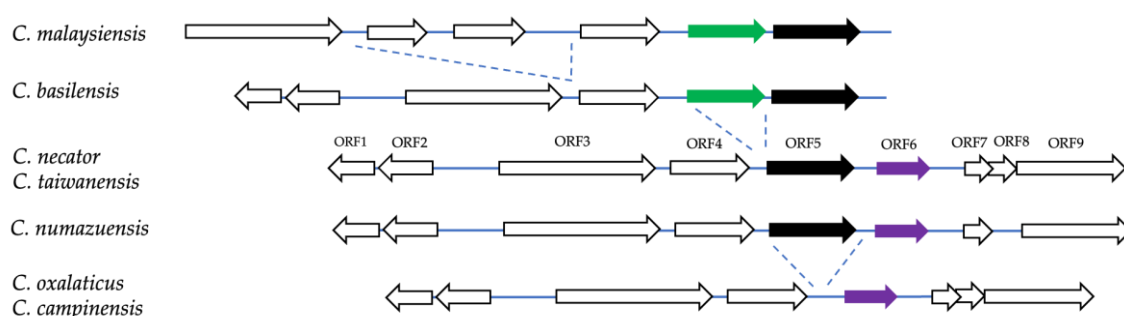


Figura 42. Organización genética de la región cromosómica contigua al gen que codifica *CnOTasa* en especies del género *Cupriavidus*. Se incluyen *C. malaysiensis* (NZ_CP017754.1), *C. basilensis* (NZ_CP062803.1), *C. necator* (NZ_CP039287.1), *C. taiwanensis* (NC_010528.1), *C. numazuensis* (NZ_CAJPVI010000009.1), *C. oxalaticus* (NZ_CP032519.1) y *C. campinensis* (NZ_VCIZ01000001.1). Las flechas indican los genes. Los genes que codifican proteínas similares a *CnOTasa* están representados por flechas negras.

La **Tabla 27** muestra las características de los genes situados alrededor del gen *cnotasa* en *C. necator*. En conjunto, los resultados obtenidos indican que, al menos en las cepas analizadas, el fenotipo de hidrólisis de OTA parece estar asociado con la presencia del gen que codifica la enzima *CnOTasa*.

Tabla 27. Organización genética de la región cromosómica contigua a *CnOTasa* en *C. necator* (NZ_CP039287.1).

ORF	Locus/gen	Cadena	aa	Anotación	Número de acceso
ORF1	E6A55_RS07360	-	169	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa	WP_010810113.1
ORF2	E6A55_RS07355	-	246	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa	WP_037023390.1
ORF3	<i>mfd</i>	+	1149	Factor de reparación de transcripción	WP_011615095.1
ORF4	<i>argE</i>	+	404	Acetilornitina deacetilasa	WP_010810116.1
ORF5	E6A55_RS07340	+	455	Amidohidrolasa	WP_011615094.1
ORF6	<i>serB</i>	+	284	Fosfoserina fosfatasa SerB	WP_010810118.1
ORF7	E6A55_RS07330	+	95	Proteína hipotética	WP_011615093.1
ORF8	E6A55_RS07325	+	100	Proteína hipotética	WP_011615092.1
ORF9	E6A55_RS07320	+	549	Proteína con un dominio PepsY	WP_011615091.1

Puesto que se habían descrito previamente tres proteínas capaces de hidrolizar parcialmente OTA, con objeto de identificar inequívocamente la proteína responsable del fenotipo degradador de OTA en *C. necator* DSM 13513^T, se decidió construir una cepa mutante de *C. necator* mediante la interrupción del gen *cnotasa*, para analizar su capacidad de degradar la micotoxina. Así, en caso de confirmarse la pérdida de actividad, se obtendría una evidencia directa de la asociación entre el fenotipo degradador y la presencia de CnOTasa. Con este objetivo, se clonó un fragmento interno de 472 pb del gen que codifica CnOTasa (fg-*cnotasa*) en el plásmido conjugativo pK18mob. Tal y como se comentó en el caso de *B. linens*, este vector carece de un origen de replicación utilizable por *C. necator*. Así, al introducirse en la bacteria, y debido a la presencia de regiones idénticas al gen *cnotasa*, debería insertarse en el ADN cromosómico por recombinación homóloga mediante un proceso de inserción-duplicación produciendo la interrupción del gen de interés. Con este objetivo, se realizaron numerosos intentos para modificar *C. necator* mediante conjugación con el plásmido recombinante pK18mob-fg-*cnotasa*, variando diferentes parámetros. Como en el caso de *B. linens*, en el transcurso de este trabajo no se ha conseguido la obtención de mutantes de interrupción de dicho gen. No obstante, como se ha expuesto anteriormente, las evidencias presentadas en este trabajo apoyan la hipótesis de que el fenotipo de hidrólisis de OTA por parte de los cultivos parece estar exclusivamente asociado a la presencia de CnOTasa, al menos en las especies ensayadas.

4.4 Género *Lysobacter*

El género *Lysobacter* pertenece a la clase de γ -proteobacterias y está formado por bacilos Gram-negativos, que se encuentran de forma ubicua en suelos y ambientes acuáticos. Su nombre proviene de su actividad lítica frente a otros microorganismos como bacterias, hongos y nematodos. Este género se caracteriza por la producción de enzimas extracelulares como quitinasas, proteasas, lipasas y esterases, y por ser una fuente de metabolitos secundarios con actividad antibiótica. Por este motivo, se utilizan frecuentemente como agentes de biocontrol contra microorganismos fitopatogénicos (Puopolo et al., 2018). En la actualidad, la LPSN recoge 70 especies dentro de este género (www.bacterio.net).

La capacidad hidrolizadora de OTA presentada por cepas del género *Lysobacter* se describió previamente en un estudio realizado por Wei y colaboradores (2020), quienes demostraron la transformación de OTA por parte de la cepa *Lysobacter* sp. CW239, aislada de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos aromáticos policíclicos. En esta tesis, tal y como se ha descrito

previamente (Apartado 1 de Resultados y discusión), se demostró la capacidad para degradar OTA de *L. concretionis* DSM 16239^T. Para conocer la capacidad de hidrolizar OTA que presentan otras especies del género *Lysobacter*, se adquirieron las cepas tipo de las siguientes especies: *L. spongiicola* DSM 21749^T, *L. niastensis* DSM 18481^T, *L. daejeonensis* DSM 17634^T, *L. soli* DSM 24712^T, *L. capsici* DSM 19286^T, *L. enzymogenes* DSM 2043^T y *L. silvestris* DSM 104734^T (**Tabla 18**). Las cepas se incubaron en presencia de OTA durante siete días y se analizó la micotoxina remanente en el sobrenadante de los cultivos (**Figura 43**). Todas las cepas analizadas, excepto la cepa *L. silvestris* DSM 104734^T, muestran desaparición de la OTA presente en el medio. Este resultado demuestra que la capacidad de degradar OTA no es una característica presente en todas las especies del género *Lysobacter*. Por otro lado, la ausencia de OTA tras el lavado de las células con metanol, en los casos en los que había desaparecido la OTA presente en el medio, descartó la adsorción como mecanismo de reducción de la micotoxina.

En el mismo estudio en el que se describió la capacidad degradadora de OTA de la cepa de *Lysobacter* sp. CW239, se realizó un cribado del genoma de *L. concretionis* (especie filogenéticamente más cercana) en busca de la enzima responsable de este fenotipo. Para esta búsqueda se basaron en la capacidad degradadora de OTA previamente descrita de otras enzimas clasificadas como carboxipeptidasas (Wei et al., 2020). Como resultado, encontraron cuatro carboxipeptidasas como posibles responsables de la degradación de OTA. Wei y colaboradores (2020) clonaron y expresaron heterológicamente estas enzimas y caracterizaron su capacidad degradadora de OTA, incubándolas en presencia de 10 µg/L de la micotoxina durante 24 h a 37 °C. Una de ellas mostró actividad frente a OTA dando lugar a OT α , proteína a la que denominaron cp4. La enzima cp4 exhibió una actividad degradadora de OTA moderada e inferior a la observada en los cultivos de la cepa *Lysobacter* sp. CW239. La cepa mostró una degradación de OTA del 86% después de 24 h de incubación en presencia de la micotoxina, mientras que, en ese mismo tiempo, cp4 sólo transformó un 37% de la OTA presente. En un estudio posterior, estos mismos investigadores construyeron una cepa de *Lysobacter* sp. CW239 deficiente en cp4 y observaron que la capacidad de degradación de OTA de la cepa mutante se reducía en menos de un 10% respecto a la cepa silvestre. Por ello, concluyeron que debe existir otra enzima más eficiente responsable de la capacidad degradadora de OTA de esta cepa o que la hidrólisis de OTA se debe a la acción conjunta de múltiples enzimas, siendo la carboxipeptidasa cp4 sólo una de las proteínas responsables de este fenotipo (Qian et al., 2021).

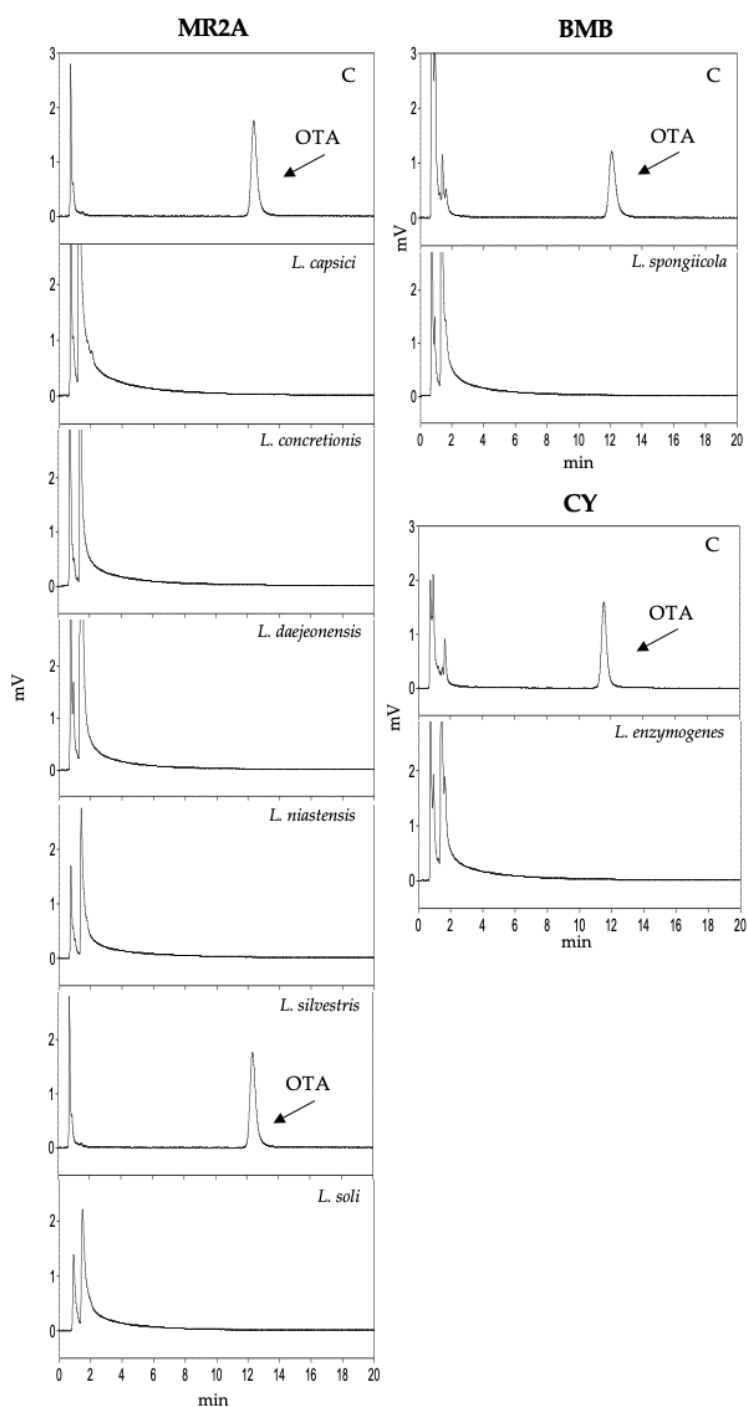


Figura 43. Degradación de OTA por cepas del género *Lysobacter*. Las cepas analizadas fueron *L. capsici* DSM 19286^T, *L. concretionis* DSM 16239^T, *L. daejeonensis* DSM 17634^T, *L. enzymogenes* DSM 2043^T, *L. niastensis* DSM 18481^T, *L. silvestris* DSM 104734^T, *L. soli* DSM 24712^T y *L. spongicola* DSM 21749^T. Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente (MR2A, BMB o CY) durante siete días en presencia de OTA (2 µg/ml), y el sobrenadante se analizó por HPLC. Se indican con (C) los controles (medio de cultivo con OTA no inoculado).

En el estudio *in silico* realizado en esta tesis, se encontró una proteína anotada como “amidohidrolasa” en *L. concretionis* DSM 16239^T, con una identidad del 28,84% respecto a la ocratoxinas de *A. niger* UVK143. Esta proteína, *LcOTasa*,

hidrolizó por completo la OTA presente en el medio (2 µg/ml) al incubarla durante 18 h a 37 °C (Apartado 3.2 de Resultados y discusión). Por otro lado, se realizó una búsqueda de proteínas similares a LcOTasa en otras especies del género *Lysobacter*, con las cuales se realizó un alineamiento de secuencias que permitió identificar motivos conservados de aminoácidos (**Tabla 28**) (**Anexo V**). A partir de dos de estos motivos se diseñaron los oligonucleótidos degenerados 2156 y 2157 que codifican los motivos conservados GGHADPTN y FGTDMGVG, respectivamente, y que amplifican un fragmento interno de 558 pb del gen que codifica la enzima LcOTasa (**Tabla 8**). El ADN cromosómico de las cepas incluidas en el estudio se utilizó como molde para llevar a cabo una PCR con dichos oligonucleótidos. En la **Figura 44**, se puede observar que las cepas tipo de las ocho especies ensayadas amplifican el gen que codifica la enzima, excepto la cepa *L. silvestris* DSM 104734^T. Estos resultados coinciden con la información previamente obtenida del análisis de la presencia de OTA en los sobrenadantes de los cultivos. Con objeto de conocer si la carboxipeptidasa cp4 se encuentra en todas las especies ensayadas, se analizó su presencia *in silico* (**Tabla 29**). La búsqueda reveló que el gen que codifica la enzima cp4 se encontró en todas las especies ensayadas, incluyendo *L. silvestris*, especie que no degradó OTA en cultivo. Estos resultados indican que la presencia de la carboxipeptidasa cp4 no parece ser la responsable del fenotipo de degradación de OTA encontrado en los cultivos, lo que coincide con la baja actividad de la proteína pura descrita por Wei y colaboradores (2020).

Tabla 28. Proteínas similares a LcOTasa en el género *Lysobacter*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>L. concretionis</i>	WP_036192648.1	100 / 100
<i>L. spongiicola</i>	WP_078757295.1	80,60 / 79,57
<i>L. daejeonensis</i>	WP_036134298.1	77,70 / 80,02
<i>L. soli</i>	WP_181902676.1	77,01 / 78,79
<i>L. niastensis</i>	WP_228760451.1	80,47 / 79,72
<i>L. enzymogenes</i>	WP_096377361.1	78,39 / 81,30
<i>L. capsici</i>	WP_096414057.1	78,06 / 78,90

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

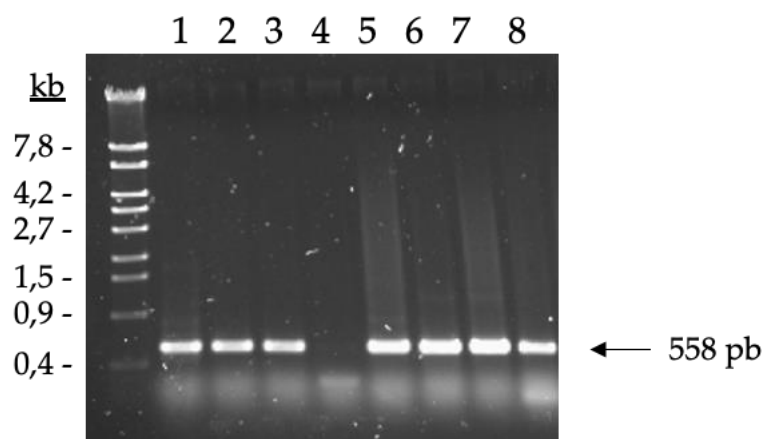


Figura 44. Detección del gen que codifica *LcOTasa* en cepas del género *Lysobacter*. Las cepas analizadas fueron *L. concretionis* DSM 16239^T (carril 1), *L. spongiicola* DSM 21749^T (carril 2), *L. niastensis* DSM 18481^T (carril 3), *L. silvestris* DSM 104734^T (carril 4), *L. daejeonensis* DSM 17634^T (carril 5), *L. soli* DSM 24712^T (carril 6), *L. capsici* DSM 19286^T (carril 7) y *L. enzymogenes* DSM 2043^T (carril 8). Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos 2156 y 2157 se sometieron a electroforesis en gel. El marcador de tamaño molecular *EcoT14I* (Takara, Japón) aparece en el carril izquierdo. Los números indican algunos de los tamaños moleculares.

Tabla 29. Proteínas similares a la carboxipeptidasa cp4 en el género *Lysobacter*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>L. concretionis</i>	WP_052103234.1	100 / 100
<i>L. spongiicola</i>	WP_078757865.1	77,97 / 81,03
<i>L. daejeonensis</i>	WP_036140135.1	77,39 / 81,59
<i>L. soli</i>	WP_115841175.1	76,73 / 79,18
<i>L. niastensis</i>	WP_228760731.1	78,09 / 81,07
<i>L. enzymogenes</i>	WP_207526357.1	80,22 / 78,90
<i>L. capsici</i>	WP_096416191.1	77,53 / 79,72
<i>L. silvestris</i>	WP_103073588.1	73,28 / 74,17

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Una vez demostrada la implicación de *LcOTasa* en el fenotipo de degradación de OTA, se estudió la organización genética de la región que rodea al gen *lcotasa* en las especies ensayadas. Como se muestra en la **Figura 45**, los genomas de las especies analizadas muestran una organización genética bastante conservada en la región *upstream* del gen, donde aparecen dos locus conservados, *lptE-leuS* (ORF1-ORF2). *Downstream*, aparece conservado el gen que codifica la tioredoxina A (*trxA*) (ORF6). Por su parte, el BLAST realizado contra el genoma de *L. silvestris*, sólo encontró una proteína con un porcentaje de identidad inferior al 40% con *LcOTasa*. Sin embargo, *L. silvestris* sí posee algunos de los genes conservados en las otras especies alrededor del gen *lcotasa*, aunque en el entorno no aparece ningún gen que codifique una proteína anotada como “amidohidrolasa” u otra denominación equivalente, lo que justificaría la ausencia de actividad degradadora de OTA en esta especie. La organización

genética próxima al gen que codifica *LcOTasa* en *L. concretionis* aparece detallada en la **Tabla 30**.

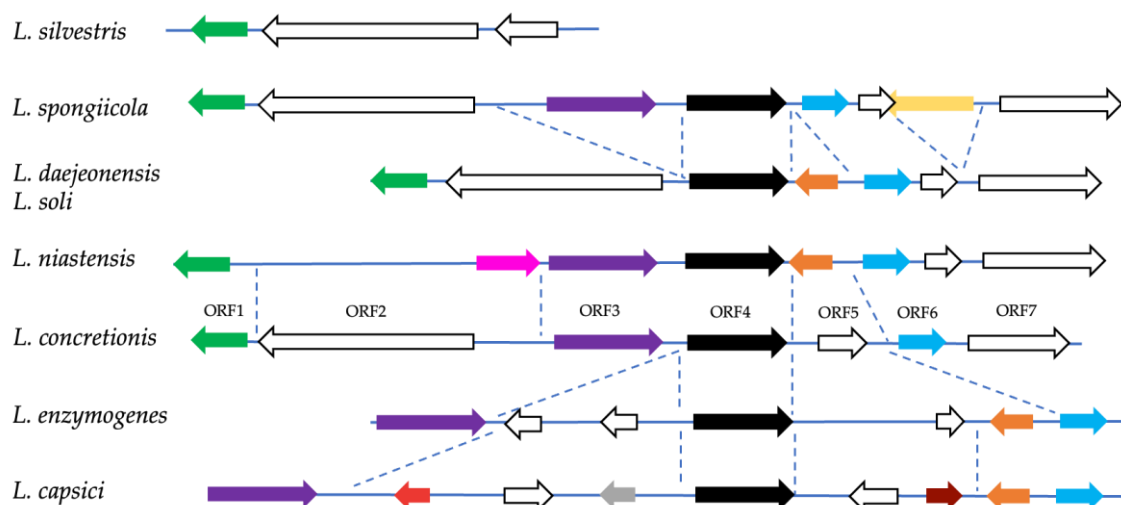


Figura 45. Organización genética de la región cromosómica contigua al gen que codifica *LcOTasa* en especies del género *Lysobacter*. Se incluyen *L. silvestris* (NZ_NPZB01000001.1), *L. spongiicola* (NZ_FUXP01000001.1), *L. daejeonensis* (NZ_AVPU01000002.1), *L. soli* (NZ_CP046603.1), *L. niastensis* (NZ_JADLZT01000001.1), *L. concretionis* (NZ_AVPS01000003.1), *L. enzymogenes* (NZ_AP014940.1) y *L. capsici* (NZ_CP023465.1). Las flechas indican los genes. Los genes que codifican proteínas similares a *LcOTasa* están representados por flechas negras.

Tabla 30. Organización genética de la región cromosómica contigua a *LcOTasa* en *L. concretionis* (NZ_AVPS01000003.1).

ORF	Locus/gen	Cadena	aa	Anotación	Número de acceso
ORF1	<i>lptE</i>	-	224	Lipoproteína ensamblaje LPS LptE	WP_036192646.1
ORF2	<i>leuS</i>	-	928	Leucín-tRNA ligasa	WP_084105388.1
ORF3	N792_RS03305	+	556	Diguanilato ciclasa	WP_052103384.1
ORF4	N792_RS03310	+	438	Amidohidrolasa	WP_036192648.1
ORF5	N792_RS03315	+	160	Alquil hidroperóxido reductasa	WP_036192649.1
ORF6	<i>trxA</i>	+	290	Tiorredoxina	WP_036192650.1
ORF7	N792_RS03325	+	479	Proteína familia aldehído deshidrogenasa	WP_036192651.1

De las 70 especies reconocidas dentro del género *Lysobacter*, en este trabajo se han analizado cepas tipo de ocho de ellas. Los cultivos en presencia de OTA de todas las cepas ensayadas, excepto la cepa tipo de *L. silvestris*, fueron capaces de degradar la toxina. En todas las cepas con capacidad degradadora se ha encontrado el gen que codifica la peptidasa M38 *LcOTasa*, tanto mediante un estudio *in silico* como mediante amplificación del gen de interés. Por otra parte, analizando bases de datos genómicas, se ha encontrado la presencia del gen que codifica la carboxipeptidasa cp4 en todas las especies ensayadas, incluyendo *L.*

silvestris. Los resultados obtenidos sugieren que, al menos en las especies analizadas, el fenotipo de hidrólisis de OTA parece estar asociado con la presencia del gen que codifica la enzima LcOTasa y ser independiente de la presencia del gen que codifica la carboxipeptidasa cp4.

4.5 Género *Sphingomonas*

El género *Sphingomonas* incluye a un grupo de α -proteobacterias Gram-negativas, quimioheterótrofas y aerobias (Yabuuchi et al., 1990). Las bacterias pertenecientes a este género se aíslan de diversos ambientes como la rizosfera, suelos contaminados, aguas subterráneas, aguas residuales y aguas marinas. Uno de los fenotipos más característico de los miembros de este género es la presencia de glicoesfingolípidos en su envoltura celular, en vez de lipopolisacáridos. Se trata de bacterias metabólicamente versátiles, con gran capacidad de degradación de una gran variedad de xenobióticos, incluyendo tintes azoicos, fenoles clorados, dibenzofuranos, insecticidas y herbicidas (Leys et al., 2004). La explotación de las capacidades metabólicas del género *Sphingomonas* puede aportar importantes beneficios comerciales en el campo de la biotecnología. Estudios recientes demuestran que estos organismos poseen capacidades adecuadas para degradar contaminantes recalcitrantes y para actuar como antagonistas de hongos fitopatógenos, por lo que se consideran aptos para su utilización en biorremediación (He et al., 2017). Se trata de un género muy amplio en el cual se han descrito numerosas especies. Actualmente, la LPSN recoge la descripción de 153 especies dentro de él (www.bacterio.net).

Cabe destacar que, del mismo modo que en el género *Cupriavidus*, dentro del género *Sphingomonas* se han descrito cepas capaces de degradar otras micotoxinas. Este es el caso de la cepa *Sphingomonas* sp. ATCC 55552, patentada como cepa degradadora de fumonisinas (Duvick et al., 2003), y la cepa *Sphingomonas* S3-4, que posee la capacidad de degradar deoxinivalenol y zearalenona (He et al., 2017). Por este motivo, las cepas del género *Sphingomonas* también pueden resultar organismos adecuados para la destoxicación de materias primas contaminadas por una combinación de micotoxinas.

La degradación de OTA por cepas del género *Sphingomonas* se describió por primera vez por Schatzmayr y colaboradores (2002, 2006). Estos autores describieron que cepas de las especies *S. paucimobilis* y *S. assacharolytica* eran capaces de degradar OTA (Schatzmayr et al., 2006). Asimismo, describieron la capacidad degradadora de la cepa *Sphingomonas* sp. DSM 14167 (Schatzmayr et al., 2012) que, como se explica en el Apartado 1 de Resultados y discusión, en esta

tesis se ha identificado taxonómicamente como *S. dokdonensis*, mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

En el estudio *in silico* realizado en el presente trabajo, se identificó una proteína en la cepa *S. dokdonensis* DSM 21029^T anotada como “amidohidrolasa” que presenta similitud con la ocratoxinasasa de *A. niger* UVK143 y, posteriormente, se confirmó su capacidad para transformar OTA en OT α (Apartado 3.2 de Resultados y discusión). Esta proteína es la primera enzima descrita como degradadora de OTA en este género. La hidrólisis de OTA también se confirmó en cultivos de esta cepa en medio suplementado con la micotoxina (Apartado 1 de Resultados y discusión). Para conocer la capacidad de hidrolizar OTA que presentan otras especies del género *Sphingomonas*, se adquirieron las cepas tipo de las siguientes especies: *S. adhaesiva* DSM 7418^T, *S. canadensis* DSM 29393^T, *S. endophytica* DSM 101535^T y *S. jeddahensis* DSM 103790^T. Las cepas se incubaron en presencia de OTA durante siete días y se analizó la micotoxina remanente en el sobrenadante de los cultivos (**Figura 46**). No se muestran resultados de la cepa *S. canadensis* DSM 29393^T ya que no fue capaz de crecer en el medio de cultivo recomendado por el proveedor, ni en otros medios ricos testados. De las cepas analizadas, todas muestran disminución de OTA en el medio, excepto la cepa *S. endophytica* DSM 101535^T. Este resultado revela que la capacidad de degradar OTA no es una característica común a todas las especies del género. Además, la ausencia de OTA tras el lavado con metanol de las células sedimentadas confirmó que en ninguno de los casos la reducción de la toxina se debió a un mecanismo de adsorción de OTA a las paredes celulares.

A continuación, para analizar si la presencia de la proteína *SdOTasa* se puede asociar con el fenotipo de la cepa para degradar la micotoxina, se analizó la presencia del gen que la codifica en las especies de *Sphingomonas* ensayadas. Se realizó una búsqueda en los genomas de estas especies de proteínas similares a *SdOTasa* (**Tabla 31**) y con ellas se realizó un alineamiento de secuencias en el que se identificaron motivos conservados (**Anexo V**). Dos de estos motivos conservados se seleccionaron para diseñar oligonucleótidos degenerados. De modo que se diseñaron los oligonucleótidos 2188 (motivo LGAQVIK) y 2189 (motivo GVSKHG) que amplifican un fragmento interno de 438 pb del gen que codifica *SdOTasa* (**Tabla 8**). Seguidamente, se realizó una PCR con dichos oligonucleótidos utilizando como molde el ADN cromosómico de las cepas tipo incluidas en el estudio. A pesar de numerosos intentos, variando diferentes condiciones de la reacción de PCR para aumentar la inespecificidad o variando las polimerasas empleadas, no se obtuvo producto de amplificación en ninguno de los casos.

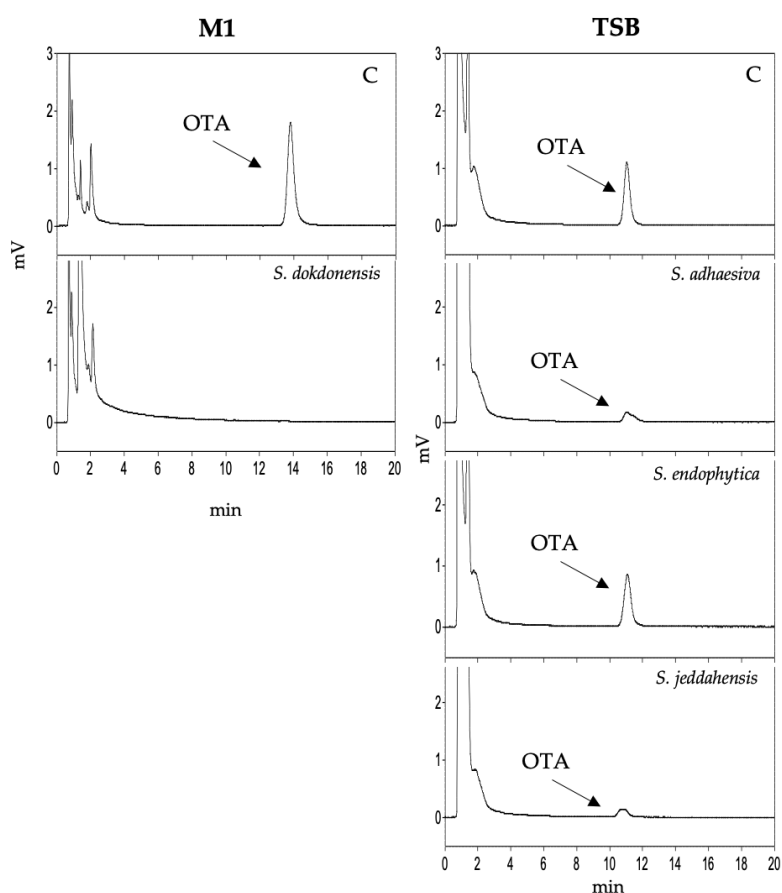


Figura 46. Degradación de OTA por cepas del género *Sphingomonas*. Las cepas analizadas fueron *S. adhaesiva* DSM 7418^T, *S. dokdonensis* DSM 21029^T, *S. endophytica* DSM 101535^T y *S. jeddahensis* DSM 103790^T. Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente durante siete días (M1 o TSB) en presencia de OTA (2 µg/ml), y el sobrenadante se analizó por HPLC. Se indican con (C) los controles (medio de cultivo con OTA no inoculado).

Tabla 31. Proteínas similares a *SdOTasa* en el género *Sphingomonas*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>S. dokdonensis</i>	WP_088366708.1	100 / 100
<i>S. adhaesiva</i>	WP_096640851.1	67,81 / 72,36
<i>S. jeddahensis</i>	WP_076743622.1	84,70 / 44,88
<i>S. canadensis</i>	MCW3837133.1	68,34 / 71,52

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Al igual que en el estudio realizado en los otros géneros, en el género *Sphingomonas* se analizó también la región cromosómica contigua al gen que codifica *SdOTasa* en las especies ensayadas. En la **Figura 47** se observa que los genomas comparten una organización genética similar alrededor del gen que la codifica, apoyando la hipótesis de que se trata de la misma proteína en todos los casos. El BLAST realizado contra el genoma de la especie *S. endophytica* no encontró proteínas con alta identidad de secuencia. No obstante, se identificaron

los genes conservados alrededor del gen *sdotasa* y se comprobó que en esta localización no aparece ningún gen que codifique una proteína similar anotada como “amidohidrolasa” o alguna denominación equivalente, lo que justificaría la incapacidad de *S. endophytica* para degradar OTA. A falta de la comprobación por PCR, el análisis *in silico* indica que, al menos en las especies analizadas, el fenotipo de hidrólisis de OTA parece estar asociado con la presencia del gen *sdotasa*. La organización genética contigua al gen que codifica *SdOTasa* en *S. dokdonensis* aparece detallada en la **Tabla 32**.

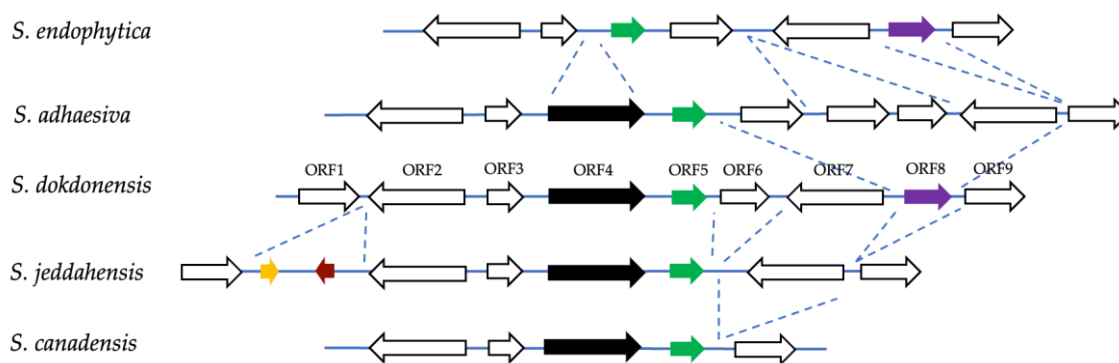


Figura 47. Organización genética de la región cromosómica contigua al gen que codifica *SdOTasa* en especies del género *Sphingomonas*. Se incluyen *S. endophytica* (NZ_JACIJN010000006.1), *S. adhaesiva* (NZ_NWVC01000003.1), *S. dokdonensis* (NZ_NBBI01000002.1), *S. jeddahensis* (NZ_MPSB01000003.1) y *S. canadensis* (JAPDRA010000006). Las flechas indican los genes. Los genes que codifican proteínas similares a *SdOTasa* están representados por flechas negras.

Tabla 32. Organización genética de la región cromosómica contigua a *SdOTasa* en *S. dokdonensis* (NZ_NBBI01000002.1).

ORF	Locus/gen	Cadena	aa	Anotación	Número de acceso
ORF1	SPDO_RS06785	+	203	Fosfatasa familia HAD	WP_088367022.1
ORF2	<i>pyk</i>	-	484	Piruvato quinasa	WP_088366707.1
ORF3	SPDO_RS06795	+	97	Proteína con dominio DUF1244	WP_088367023.1
ORF4	SPDO_RS06800	+	440	Amidohidrolasa	WP_088366708.1
ORF5	SPDO_RS06805	+	88	Proteína con dominio DUF2312	WP_076743623.1
ORF6	SPDO_RS06810	+	140	Proteína hipotética	WP_088366709.1
ORF7	SPDO_RS06815	-	485	Proteína de unión a ATP	WP_088366710.1
ORF8	SPDO_RS06820	+	178	Proteína con dominio DUF1003	WP_088367024.1
ORF9	SPDO_RS06825	+	247	Regulador transcripcional de unión a ADN familia <i>YebC/PmpR</i>	WP_088366711.1

4.6 Género *Rhizorhabdus*

El género *Rhizorhabdus* se encuentra dentro de las α -proteobacterias y pertenece a la familia *Sphingomonadaceae*. Francis y colaboradores en 2014 propusieron la creación de este género, ya que consideraron que el género *Sphingomonas* englobaba microorganismos con características demasiado diversas, haciendo necesaria una nueva clasificación. Estos investigadores aislaron microorganismos Gram-negativos y quimioheterótrofos a partir de raíces de lechuga, de cardo mariano y de suelo, que resultaron ser similares a los miembros de los géneros *Rhizorhopsis* y *Sphingomonas* (Francis et al., 2014). En este mismo trabajo, se propuso la reclasificación taxonómica de dichos microorganismos y la creación del nuevo género *Rhizorhabdus*. En la actualidad, dentro de *Rhizorhabdus*, la LPSN recoge 6 especies, de las cuáles sólo 4 poseen las secuencias de sus genomas depositados en la base de datos del NCBI.

El estudio *in silico* realizado en este trabajo para localizar proteínas potencialmente transformadoras de OTA identificó una proteína perteneciente a *Sphingomonas wittichii* DSM 6014^T (Apartado 1 de Resultados y discusión), que presenta un grado de identidad del 30,59% con la ocratoxinas de *A. niger* UVK143. Dicha cepa se adquirió y se clonó el gen que codifica la proteína candidata. En 2020, Hördt y colaboradores publicaron un estudio en el que revisaron la taxonomía dentro de las α -proteobacterias y propusieron la reclasificación de numerosas especies, entre las que se incluía *S. wittichii*, que pasó a denominarse *Rhizorhabdus wittichii* (Hördt et al., 2020). Esta nueva denominación fue aceptada, de tal modo que la DSMZ renombró a la cepa DSM 6014^T como *R. wittichii*. Las clasificaciones taxonómicas son un campo en continua revisión y sujeto a modificaciones permanentes. Este hecho resalta la importancia de utilizar cepas de colección en estudios como el desarrollado en este trabajo.

En el caso de *Rhizorhabdus*, en el momento de realizar este trabajo, la DSMZ tenía disponibles las cepas tipo de las especies: *R. argentea* DSM 100912^T, *R. wittichii* DSM 6014^T y *R. dicambivorans* DSM 107650^T. De igual forma al estudio realizado en los otros géneros, se adquirieron dichas cepas y se incubaron en presencia de OTA durante siete días. Tras la incubación, se observó la desaparición de la micotoxina del sobrenadante de los cultivos y la acumulación de OT α en los cultivos de *R. wittichii* DSM 6014^T y *R. dicambivorans* DSM 107650^T (**Figura 48**). En ambos casos, la ausencia de OTA tras el lavado de las células con metanol descartó la adsorción como mecanismo de reducción de la micotoxina. Estos resultados indican que la capacidad de degradar OTA no es un fenotipo común a todas las especies del género *Rhizorhabdus*, ya que *R. argentea* DSM 100912^T no posee dicha capacidad.

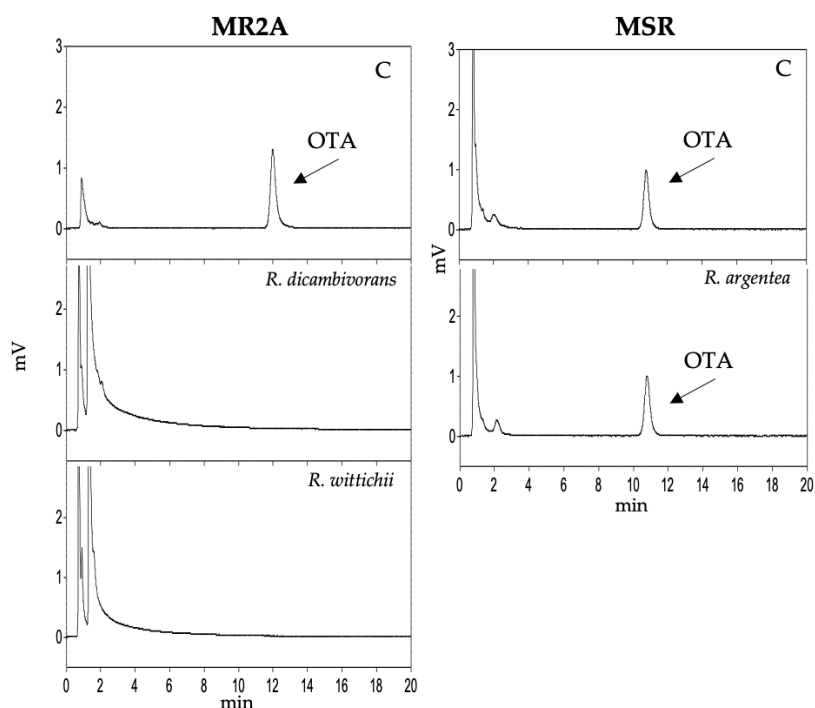


Figura 48. Degradación de OTA por cepas del género *Rhizorhabdus*. Las cepas analizadas fueron *R. argentea* DSM 100912^T, *R. dicambivorans* DSM 107650^T y *R. wittichii* DSM 6014^T. Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente (MR2A o MSR) durante siete días en presencia de OTA (2 µg/ml), y el sobrenadante se analizó por HPLC. Se indican con (C) los controles (medio de cultivo con OTA no inoculado).

En el caso de *Rhizorhabdus*, en la bibliografía no se ha descrito ninguna enzima con capacidad degradadora de OTA, por lo que la enzima descrita en este estudio (*RwOTasa*) constituye la primera descripción de una proteína con capacidad para degradar OTA en este género. Para comprobar la hipótesis de que esta enzima es la responsable del fenotipo degradador de OTA de las bacterias que la poseen, se analizó la presencia del gen que la codifica en las distintas especies de *Rhizorhabdus*. Se seleccionaron proteínas similares a *RwOTasa* (**Tabla 33**) para realizar alineamientos y poder encontrar motivos conservados (**Anexo V**). La especie *R. argentea* no aparece ya que la secuencia de su genoma no está depositada en la base de datos del NCBI. Para este género, debido al reducido número de cepas disponibles en la DSMZ, en el estudio *in silico* se han incluido dos especies que no se han ensayado pero cuyos genomas sí están disponibles en el NCBI, estas son *R. phycosphaerae* y *R. histidinilytica*. Cabe señalar que, al contrario que lo que ocurre en los géneros anteriormente estudiados, la identidad entre estas proteínas no es muy alta (**Tabla 33**). Tan sólo entre las proteínas de *R. wittichii* y *R. histidinilytica* el porcentaje de identidad supera un 90%, mientras que con *R. dicambivorans* es de un 53%. A pesar de la menor identidad entre las proteínas, se pudieron identificar motivos conservados. A partir de dos de estos motivos se diseñaron los oligonucleótidos 2186 y 2187 que codifican los motivos conservados GFTSVRD y KIAFGTD, respectivamente, y que amplifican un

fragmento interno de 663 pb del gen de la *RwOTasa* (Tabla 8). El ADN cromosómico de las cepas incluidas en el estudio se empleó como molde para llevar a cabo una reacción de PCR con dichos oligonucleótidos. Al igual que en el caso de las cepas del género *Sphingomonas*, a pesar de realizar numerosos intentos variando las condiciones de las reacciones de PCR, no se obtuvo ningún producto de amplificación. El hecho de que entre los géneros analizados en esta tesis, sólo se haya tenido problemas en la amplificación de los genes de las cepas de *Rhizorhabdus* y *Sphingomonas*, muy relacionados filogenéticamente ya que ambos géneros pertenecen a la familia *Sphingomonadaceae*, podría indicar que o bien el ADN de estos géneros posee características que lo hacen más resistente a la amplificación o bien que poseen un metabolito común que pueda estar acompañando al ADN cromosómico durante su purificación e inhiba la ADN polimerasa dificultando por tanto la amplificación.

Tabla 33. Proteínas similares a *RwOTasa* en el género *Rhizorhabdus*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>R. wittichii</i>	WP_029994416.1	100 / 100
<i>R. dicambivorans</i>	WP_066965089.1	53,23 / 59,75
<i>R. histidinilytica</i>	WP_079647352.1	97,26 / 94,61
<i>R. phycosphaerae</i>	WP_165325230.1	59,18 / 65,94

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Se estudió la región cromosómica que rodea al gen que codifica *RwOTasa* en las especies estudiadas (Figura 49). En todas las especies cuyo genoma está disponible se encontraron proteínas equivalentes a *RwOTasa* (Tabla 33). Como se muestra en la Figura 49, *R. wittichii* y *R. histidinilytica* presentan una organización genética muy conservada. Ambas especies presentan dos genes que codifican proteínas de la familia de las fumarilacetoacetato hidrolasas en la región *downstream* (ORF6 y ORF7); *upstream*, aparece un gen que codifica un receptor TonB (ORF4), precedido de dos genes que codifican dos hidrolasas (ORF2 y ORF3) (Tabla 34). En el caso de *R. phycosphaerae*, el único gen que aparece conservado es el que codifica el receptor TonB. En el caso de la organización genética de la amidohidrolasa en *R. dicambivorans*, esta no se encuentra conservada. La presencia de una amidohidrolasa similar a *RwOTasa* en las cepas analizadas únicamente *in silico* podría sugerir que también poseen capacidad hidrolizadora de OTA. Hubiera resultado interesante disponer del genoma de *R. argentea* para determinar si esta especie posee una proteína equivalente a *RwOTasa* o si, por el contrario, carece de ella; con el fin de obtener una evidencia indirecta de la posible relación de la presencia de esta proteína con el fenotipo degradador de OTA. Asimismo, el no haber podido obtener resultados de la PCR realizada con oligonucleótidos degenerados ha impedido dar respuesta a esta cuestión por el momento.

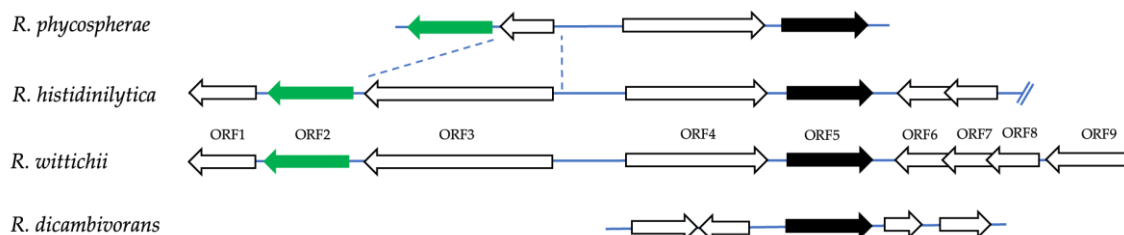


Figura 49. Organización genética de la región cromosómica contigua al gen que codifica *RwOTasa* en especies del género *Rhizorhabdus*. Se incluyen *R. phycosphaerae* (NZ_CP049107.1), *R. histidinilytica* (NZ_FUYM0100002.1), *R. wittichii* (NZ_CP059319.1) y *R. dicambivorans* (NZ_CP023449.1). Las flechas indican los genes. Los genes que codifican proteínas similares a *RwOTasa* están representados por flechas negras.

Tabla 34. Organización genética de la región cromosómica contigua a *RwOTasa* en *R. wittichii* (NZ_CP059319.1).

ORF	Locus/gen	Cadena	aa	Anotación	Número de acceso
ORF1	HRJ34_RS07195	-	386	Dipeptidasa de membrana	WP_208633711.1
ORF2	HRJ34_RS07190	-	521	Metalohidrolasa familia M20/M25/M40	WP_030092246.1
ORF3	HRJ34_RS07185	-	911	Carboxipeptidasa familia M14	WP_226949087.1
ORF4	HRJ34_RS07180	+	756	Receptor dependiente de TonB	WP_226949086.1
ORF5	HRJ34_RS07175	+	438	Amidohidrolasa	WP_029994416.1
ORF6	HRJ34_RS07170	-	259	Proteína familia fumarilacetoacetato hidrolasa	WP_030092242.1
ORF7	HRJ34_RS07165	-	277	Proteína familia fumarilacetoacetato hidrolasa	WP_208633709.1
ORF8	HRJ34_RS07160	-	253	Alfa/beta hidrolasa	WP_208633708.1
ORF9	HRJ34_RS07155	-	514	Proteína oxidante de alfa-hidroxi-ácidos	WP_226949085.1

4.7 Género *Stenotrophomonas*

El género *Stenotrophomonas* pertenece a la clase de las γ -proteobacterias (Palleroni & Bradbury, 1993). Se trata de un género muy heterogéneo formado por bacterias Gram-negativas, aerobias y con una gran versatilidad metabólica. Sus miembros se distribuyen de forma ubicua en el ambiente, aunque sus principales reservorios son las plantas y el suelo. Los miembros de este género desempeñan un papel ecológico importante en los ciclos del nitrógeno y del azufre. Además, varias especies de *Stenotrophomonas* participan en interacciones beneficiosas con las plantas, por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento con *Stenotrophomonas* spp. puede dar lugar a un mayor crecimiento de las plantas e influir en su desarrollo en suelos marginales (Ryan et al., 2009). Estas propiedades se deben a su alta adaptabilidad a entornos hostiles y limitados en nutrientes. Asimismo, su capacidad para metabolizar una gran variedad de

compuestos orgánicos presentes en la rizosfera convierte a estas bacterias, como en el caso de los otros géneros estudiados en esta tesis, en buenas candidatas para su uso en biorremediación (Lee et al., 2002; Juhasz et al., 2000). Según la LPSN, el género comprende 29 especies actualmente (www.bacterio.net).

Schatzmayr y colaboradores (2002, 2006) describieron por primera vez la capacidad de hidrolizar OTA de la cepa *S. nitritireducens* 041-9 (posteriormente DSM 14168) y de otras dos cepas de este mismo género, 041-10 (posteriormente DSM 14169) y 043-1a, en las que no se determinó la especie a la que pertenecían. La cepa *Stenotrophomonas* sp. DSM 14169 se adquirió para este estudio (Schatzmayr et al., 2012), sin embargo, el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de esta cepa la identificó taxonómicamente como perteneciente a la especie *Pseudoxanthomonas indica*, género filogenéticamente cercano a *Stenotrophomonas* (Lee et al., 2008) (Apartado 1 de Resultados y discusión). Posteriormente, se describió la capacidad de degradar OTA de otras dos nuevas cepas de *S. nitritireducens* (DSM 17575 y DSM 17576) (Schatzmayr et al., 2012). Asimismo, durante el desarrollo de esta tesis, Luo y colaboradores (2022) describieron la capacidad de hidrolizar OTA de la cepa *Stenotrophomonas* sp. CW117. Esta cepa se aisló de suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos y cabe destacar su versatilidad, ya que previamente fue descrita como degradadora de la micotoxina AFB1 por estos mismos investigadores (Cai et al., 2020).

Para el estudio de este género, se adquirieron las cepas tipo de siete especies de entre las disponibles en la DSMZ: *S. nitritireducens* DSM 12575^T, *S. acidaminiphila* DSM 13117^T, *S. bentonitica* DSM 103927^T, *S. indicatrix* DSM 28278^T, *S. chelatiphaga* DSM 21508^T, *S. pictorum* DSM 19282^T y *S. terrae* DSM 18941^T. El cultivo de las cepas durante siete días en presencia de OTA reveló que únicamente *S. nitritireducens* y *S. acidaminiphila* fueron capaces de eliminar la micotoxina del medio, dando lugar a la acumulación de OT α (Figura 50). Estos resultados indican que la hidrólisis de OTA no es una característica presente en todas las especies de este género. Tras el lavado de las células sedimentadas no se observó incremento de OTA, por lo que se descartó que estuviese implicado un mecanismo de adsorción a las paredes celulares como medio de destoxificación.

Tal y como se ha señalado previamente, en un estudio publicado durante la realización de esta tesis, Luo y colaboradores (2022) describieron la capacidad de degradación de OTA de la cepa *Stenotrophomonas* sp. CW117 y, además, describieron en esta cepa una hidrolasa eficiente en la transformación de OTA, a la que denominaron ADH3, cuyo gen clonaron y expresaron heterológamente. Posteriormente, también identificaron en esta misma cepa una N-acil-L-aminoácido amidohidrolasa (NA) capaz de degradar OTA (Chen et al., 2022). Estos investigadores describen la proteína NA como una isoenzima de ADH3,

pero que, sin embargo, es 29.113 veces menos activa que ADH3 en la degradación de OTA. Los investigadores concluyeron que ADH3 es la enzima con mayor capacidad de destoxificación de OTA en la cepa CW117 (Chen et al., 2022). Además, en este mismo estudio, construyeron un mutante de la cepa CW117 deficiente en NA. Dicho mutante mostró una reducción significativa de la capacidad de degradar OTA en las primeras 6 h de cultivo. Por ello, sugirieron que las dos enzimas podrían tener un efecto interactivo en la transformación de OTA. También estudiaron la expresión de este gen y los niveles de proteína mediante PCR a tiempo real y *western blot*, respectivamente. Los resultados mostraron que el mutante deficiente en NA y la cepa silvestre presentaban niveles de expresión de ADH3 similares; sin embargo, la deficiencia de NA disminuía el nivel de proteína ADH3 *in vivo*. Además, el análisis fisiológico mostró que la delección de *na* no produjo ningún defecto en el crecimiento de la cepa. Por lo que la reducción en la capacidad de degradación del mutante no se puede atribuir a cambios fisiológicos en la cepa. Por todo ello, propusieron que la isoenzima NA incrementa la estabilidad de ADH3 *in vivo*, a pesar de que no se trata de una hidrolasa relevante en la hidrólisis de OTA (Chen et al., 2022).

Recientemente, Gonaus y colaboradores (2023), en la cepa *Stenotrophomonas* sp. 043-1a, describieron una enzima degradadora de OTA un 98,8% idéntica a ADH3 de *Stenotrophomonas* sp. CW117. Además, en este mismo estudio y en esta misma cepa (043-1a), describieron otra proteína con capacidad de degradar OTA perteneciente a la familia de peptidasas S9, lo que constituye la primera enzima de esta familia descrita con capacidad para degradar OTA (Gonaus et al., 2023).

En el estudio *in silico* realizado en esta tesis, se identificaron dos proteínas en la cepa *S. nitritireducens* DSM 12575^T con potencial para degradar OTA (Apartado 1 de Resultados y discusión). Al evaluar su actividad sobre la micotoxina, se observó que *SnOTasa* (enzima similar a ADH3 y con una identidad del 30,57% frente a *AnOTasa*) es capaz de transformar OTA, mientras que *SnAH* (enzima similar a NA y con una identidad del 39,49% frente a *AfOTasa*) presenta una actividad reducida, ya que en el mismo tiempo de incubación es incapaz de degradar por completo la micotoxina (**Figura 11**). Al realizar un alineamiento de secuencia con las proteínas de la cepa *Stenotrophomonas* sp. CW117 descritas en la literatura, se comprobó que *SnOTasa* y ADH3 poseen un 90,87% de identidad de secuencia y *SnAH* y NA poseen un 93,38% de identidad. De este modo, los resultados descritos en esta tesis coinciden con los obtenidos por Luo y colaboradores (2022), siendo la actividad de la enzima similar a ADH3 (*SnOTasa*) superior a la presentada por la enzima similar a NA (*SnAH*).

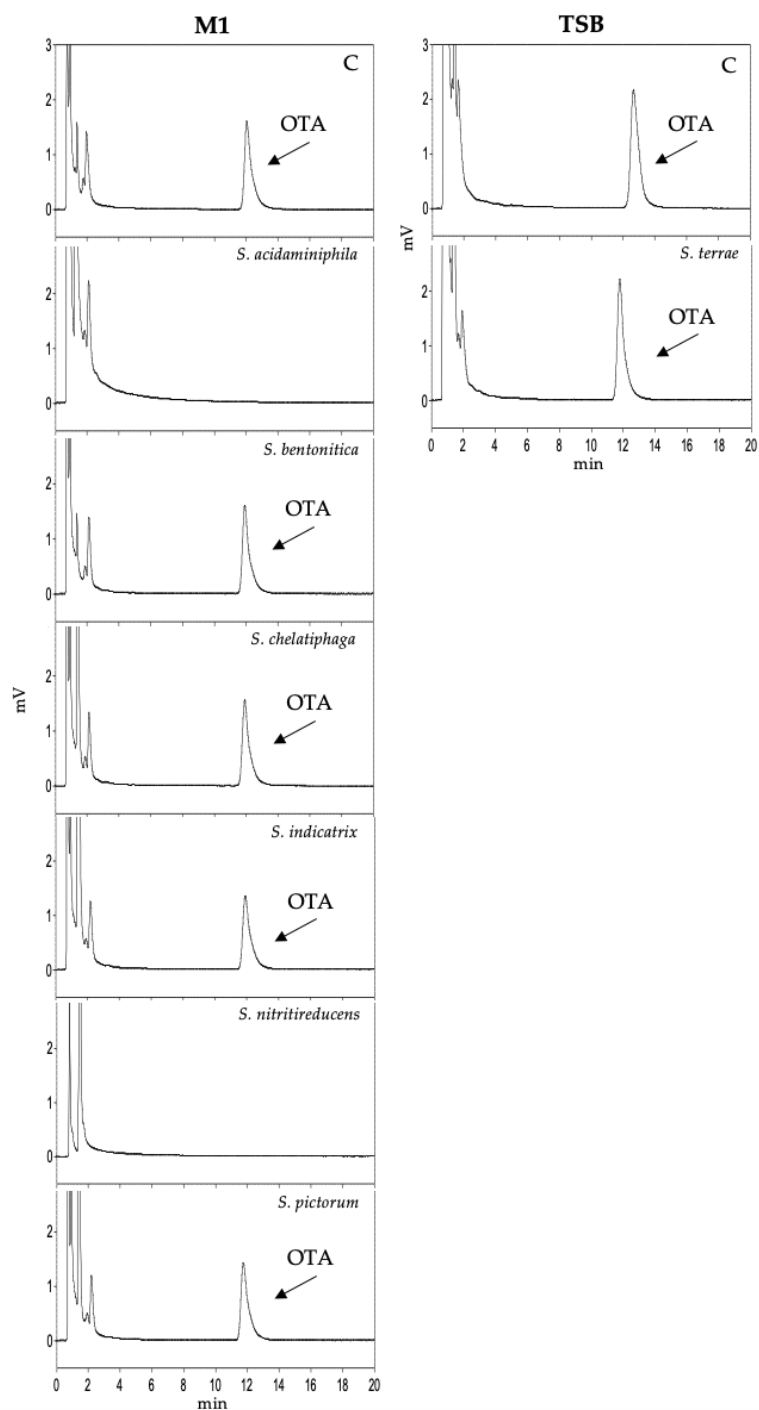


Figura 50. Degradación de OTA por cepas del género *Stenotrophomonas*. Las cepas analizadas fueron *S. acidaminiphila* DSM 13117^T, *S. bentonitica* DSM 103927^T, *S. chelatiphaga* DSM 21508^T, *S. indicatrix* DSM 28278^T, *S. nitritireducens* DSM 12575^T, *S. pictorum* DSM 19282^T y *S. terrae* DSM 18941^T. Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente (M1 o TSB) durante siete días en presencia de OTA (2 µg/ml), y el sobrenadante se analizó por HPLC. Se indican con (C) los controles (medio de cultivo con OTA no inoculado).

Con el fin de verificar que *SnOTasa* es la principal responsable de la capacidad de degradación de OTA en el género *Stenotrophomonas*, se analizó la presencia de los genes que codifican *SnAH* y *SnOTasa* en las cepas ensayadas en este estudio.

Con este objetivo, se identificaron las proteínas similares presentes en estas especies y se realizaron alineamientos para encontrar motivos conservados (**Tabla 35** y **Tabla 36**) (**Anexo V**). A partir de dos motivos conservados, se diseñaron los oligonucleótidos 2158 (motivo ACGHDAH) y 2159 (motivo GNPATVN) que amplifican un fragmento interno de 630 pb del gen que codifica *SnAH*, y los oligonucleótidos 2160 (motivo AVGYAEK) y 2161 (motivo MVEAGI), que amplifican un fragmento interno de 768 pb del gen que codifica *SnOTasa* (**Tabla 8**).

Tabla 35. Proteínas similares a *SnAH* en el género *Stenotrophomonas*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>S. nitritireducens</i>	WP_200911391.1	100 / 100
<i>S. acidaminiphila</i>	WP_182335938.1	93,15 / 93,09
<i>S. bentonitica</i>	WP_070208528.1	84,44 / 83,26
<i>S. indicatrix</i>	WP_025874644.1	84,63 / 83,30
<i>S. chelatiphaga</i>	WP_057509267.1	82,84 / 83,18
<i>S. pictorum</i>	WP_057506254.1	92,47 / 88,15
<i>S. terrae</i>	WP_057628017.1	90,64 / 86,33

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Tabla 36. Proteínas similares a *SnOTasa* en el género *Stenotrophomonas*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>S. nitritireducens</i>	WP_152984101.1	100 / 100
<i>S. acidaminiphila</i>	WP_182334784.1	90,87 / 90,89

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

El ADN cromosómico de las cepas incluidas en el estudio se empleó como molde para llevar a cabo una reacción de PCR con dichos oligonucleótidos. En la **Figura 51A**, se observa que todas las cepas analizadas amplifican el gen que codifica *SnAH*, mientras que únicamente *S. nitritireducens* y *S. acidaminiphila* amplifican el gen que codifica *SnOTasa* (**Figura 51B**). En consecuencia, los resultados indican que para degradar OTA se necesita la presencia de *SnOTasa*, mientras que por sí sola, *SnAH* no confiere esta capacidad a las cepas que la poseen. Asimismo, se analizó *in silico* la presencia de la peptidasa S9 descrita por Gonaus y colaboradores como degradadora de OTA (Gonaus et al., 2023). El gen que codifica dicha proteína se encontró en todas las cepas ensayadas, independientemente de su capacidad para degradar OTA (**Tabla 37**). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la enzima *SnOTasa* es la principal responsable de la capacidad para degradar OTA de las cepas del género *Stenotrophomonas*.

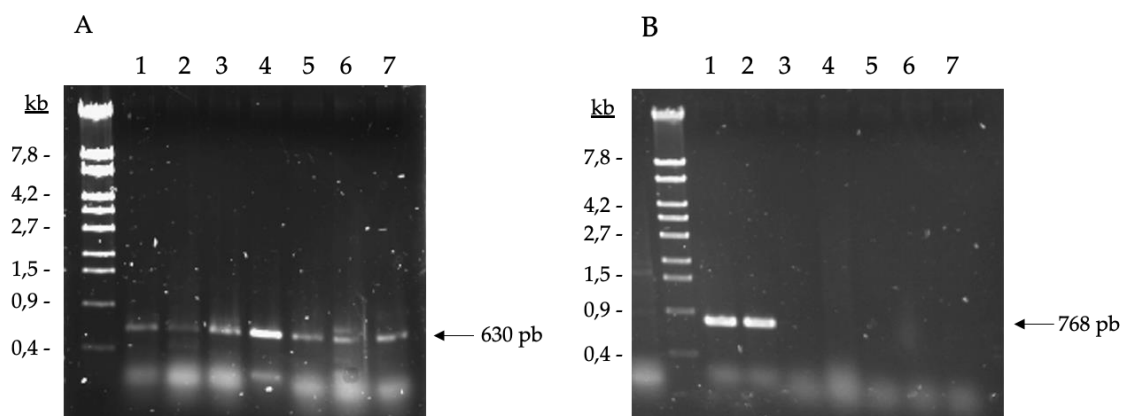


Figura 51. Detección de los genes que codifican *SnAH* (A) y *SnOTasa* (B) en cepas del género *Stenotrophomonas*. Las cepas analizadas fueron *S. nitritireducens* DSM 12575^T (carril 1), *S. acidaminiphila* DSM 13117^T (carril 2), *S. bentonitica* DSM 103927^T (carril 3), *S. indicatrix* DSM 28278^T (carril 4), *S. chelatiphaga* DSM 21508^T (carril 5), *S. pictorum* DSM 19282^T (carril 6) y *S. terrae* DSM 18941^T (carril 7). Los productos de PCR obtenidos con las parejas de oligonucleótidos 2158 y 2159 (*SnAH*) y 2160 y 2161 (*SnOTasa*) se sometieron a electroforesis en gel. El marcador de tamaño molecular *EcoT14I* (Takara, Japón) aparece en el carril izquierdo. Los números indican algunos de los tamaños moleculares.

Tabla 37. Proteínas similares a la peptidasa S9 en el género *Stenotrophomonas*.

Especie	Código	Identidad (aa/nt) ^a (%)
<i>S. nitritireducens</i>	WP_057505203.1	100/100
<i>S. acidaminiphila</i>	WP_225546641.1	93,29/91,92
<i>S. bentonitica</i>	WP_070208733.1	70,46/75,99
<i>S. indicatrix</i>	WP_099782868.1	71,98/75,51
<i>S. chelatiphaga</i>	WP_057507830.1	71,07/76,74
<i>S. pictorum</i>	WP_057506080.1	82,16/84,04
<i>S. terrae</i>	WP_057627523.1	81,85/82,97

^a aa, aminoácido; nt, nucleótido

Se analizó también la organización genética de las regiones en las que se localizan los genes que codifican las enzimas clonadas en este estudio, *SnAH* y *SnOTasa*. La organización genética está muy conservada alrededor de estos genes. Como se muestra en la **Figura 52A**, todos los genomas de las cepas ensayadas contienen *SnAH*, lo que corrobora el resultado observado en la PCR con los oligonucleótidos degenerados. La organización genética en torno al gen *snah* en *S. nitritireducens* aparece detallada en la **Tabla 38**. En el caso de *SnOTasa*, el gen que la codifica se encuentra en una localización conservada contigua a los locus *leuS-lptE-holA-nadD* (ORF4-ORF1) en la región *upstream*; *downstream*, se encuentra adyacente el gen que codifica la tiorredoxina A (*trxA*) (observable en la especie *S. acidaminiphila*) (**Figura 52B**). La organización genética en torno al gen que codifica *SnOTasa* en *S. nitritireducens* aparece detallada en la **Tabla 39**. Resulta interesante señalar la similitud hallada en la localización en el cromosoma de los genes *snotasa* en *Stenotrophomonas* y *lcotasa* en el género *Lysobacter*. Ambos genes que codifican la enzima degradadora de OTA se sitúan en una región *downstream* a *LeuS* y *upstream* a *TrxA*, lo que confirma la

proximidad filogenética de estos géneros, puesto que ambos pertenecen a la familia *Xanthomonadaceae* de γ -proteobacterias (Tabla 18).

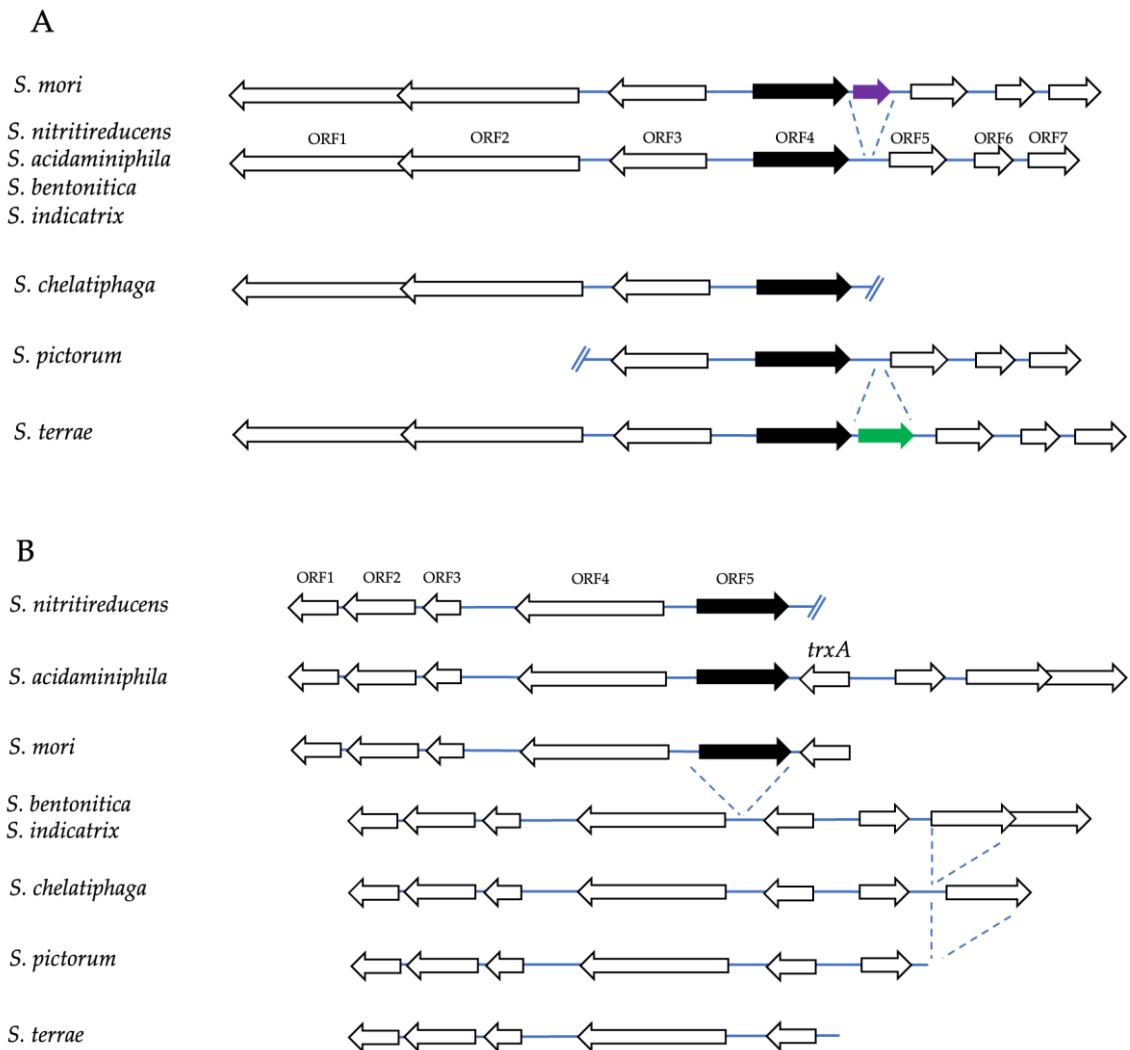


Figura 52. Organización genética de la región cromosómica contigua a los genes que codifican *SnAH* (A) y *SnOTasa* (B) en especies del género *Stenotrophomonas*. Se incluyen *S. nitritireducens* (NZ_LDJG01000005.1), *S. acidaminiphila* (NZ_CP043567.1), *S. mori* (NZ_JAIKTS010000004.1), *S. bentonitica* (NZ_JAAZUH010000001.1), *S. indicatrix* (NZ_CP037883.1), *S. chelatiphaga* (NZ_LDJK01000007.1), *S. pictorum* (NZ_LLXS01000029.1) y *S. terrae* (NZ_LDJJ01000023.1). Las flechas indican los genes. Los genes que codifican proteínas similares a *SnAH* y *SnOTasa* están representados por flechas negras.

Este estudio revela que el gen *snotasa* sólo aparece en dos de las siete especies ensayadas (*S. nitritireducens* y *S. acidaminiphila*), coincidiendo con la capacidad de estas especies para degradar OTA. Por este motivo, se decidió realizar un BLAST frente a cada una de las especies de *Stenotrophomonas* con genomas depositados en el NCBI. Como resultado de este análisis, además de en *S. nitritireducens* y *S. acidaminiphila*, se encontró una proteína con un alto porcentaje de identidad de secuencia (91,65%) anotada como “amidohidrolasa” en la especie *S. mori* (incluida en la Figura 52).

S. nitritireducens y *S. acidaminiphila* son especies filogenéticamente cercanas. El análisis filogenético de siete genes *housekeeping* entre cepas tipo de 12 especies de *Stenotrophomonas*, reveló que *S. nitritireducens* es la especie más cercana a *S. acidaminiphila* (Huang et al., 2018). Asimismo, un árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S mostró que *S. nitritireducens* se agrupa en una rama con *S. acidaminiphila* con un valor de *bootstrap* del 99% (Zhang et al., 2022c). Por otra parte, un análisis filogenético del genoma completo de la cepa tipo de *S. mori* CPCC101365^T reveló que ésta forma un clúster con las cepas tipo de las especies *S. nitritireducens* y *S. acidaminiphila* (Deng et al., 2022). La gran variabilidad del pangenoma de las cepas del género *Stenotrophomonas* puede explicar que el gen que codifica *SnOTasa* sólo se encuentre en 3 de las 26 especies de este género con genomas disponibles en el NCBI. En un estudio realizado con los genomas de cepas tipo de 19 especies del género *Stenotrophomonas*, se encontró que sólo el 36,5% del pangenoma formaba el genoma central (*core*), siendo la proporción de genes únicos alrededor del 44,9%; este pangenoma abierto sugiere que el género *Stenotrophomonas* ha experimentado un considerable intercambio de genes, probablemente por transferencia horizontal, para ampliar sus perfiles funcionales (Deng et al., 2022).

Tabla 38. Organización genética de la región cromosómica del gen que codifica *SnAH* en *S. nitritireducens* (NZ_LDJG01000005.1).

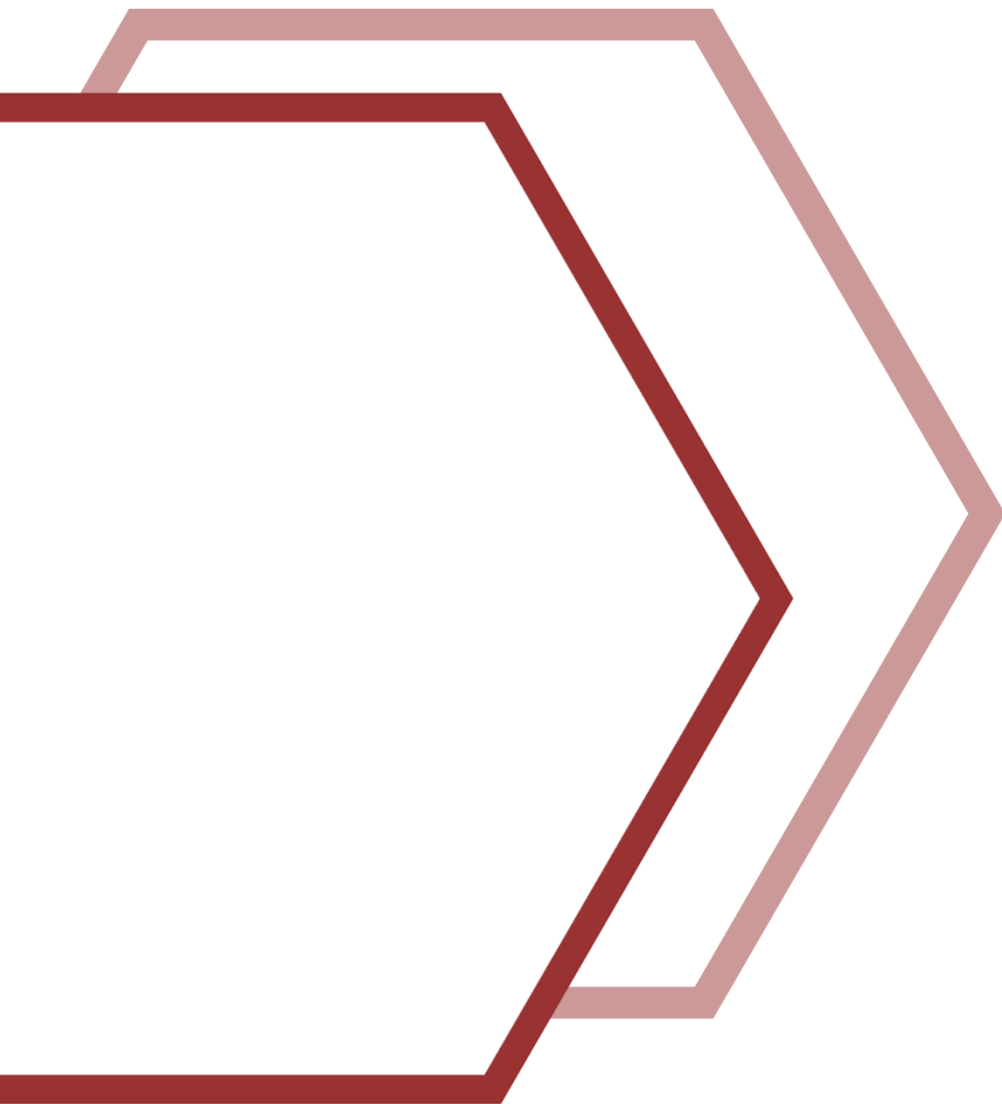
ORF	Locus/gen	Cadena	aa	Anotación	Número de acceso
ORF1	ABB22_RS04630	-	1040	Subunidad permeasa transportadora RND	WP_055771029.1
ORF2	ABB22_RS04625	-	1078	Subunidad permeasa transportadora RND	WP_055770845.1
ORF3	ABB22_RS04620	-	417	Subunidad adaptadora de transporte periplásmico RND	WP_05770843.1
ORF4	ABB22_RS04615	+	443	Amidohidrolasa	WP_200911391.1
ORF5	<i>queF</i>	+	270	7-ciano-7-deazaguanina reductasa dependiente de NADPH QueF	WP_055770837.1
ORF6	ABB22_RS04605	+	99	Proteína con dominio de unión a peptidoglicano LysM	WP_055770834.1
ORF7	ABB22_RS04600	+	158	Proteína hipotética	WP_055770830.1

Tabla 39. Organización genética de la región cromosómica del gen que codifica *SnOTasa* en *S. nitritireducens* (NZ_LDJG010000013.1).

ORF	Locus/gen	Cadena	aas	Anotación	Número de acceso
ORF1	<i>nadD</i>	-	236	Nicotinato-nucleótido adenililtransferasa	WP_055764649.1
ORF2	<i>holA</i>	-	347	Subunidad delta ADN polimerasa III	WP_055764647.1
ORF3	<i>lptE</i>	-	181	Proteína hipotética (LptE)	WP_057505197.1
ORF4	<i>leuS</i>	-	880	Leucín-tRNA ligasa	WP_055764643.1
ORF5	ABB22_RS09255	+	427	Amidohidrolasa	WP_152984101.1

En esta tesis se ha descrito la capacidad de degradar OTA de diferentes especies dentro de los géneros bacterianos *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Cupriavidus*, *Lysobacter*, *Rhizorhabdus*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*. En todos los géneros estudiados se han encontrado especies que no poseen fenotipo degradador de OTA, por lo que no se trata de una característica común entre las especies de ninguno de ellos. Los géneros estudiados pertenecen a grupos taxonómicos muy variados. La identificación de proteínas con actividad sobre esta micotoxina en diversas especies que no han sido aisladas de ambientes en los que la OTA se encuentra presente – excepto en el caso de *AnOTasa* – sugiere que OTA no es el sustrato natural de dichas enzimas. Hasta la fecha, las enzimas descritas con esta capacidad son peptidasas generalmente inespecíficas, capaces de hidrolizar enlaces peptídicos que poseen en su extremo C-terminal residuos hidrofóbicos neutros. Este tipo de enzimas resultan de utilidad para la adaptación a diferentes hábitats donde la disponibilidad de aminoácidos es reducida. Las bacterias estudiadas tienen en común la pertenencia a géneros con una amplia flexibilidad metabólica, lo que les confiere la capacidad de adaptación a dicho tipo de hábitats.

V. Conclusiones



1. En la actualidad, las enzimas descritas en la literatura científica con actividad eficiente sobre OTA pertenecen a las familias M20 (M20D) y M38 de peptidasas, según la base de datos *MEROPS*. Los miembros de estas familias son metaloproteínas que poseen como rasgo común la presencia de un centro catalítico binuclear metálico.

2. La búsqueda de proteínas similares a las descritas en la literatura con actividad eficiente sobre OTA ha dado lugar a la identificación de dos proteínas pertenecientes a la familia de peptidasas M20 (M20D) y a seis proteínas de la familia M38. De entre las ocho proteínas seleccionadas, siete de ellas mostraron actividad degradadora de OTA mediante la hidrólisis de su enlace amida.

3. Entre las proteínas M20D identificadas con capacidad para degradar OTA, la enzima *SnAH* presenta una actividad reducida sobre la micotoxina, mientras que *CnOTasa* es capaz de eliminarla por completo. Las proteínas identificadas de la familia M38 presentan actividad eficiente sobre OTA. Sin embargo, la pertenencia a esta familia no es condición suficiente para mostrar dicha actividad, como revela el caso de la proteína *Cnp*, incapaz de degradar OTA.

4. Los alineamientos múltiples de secuencia aportan información relevante sobre la especificidad de sustrato de estas proteínas, habiéndose confirmado la actividad prolidasa de la enzima *Cnp* a partir de su similitud de secuencia con enzimas descritas como prolidasas. Por ello, un mayor conocimiento de la función de los residuos implicados en la especificidad de sustrato podría mejorar la capacidad de discriminación de este método de búsqueda.

5. El estudio de especificidad de sustrato de estas enzimas revela que existe diversidad en sus perfiles hidrolíticos, encontrando enzimas más específicas, como *AnOTasa*, y otras con actividad sobre un amplio grupo de sustratos. Estos resultados manifiestan la importancia del estudio de la especificidad de sustrato de estas enzimas, siendo preferibles aquellas que muestran un espectro hidrolítico más reducido, con el fin de minimizar la hidrólisis de otros componentes de la matriz alimentaria.

6. La caracterización de las enzimas estudiadas muestra que presentan actividad óptima a valores de pH entre 6,5 y 7 y temperaturas elevadas (en torno a los 55 °C), además, en general se trata de enzimas termoestables, siendo *AnOTasa* la enzima más termoestable en las condiciones ensayadas. El estudio *in silico* de la posible alergenicidad de las proteínas identificadas revela que probablemente se trate de proteínas no alergénicas.

7. La enzima *PsSDO* muestra capacidad degradadora de OTA mediante la hidrólisis del enlace amida. Sin embargo, su actividad es inferior en comparación con la observada en el resto de las enzimas de este estudio, exceptuando *SnAH*. *PsSDO* está descrita como una dioxigenasa por lo que la actividad amidohidrolasa sobre OTA constituiría una actividad secundaria de la enzima.

8. En este trabajo se ha confirmado la capacidad degradadora de OTA de las cepas que poseen las enzimas identificadas. La relación existente entre el fenotipo degradador de OTA y la presencia de las enzimas identificadas indica que éstas son las responsables de dicha capacidad, al menos en las especies ensayadas.

9. Se ha demostrado que la capacidad de degradar OTA no es una característica propia de los géneros a los que pertenecen las especies bacterianas estudiadas, ya que en todos ellos se ha encontrado alguna especie que no presenta dicha actividad.

10. Se ha demostrado la capacidad de degradación de OTA de especies bacterianas pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, lo que resulta consistente con el hecho de que las enzimas descritas son peptidasas inespecíficas que son de utilidad para la adaptación de la bacteria a diferentes hábitats donde la disponibilidad de aminoácidos es reducida.

1. At present, the enzymes described in the scientific literature as efficient OTA degraders belong to the M20 (M20D) and M38 families of peptidases, according to the *MEROPS* database. Members of these families are metalloproteins that share as a common feature the presence of a binuclear catalytic center.

2. The search for proteins similar to those described in the literature as OTA degraders resulted in the identification of two proteins belonging to the M20 (M20D) peptidase family and six proteins from the M38 family. Among the eight selected proteins, all except one showed OTA degrading activity through the hydrolysis of its amide bond.

3. Among the identified M20D proteins, the enzyme *SnAH* shows reduced activity on the mycotoxin, while *CnOTase* can degrade it completely. As to the M38 family proteins, the identified enzymes show efficient activity on OTA. Nonetheless, belonging to this family is not a sufficient condition to display such activity, as revealed in the case of the enzyme *Cnp*, which is unable to degrade this mycotoxin.

4. Multiple sequence alignments provide relevant information on the substrate specificity of these proteins, since the prolidase activity of the enzyme *Cnp* has been confirmed based on its sequence similarity with enzymes described as prolidases. Thus, the increase of the knowledge of the function of the residues involved in substrate specificity could improve the discriminatory power of this method for searching new proteins.

5. The study of the substrate specificity of these enzymes reveals that they display diverse hydrolytic profiles. Some enzymes are more specific, such as *AnOTase*, while others show activity on a wider group of substrates. These results demonstrate the relevance of studying the substrate specificity of the enzymes, being preferable those that show a reduced hydrolytic spectrum, in order to minimize the hydrolysis of other components of the food matrix.

6. The characterization of the enzymes shows that these proteins display optimal activity at pH values between 6.5 and 7 and high temperatures (around 55 °C). In general, they are thermostable, being *AnOTase* the most thermostable enzyme under the conditions tested. The *in silico* study of the possible allergenicity of the identified proteins suggests that they are probably non-allergenic.

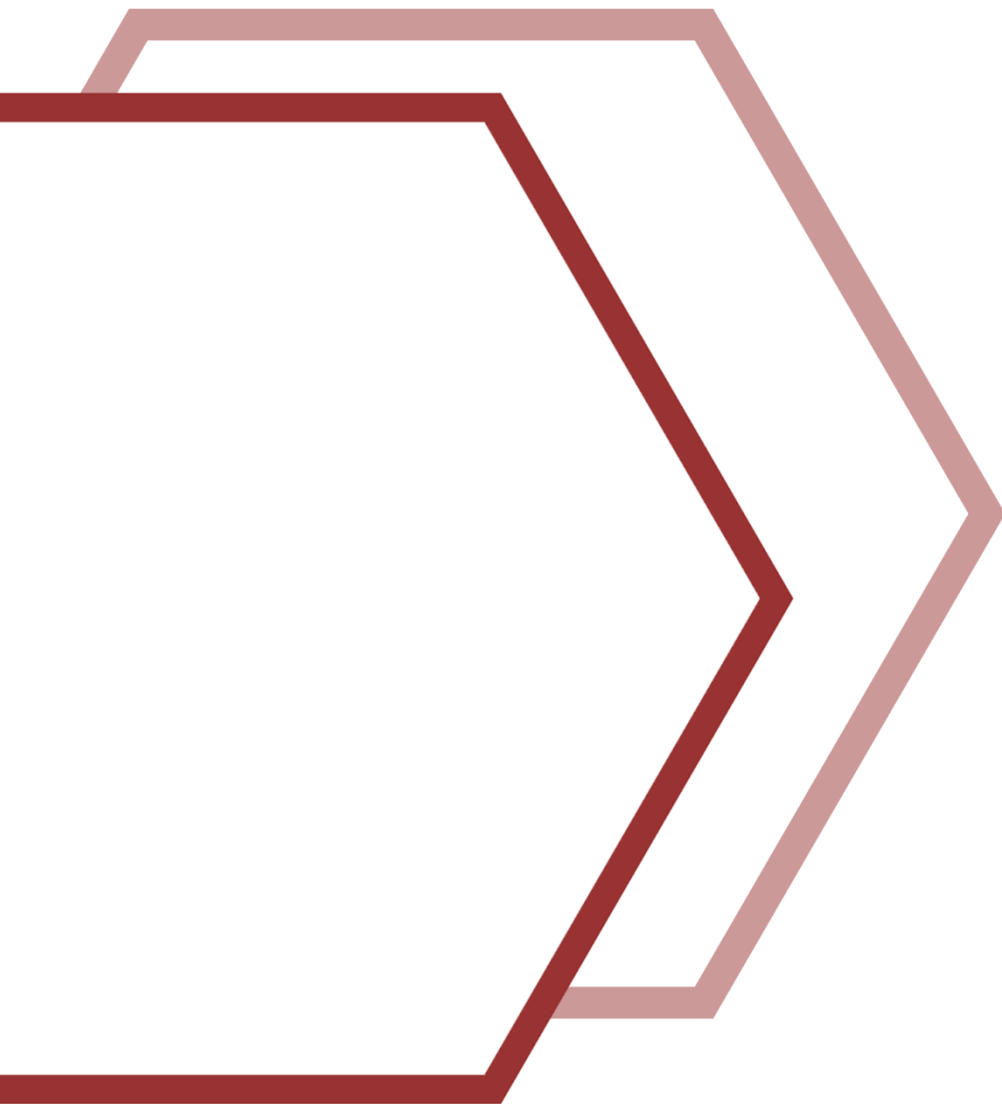
7. The enzyme *PsSDO* shows OTA degrading activity through the hydrolysis of the amide bond. However, its activity is lower compared to that observed for the other identified enzymes, except *SnAH*. *PsSDO* is described as a dioxygenase, so the amidohydrolase activity on OTA would constitute a secondary activity.

8. In this work, the OTA degrading capacity of the strains possessing the identified enzymes has been confirmed. The relationship between the OTA degrading phenotype and the presence of the enzymes identified indicates that these enzymes are responsible for this capacity, at least in the analyzed species.

9. It has been demonstrated that the capacity to degrade OTA is not a characteristic of the genera to which the studied bacterial species belong, since species that do not present this activity have been found in all the genera tested.

10. The OTA degrading capacity of bacterial species belonging to various taxonomic groups has been demonstrated. This is consistent with the fact that the enzymes described are non-specific peptidases that are useful for the bacterial adaptation to different natural habitats, where amino acids availability is reduced.

VI. Bibliografía



- Abedi, E., Mousavifard, M., & Hashemi, S. M. B. (2022). Ultrasound-assisted detoxification of ochratoxin A: comparative study of cell wall structure, hydrophobicity, and toxin binding capacity of single and co-culture lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 15(3), 539–560. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02767-7>
- Abrunhosa, L., Inês, A., Rodrigues, A. I., Guimarães, A., Pereira, V. L., Parpot, P., Mendes-Faia, A., & Venâncio, A. (2014). Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International Journal of Food Microbiology*, 188(2014), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.019>
- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., & Venâncio, A. (2010). Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, 2(5), 1078–1099. <https://doi.org/10.3390/toxins2051078>
- Abrunhosa, L., Santos, L., & Venâncio, A. (2006). Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology*, 20(3), 231–242. <https://doi.org/10.1080/08905430600904369>
- Abrunhosa, L., Serra, R., & Venâncio, A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7493–7496. <https://doi.org/10.1021/jf025747i>
- Adachi, K., Iwabuchi, T., Sano, H., & Harayama, S. (1999). Structure of the ring cleavage product of 1-hydroxy-2-naphthoate, an intermediate of the phenanthrene-degradative pathway of *Nocardioides* sp. strain KP7. *Journal of Bacteriology*, 181(3), 757–763. <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Adegoke, T. V., Yang, B., Xing, F., Tian, X., Wang, G., Tai, B., Si, P., Hussain, S., & Jahan, I. (2022). Microbial enzymes involved in the biotransformation of major mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 35–51. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06195>
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: prevention and detoxification in foods. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/doi.org/10.3390/foods9020137>
- Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Gould, S. M. Q., Roodveldt, C., & Tawfik, D. S. (2005). The “evolvability” of promiscuous protein functions. *Nature Genetics*, 37(1), 73–76. <https://doi.org/10.1038/ng1482>
- Alasmar, R., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Thani, R., Al-Shamary, N., Alnaimi, H., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2020). Isolation of a novel *Kluyveromyces marxianus* strain QKM-4 and evidence of its volatilome production and binding potentialities in the biocontrol of toxigenic fungi and their mycotoxins. *ACS Omega*, 5(28), 17637–17645. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02124>
- Albassam, M. A., Yong, S. I., Bhatnagar, R., & Sham, A. K. (1987). Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats. *Veterinary Pathology*, 24(5), 427–435. <https://doi.org/10.1177/030098588702400510>
- Al-Hawash, A. B., Zhang, X., & Ma, F. (2017). Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems. *Gene Reports*, 9, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.08.006>
- Al-nussairawi, M., Risa, A., Garai, E., Varga, E., Szabó, I., Csenki-Bakos, Z., Kriszt, B., & Cserhádi, M. (2020). Mycotoxin biodegradation ability of the *Cupriavidus* genus. *Current Microbiology*, 77, 2430–2440. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02063-7>

- Al-nussairawi, M. T. J. (2020). *Identification of genes responsible for ochratoxin A biodegradation by Cupriavidus basilensis ÓR16 and valuation of Cupriavidus genus for mycotoxins biodegradation potential*. Tesis doctoral. Szent István University.
- Altafini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Sonfack, G. M., Fedrizzi, G., & Caprai, E. (2021). Occurrence of ochratoxin A in different types of cheese offered for sale in Italy. *Toxins*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/toxins13080540>
- Alvarez, M., Andrade, M. J., & Rodrigues, P. (2023). *Rosmarinus officinalis* reduces the ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in a dry-cured fermented sausage-based medium. *Food Control*, 145, 109436. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109436>
- Anelli, P., Haidukowski, M., Epifani, F., Cimmarusti, M. T., Moretti, A., Logrieco, A., & Susca, A. (2019). Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology*, 78, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.014>
- Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., & Cabras, P. (2007). *In vitro* interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 2043–2048. <https://doi.org/10.1021/jf062768u>
- Aoudia, N., Callu, P., Grosjean, F., & Larondelle, Y. (2009). Effectiveness of mycotoxin sequestration activity of micronized wheat fibres on distribution of ochratoxin A in plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1485–1489. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.033>
- Apaliya, M. T., Zhang, H., Yang, Q., Zheng, X., Zhao, L., Kwaw, E., & Mahunu, G. K. (2017). *Hanseniaspora uvarum* enhanced with trehalose induced defense-related enzyme activities and relative genes expression levels against *Aspergillus tubingensis* in table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 132, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.06.008>
- Arce-López, B., Lizarraga, E., Irigoyen, Á., & González-Peñas, E. (2020). Presence of 19 mycotoxins in human plasma in a region of northern Spain. *Toxins*, 12(12), 750. <https://doi.org/10.3390/toxins12120750>
- Arce-López, B., Lizarraga, E., López de Mesa, R., & González-Peñas, E. (2021). Assessment of exposure to mycotoxins in Spanish children through the analysis of their levels in plasma samples. *Toxins*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13020150>
- Ariño, A., Herrera, M., Langa, E., Raso, J., & Herrera, A. (2007). Ochratoxin A in liquorice as affected by processing methods. *Food Additives and Contaminants*, 24(9), 987–992. <https://doi.org/10.1080/02652030701317277>
- Arroyo-Herrera, I., Maldonado-Hernández, J., Rojas-Rojas, F. U., Meza-Radilla, G., Larios-Serrato, V., Vásquez-Murrieta, M. S., Whitman, W. B., & Los Santos, P. E. (2020). *Cupriavidus agavae* sp. nov., a species isolated from *Agave L.* rhizosphere in northeast Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(7), 4165–4170. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004263>
- Arroyo-Manzanares, N., Rodríguez-Estévez, V., Arenas-Fernández, P., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2019). Occurrence of mycotoxins in swine feeding from Spain. *Toxins*, 11(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins11060342>

- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L., & Wogan, G. N. (1963). Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society*, 85(11), 1706–1707. <https://doi.org/10.1021/ja00894a050>
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Nwozo, S., Odongo, G. A., Eseoghene, J., Twinomuhwezi, H., Ogbonna, C. U., Upadhaya, A. K., Adeleye, A. O., & Okpala, C. O. R. (2022). Livestock and their associated health concerns: a review. *Toxins*, 14(3), 167. <https://doi.org/10.3390/toxins14030167>
- Batt, C. A. (2014). *Alcaligenes*. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 38–41). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00006-9>
- Battacone, G., Nudda, A., & Pulina, G. (2010). Effects of ochratoxin A on livestock production. *Toxins*, 2(7), 1796–1824. <https://doi.org/10.3390/toxins2071796>
- Battilani, P., & Camardo-Leggieri, M. (2015). OTA-grapes: a mechanistic model to predict ochratoxin A risk in grapes, a step beyond the systems approach. *Toxins*, 7(8), 3012–3029. <https://doi.org/10.3390/toxins7083012>
- Battilani, P., Toscano, P., Van Der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo-Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A. (2006). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiology Letters*, 255(2), 203–208. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00073.x>
- Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari, H. I., Boudabous, A., & Roussos, S. (2014). Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control*, 76, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.001>
- Bennet, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bezerra da Rocha, M. E., da Chagas Oliveira-Freire, F., Feitosa-Maia, F. E., Florindo-Guedes, M. I., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Bharali, P., Das, S., Konwar, B. K., & Thakur, A. J. (2011). Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: feasibility in petro-spill bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(5), 682–690. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.001>
- Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(1), 57–81. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
- Bitto, E., Bingman, C. A., Bittova, L., Houston, N. L., Boston, R. S., Fox, B. G., & Phillips, G. N. (2009). X-ray structure of ILLS, an auxin-conjugate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 74(1), 61–71. <https://doi.org/10.1002/prot.22124>

- Blackwell, J. R., & Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Letters*, 295(1), 10–12. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81372-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81372-F)
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., & Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.004>
- Boudergue, C., Burel, C., Dragacci, S., Favrot, M., Fremy, J., Massimi, C., Prigent, P., Debongnie, P., Pussemier, L., Boudra, H., Morgavi, D., Oswald, I., Perez, A., & Avantaggiato, G. (2017). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy, and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications*, 6(9). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2009.en-22>
- Boudra, H., Le Bars, P., & Le Bars, J. (1995). Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1156–1158. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1156-1158.1995>
- Bourdichon, F., Alper, I., Bibiloni, R., Dubois, A., Laulund, S., Miks, M., Morelli, L., Zuliani, V., & Yao, S. (2018). Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. Update of the Bulletin of the IDF n° 455-2012. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 495/2018.
- Bruinink, A., Rasonyi, T., & Sidler, C. (1998). Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin-alpha *in vitro*. *Natural Toxins*, 6(5), 173–177. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7189\(199809/10\)6:5<173::AID-NT10>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7189(199809/10)6:5<173::AID-NT10>3.0.CO;2-4)
- Bryden, W. L. (2007). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(Suppl.1), 95–101. <https://doi.org/10.6133/apjcn.2007.16.s1.18>
- Bryła, M., Ksieniewicz-Woźniak, E., Stepniewska, S., Modrzewska, M., Waśkiewicz, A., Szymczyk, K., & Szafrńska, A. (2021). Transformation of ochratoxin A during bread-making processes. *Food Control*, 125, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107950>
- Cai, M., Qian, Y., Chen, N., Ling, T., Wang, J., Jiang, H., Wang, X., Qi, K., & Zhou, Y. (2020). Detoxification of aflatoxin B1 by *Stenotrophomonas* sp. CW117 and characterization the thermophilic degradation process. *Environmental Pollution*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114178>
- Calado, T., Fernández-Cruz, M. L., Cabo Verde, S., Venâncio, A., & Abrunhosa, L. (2018). Gamma irradiation effects on ochratoxin A: degradation, cytotoxicity, and application in food. *Food Chemistry*, 240, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.136>
- Camardo-Leggieri, M., Pietri, A., & Battilani, P. (2020). Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in grana cheese. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010069>
- Carballo, D., Fernández-Franzón, M., Ferrer, E., Pallarés, N., & Berrada, H. (2021). Dietary exposure to mycotoxins through alcoholic and non-alcoholic beverages in Valencia, Spain. *Toxins*, 13(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins13070438>

- Caridi, A., Sidari, R., Pulvirenti, A., & Blaiotta, G. (2020). Genetic improvement of wine yeasts for opposite adsorption activity of phenolics and ochratoxin A during red winemaking. *Food Biotechnology*, 34(4), 352–370. <https://doi.org/10.1080/08905436.2020.1850472>
- CE (2002). Reglamento (CE) nº 472/2002 de 12 de marzo de 2002, que modifica el Reglamento (CE) nº 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 075, 18-20.
- CE (2003). Reglamento (CE) nº 1831/2003 de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 268, 29-43.
- CE (2006a). Reglamento (CE) nº 1881/2006 de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 364, 5-24.
- CE (2006b). Reglamento (CE) nº 401/2006 de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 070, 12-34.
- CE (2016). Recomendación (UE) 2016/1319 de 29 de julio de 2016, que modifica la Recomendación 2006/576/CE por lo que se refiere al deoxinivalenol, la zearalenona y la ocratoxina A en los alimentos para animales de compañía. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 208, 58-60.
- CE (2023). Reglamento (UE) 2023/915 de 25 de abril de 2023 relativo a los límites máximos de determinados contaminantes en los alimentos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1881/2006. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 119, 103-157.
- Cerdà-Costa, N., & Gomis-Rüth, F. X. (2014). Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. *Protein Science*, 23(2), 123–144. <https://doi.org/10.1002/pro.2400>
- Cervini, C., Gallo, A., Piemontese, L., Magistà, D., Logrieco, A. F., Ferrara, M., Solfrizzo, M., & Perrone, G. (2020). Effects of temperature and water activity change on ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* in field-simulating conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 315, 108420. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108420>
- Chang, X., Wu, Z., Wu, S., Dai, Y., & Sun, C. (2015). Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1. *Food Additives and Contaminants - Part A*, 32(4), 564–571. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.991948>
- Chen, N., Fei, Q., Luo, H., Fang, Z., Xiao, Y., Du, Z., & Zhou, Y. (2022). Isoenzyme N-acyl-L-amino acid amidohydrolase NA increases ochratoxin A degradation efficiency of *Stenotrophomonas* sp. CW117 by enhancing amidohydrolase ADH3 stability. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02205-22>
- Cho, S. M., Jeong, S. E., Lee, K. R., Sudhani, H. P. K., Kim, M., Hong, S. Y., & Chung, S. H. (2016). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus tubingensis* isolated from meju. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1687–1695. <https://doi.org/10.4014/jmb.1606.06016>
- Códex Alimentarius (2007). Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por ocratoxina A en el vino. CXC 63-2007. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/>

- Códex Alimentarius (2009). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de ocratoxina A en el café. CXC 69-2009. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/>
- Códex Alimentarius (2013). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación del cacao por ocratoxina A. CXC 72-2013. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/>
- Colović, R., Puvača, N., Cheli, F., Avantaggiato, G., Greco, D., Đuragić, O., Kos, J., & Pinotti, L. (2019). Decontamination of mycotoxin-contaminated feedstuffs and compound feed. *Toxins*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/toxins11110617>
- Conte, G., Fontanelli, M., Galli, F., Cotrozzi, L., Pagni, L., & Pellegrini, E. (2020). Mycotoxins in feed and food and the role of ozone in their detoxification and degradation: an update. *Toxins*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/toxins12080486>
- Cserhádi, M., Kriszt, B., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Háhn, J., Tóth, S., Nagy, I., & Kukolya, J. (2013). Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.002>
- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A. D. W., Budroni, M., & Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4(12), 1468–1481. <https://doi.org/10.3390/toxins4121468>
- Curiel, J. A., De Las Rivas, B., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expression and Purification*, 76(1), 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.10.013>
- Curiel, J. A., Peirotén, Á., Langa, S., de Vega, E., Blasco, L., & Landete, J. M. (2022). Characterization and stabilization of the α -L-fucosidase set from *Lactocaseibacillus rhamnosus* INIA P603. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(24), 8067–8077. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12262-w>
- Dai, L., Niu, D., Huang, J. W., Li, X., Shen, P., Li, H., Xie, Z., Min, J., Hu, Y., Yang, Y., Guo, R. T., & Chen, C. C. (2023). Cryo-EM structure and rational engineering of a superefficient ochratoxin A-detoxifying amidohydrolase. *Journal of Hazardous Materials*, 458, 131836. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131836>
- Dall'Asta, C., De Dea Lindner, J., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E., & Marchelli, R. (2008). The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, 106(2), 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.049>
- De Bellis, P., Tristezza, M., Haidukowski, M., Fanelli, F., Sisto, A., Mulè, G., & Grieco, F. (2015). Biodegradation of ochratoxin A by bacterial strains isolated from vineyard soils. *Toxins*, 7(12), 5079–5093. <https://doi.org/10.3390/toxins7124864>
- De Felice, D. V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., & Castoria, R. (2008). Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, 98(12), 1261–1270. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-12-1261>

- De Las Rivas, B., Curiel, J. A., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnology Progress*, 23(3), 680–686. <https://doi.org/10.1021/bp060318g>
- Decontardi, S., Mauro, A., Lima, N., & Battilani, P. (2017). Survey of *Penicillia* associated with Italian grana cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.019>
- Del Prete, V., Rodríguez, H., Carrascosa, A. V., De Las Rivas, B., García-Moruno, E., & Muñoz, R. (2007). *In vitro* removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2155–2160. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2155>
- Delgado, J., Núñez, F., Asensio, M. A., & Owens, R. A. (2019). Quantitative proteomic profiling of ochratoxin A repression in *Penicillium nordicum* by protective cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108243>
- Dellafiora, L., Gonaus, C., Streit, B., Galaverna, G., Moll, W. D., Vogtentanz, G., Schatzmayr, G., Dall'Asta, C., & Prasad, S. (2020). An *in silico* target fishing approach to identify novel ochratoxin A hydrolyzing enzyme. *Toxins*, 12(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins12040258>
- Deng, Y., Han, X. F., Jiang, Z. M., Yu, L. Y., Li, Y., & Zhang, Y. Q. (2022). Characterization of three *Stenotrophomonas* strains isolated from different ecosystems and proposal of *Stenotrophomonas mori* sp. nov. and *Stenotrophomonas lacuserhaii* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1056762>
- Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A. N., & Saxena, A. K. (2020). Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Trends of Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture and Biomedicine Systems: Perspectives for Human Health* (pp. 147–161). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7>
- Dimakopoulou, M., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E. A., & Tjamos, E. C. (2008). Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control*, 46(2), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.015>
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v.2 - A server for *in silico* prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*, 20(6). <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
- Dobritzsch, D., Wang, H., Schneider, G., & Yu, S. (2014). Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme. *Biochemical Journal*, 462(3), 441–452. <https://doi.org/10.1042/BJ20140382>
- Doi, E., Shibata, D., & Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, 118, 173–184. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90175-5)
- Duvick, J., Maddox, J., & Gilliam, J. (2003). *Composition and methods for fumonisin detoxification* (Patent USOO6538177B1).
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA journal*, 18(5), e06113.

- El Khoury, R., Atoui, A., Verheecke, C., Maroun, R., El Khoury, A., & Mathieu, F. (2016). Essential oils modulate gene expression and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. *Toxins*, 8(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins8080242>
- El Khoury, R., Mathieu, F., Atoui, A., Kawtharani, H., El Khoury, A., Afif, C., Maroun, R. G., & El Khoury, A. (2017). Ability of soil isolated actinobacterial strains to prevent, bind and biodegrade ochratoxin A. *Toxins*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/toxins9070222>
- Engelhardt, G. (2002). Degradation of ochratoxin A and B by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Mycotoxin Research*, 18(1), 37–43. <https://doi.org/10.1007/BF02946138>
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2019). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- FAO (2003). Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. *Estudios FAO: Alimentación y nutrición*, 73.
- FAO (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. *Estudios FAO: Alimentación y nutrición*, 81.
- FAO & PNUMA (1982). Perspectiva sobre micotoxinas.: documentos seleccionados de la Conferencia mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas celebrada en Nairobi, Kenia, 19-27 de septiembre de 1977. *Estudios FAO: Alimentación y nutrición*, 13.
- Ferenczi, S., Cserhádi, M., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Kukolya, J., Szoke, Z., Koszegi, B., Albert, M., Barna, T., Mézes, M., Kovács, K. J., & Kriszt, B. (2014). A new ochratoxin A biodegradation strategy using *Cupriavidus basilensis* Ör16 strain. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109817>
- Ferraroni, M., Matera, I., Bürger, S., Reichert, S., Steimer, L., Scozzafava, A., Stolz, A., & Briganti, F. (2013). The salicylate 1,2-dioxygenase as a model for a conventional gentisate 1,2-dioxygenase: crystal structures of the G106A mutant and its adducts with gentisate and salicylate. *FEBS Journal*, 280(7), 1643–1652. <https://doi.org/10.1111/febs.12173>
- Ferraroni, M., Steimer, L., Matera, I., Bürger, S., Scozzafava, A., Stolz, A., & Briganti, F. (2012). The generation of a 1-hydroxy-2-naphthoate 1,2-dioxygenase by single point mutations of salicylate 1,2-dioxygenase - rational design of mutants and the crystal structures of the A85H and W104Y variants. *Journal of Structural Biology*, 180(3), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.08.007>
- Ferreira, F. M., Mendoza-Hernandez, G., Castañeda-Bueno, M., Aparicio, R., Fischer, H., Calcagno, M. L., & Oliva, G. (2006). Structural analysis of N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase apoenzyme from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 359(2), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.024>
- Fetzner, S. (2012). Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2505–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.07651-11>

- Fiori, S., Urgeghe, P. P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.020>
- Flores-Flores, M. E., & González-Peñas, E. (2018). Short communication: analysis of mycotoxins in Spanish milk. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 113–117. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13290>
- Francis, I. M., Jochimsen, K. N., De Vos, P., & van Bruggen, A. H. C. (2014). Reclassification of rhizosphere bacteria including strains causing corky root of lettuce and proposal of *Rhizorhapis suburifaciens* gen. nov., comb. nov., *Sphingobium mellinum* sp. nov., *Sphingobium xanthum* sp. nov. and *Rhizorhabdus argentea* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(4), 1340–1350. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058909-0>
- Fuchs, R., Hult, K., Peraica, M., Radic, B., & Plestina, R. (1984). Conversion of ochratoxin C into ochratoxin A *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 41–42. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.41-42.1984>
- Galtier, P., & Alvinerie, M. (1976). *In vitro* transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Annales de Recherches Veterinaires*, 7(1), 91–98.
- Gan, H. H., Perlow, R. A., Roy, S., Ko, J., Wu, M., Huang, J., Yan, S., Nicoletta, A., Vafai, J., Sun, D., Wang, L., Noah, J. E., Pasquali, S., & Schlick, T. (2002). Analysis of protein sequence/structure similarity relationships. *Biophysical Journal*, 83(5), 2781–2791. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75287-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75287-9)
- García-Díaz, M., Gil-Serna, J., Vázquez, C., Botia, M. N., & Patiño, B. (2020). A comprehensive study on the occurrence of mycotoxins and their producing fungi during the maize production cycle in Spain. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010141>
- Gavahian, M., Sheu, S. C., Magnani, M., & Khaneghah, A. M. (2021). Emerging technologies for mycotoxins removal from foods: recent advances, roles in sustainable food consumption, and strategies for industrial applications. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15922>
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2020). The genomic regions that contain ochratoxin A biosynthetic genes widely differ in *Aspergillus* section *Circumdati* species. *Toxins*, 12(754). <https://doi.org/10.3390/toxins12120754>
- Goldblatt, L. A. (1972). Implications of mycotoxins. *Clinical Toxicology*, 5(4), 453–464. <https://doi.org/10.3109/15563657208991026>
- Gómez-Albarrán, C., Melguizo, C., Patiño, B., Vázquez, C., & Gil-Serna, J. (2021). Diversity of mycobiota in Spanish grape berries and selection of *Hanseniaspora uvarum* U1 to prevent mycotoxin contamination. *Toxins*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/toxins13090649>
- Gonaus, C., Wieland, L., Thallinger, G. G., & Prasad, S. (2023). Ochratoxin A degrading enzymes of *Stenotrophomonas* sp. 043-1a. *FEMS Microbiology Letters*, 370. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad028>

- Gonçalves, A., Palumbo, R., Guimarães, A., Gkrillas, A., Dall'Asta, C., Dorne, J. L., Battilani, P., & Venâncio, A. (2019). The route of mycotoxins in the grape food chain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2, 89–104. <https://doi.org/10.5344/ajev.2019.19039>
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K., & Vandamme, P. (2001). Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1773–1782. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1773>
- Gurikar, C., Shivaprasad, D. P., Sabillón, L., Nanje Gowda, N. A., & Siliveru, K. (2023). Impact of mycotoxins and their metabolites associated with food grains. *Grain and Oil Science and Technology*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.10.001>
- Halász, A., Lásztity, R., Abonyi, T., & Bata, Á. (2009). Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. *Food Reviews International*, 25(4), 284–298. <https://doi.org/10.1080/87559120903155750>
- Haley, E. E. (1968). Purification and properties of a beta-aspartyl peptidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 243(21), 5748–5752. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)91928-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)91928-9)
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- He, W. J., Zhang, L., Yi, S. Y., Tang, X. L., Yuan, Q. S., Guo, M. W., Wu, A. B., Qu, B., Li, H. P., & Liao, Y. C. (2017). An aldo-keto reductase is responsible for *Fusarium* toxin-degrading activity in a soil *Sphingomonas* strain. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08799-w>
- Heussner, A. H., & Bingle, L. E. H. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253–4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>
- Higdon, R., Louie, B., & Kolker, E. (2010). Modelling sequence and function similarity between proteins for protein functional annotation. *HPDC 2010 - Proceedings of the 19th ACM International Symposium on High Performance Distributed Computing*, 499–502. <https://doi.org/10.1145/1851476.1851548>
- Hintner, J. P., Reemtsma, T., & Stolz, A. (2004). Biochemical and molecular characterization of a ring fission dioxygenase with the ability to oxidise (substituted) salicylate(s) from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37250–37260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313500200>
- Holm, L., & Sander, C. (1997). An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 28(1), 72–82. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199705\)28:1<72::AID-PROT7>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199705)28:1<72::AID-PROT7>3.0.CO;2-L)
- Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N. C., Woyke, T., & Göker, M. (2020). Analysis of 1000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>

- Hu, H. N., Jia, X., Wang, Y. P., & Liang, Z. H. (2018). Removal of ochratoxin A by a carboxypeptidase and peptides present in liquid cultures of *Bacillus subtilis* CW14. *World Mycotoxin Journal*, 11(4), 559–570. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2296>
- Huang, Y. T., Chen, J. M., Ho, B. C., Wu, Z. Y., Kuo, R. C., & Liu, P. Y. (2018). Genome sequencing and comparative analysis of *Stenotrophomonas acidaminiphila* reveal evolutionary insights into sulfamethoxazole resistance. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01013>
- Hult, K., & Berglund, P. (2007). Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in Biotechnology*, 25(5), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.002>
- Hwang C. A., & Draughon, F. A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*, 57(5), 410–414. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-57.5.410>
- Iacumin, L., Manzano, M., Andyanto, D., & Comi, G. (2017). Biocontrol of ochratoxigenic moulds (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum*) by *Debaromyces hansenii* and *Saccharomycopsis fibuligera* during speck production. *Food Microbiology*, 62, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.017>
- IARC (1993). Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 56, 489–521.
- IARC (2012). Economics of mycotoxins: evaluating costs to society and cost-effectiveness of interventions. *IARC Scientific Publications*, 158, 119–129.
- Ishikawa, K., Ishida, H., Matsui, I., Kawarabayasi, Y., & Kikuchi, H. (2001). Novel bifunctional hyperthermostable carboxypeptidase/aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 673–679. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.673-679.2001>
- Ismail, A. A., Mohamed, H. H., & El-Sayed, M. T. (2023). Biodegradation of ochratoxin A by endophytic *Trichoderma koningii* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03491-2>
- Jahan, I., Tai, B., Ma, J., Hussain, S., Du, H., Guo, L., Wang, G., Adegoke, T. V., Ma, L., & Xing, F. (2023). Identification of a novel *Bacillus velezensis* IS-6 nudix hydrolase Nh-9 involved in ochratoxin A detoxification by transcriptomic profiling and functional verification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(26), 10155–10168. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01910>
- Jalili, M., Selamat, J., & Rashidi, L. (2020). Effect of thermal processing and traditional flavouring mixture on mycotoxin reduction in pistachio. *World Mycotoxin Journal*, 13(3), 381–389. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2486>
- Jamdar, S. N., Are, V. N., Navamani, M., Kumar, S., Nagar, V., & Makde, R. D. (2015). The members of M20D peptidase subfamily from *Burkholderia cepacia*, *Deinococcus radiodurans* and *Staphylococcus aureus* (HmrA) are carboxydipeptidases, primarily specific for Met-X dipeptides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 587, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.10.003>

- Janssen, P. J., van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M. A., Leys, N., Vallaeys, T., Lapidus, A., Monchy, S., Médigue, C., Taghavi, S., McCorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D., & Mergeay, M. (2010). The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS ONE*, 5(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010433>
- Jiang, C., Chen, X., Lei, S., Zhao, H., Liu, Y., & Shi, J. (2017). Lipopeptides from *Bacillus subtilis* have potential application in the winemaking process: inhibiting fungal and ochratoxin A contamination and enhancing esters and acids biosynthesis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(3), 350–358. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12289>
- Jozic, D., Bourenkow, G., Bartunik, H., Scholze, H., Dive, V., Henrich, B., Huber, R., Bode, W., & Maskos, K. (2002). Crystal structure of the dinuclear zinc aminopeptidase PepV from *Lactobacillus delbrueckii* unravels its preference for dipeptides. *Structure*, 10, 1097–1106.
- Juhasz, A. L., Stanley, G. A., & Britz, M. L. (2000). Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology*, 30(5), 396–401. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00733.x>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kępińska-Pacelik, J., & Biel, W. (2021). Mycotoxins—prevention, detection, impact on animal health. *Processes*, 9(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pr9112035>
- Kessler, B., de Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1992). A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molecular and General Genetics MGG*, 233, 293–301. <https://doi.org/10.1007/BF00587591>
- Khattab, A. A., Ibrahim, M. I. M., & El-Kady, A. A. (2018). Ochratoxin A biosorption onto genetically improved of *Lactobacillus delbrueckii* mutants. *International Food Research Journal*, 25(2), 515–522.
- Kiessling, K., Pettersson, H., Sandholm, K., & Olsen, M. (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. *Environmental Microbiology*, 47(5), 1070–1073. <https://doi.org/10.1128/aem.47.5.1070-1073.1984>
- Kiyohara, H., Takizawa, N., Date Shin Torigoe, H., & Yano, K. (1990). Characterization of a phenanthrene degradation plasmid from *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69(1), 54–56. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90164-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90164-R)

- Klingelhöfer, D., Braun, M., Schöffel, N., Oremek, G. M., Brüggmann, D., & Groneberg, D. A. (2020). Ochratoxin – Characteristics, influences, and challenges of global research. *Food Control*, 114, 107230. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107230>
- Kohlmeier, M. (2003). Amino acids and nitrogen compounds. In *Nutrient Metabolism: Structure, Functions and Genetics* (pp. 265–477). Elsevier (Ed.)
- Komagata, K., & Iizuka, H. (1964). New species of *Brevibacterium* isolated from rice. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 38, 496–502.
- Kong, L., Zhu, S., Zhu, L., Xie, H., Su, K., Yan, T., Wang, J., Wang, J., Wang, F., & Sun, F. (2013). Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 25(11), 2257–2264. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60288-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60288-5)
- Kószegi, T., & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, 8(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
- Kourist, R., Bartsch, S., Fransson, L., Hult, K., & Bornscheuer, U. T. (2008). Understanding promiscuous amidase activity of an esterase from *Bacillus subtilis*. *ChemBioChem*, 9(1), 67–69. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700521>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcilli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., Nonno, R., Querol, A., Sijtsma, L., Suarez, J.E., Sundh, I., Barrizzone, F., Correia, S., & Herman, L. (2022). Update of the list of QPS-recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 16: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2022. *EFSA Journal*, 20(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7408>
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 29, pp. 14–19). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lappa, I. K., Mparampouti, S., Lanza, B., & Panagou, E. Z. (2018). Control of *Aspergillus carbonarius* in grape berries by *Lactobacillus plantarum*: a phenotypic and gene transcription study. *International Journal of Food Microbiology*, 275, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.001>
- Lappa, I. K., Simini, E., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2017). *In vitro* evaluation of essential oils against *Aspergillus carbonarius* isolates and their effects on ochratoxin A related gene expression in synthetic grape medium. *Food Control*, 73, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.016>
- Larsen, R. A., Knox, T. M., & Miller, C. G. (2001). Aspartic peptide hydrolases in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 3089–3097. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3089-3097.2001>

- Lee, D. S., Ryu, S. H., Hwang, H. W., Kim, Y. J., Park, M., Lee, J. R., Lee, S. S., & Jeon, C. O. (2008). *Pseudoxanthomonas sacheonensis* sp. nov., isolated from BTEX-contaminated soil in Korea, transfer of *Stenotrophomonas dokdonensis* Yoon et al. 2006 to the genus *Pseudoxanthomonas* as *Pseudoxanthomonas dokdonensis* comb. nov. and emended description of the genus *Pseudoxanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2235–2240. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65678-0>
- Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K. S., & Ryu, H. W. (2002). Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 52(4), 400–406. <https://doi.org/10.1080/10473289.2002.10470796>
- Lee, H. J. (2020). Stability of ochratoxin A in oats during roasting with reducing sugars. *Food Control*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107382>
- Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2021). Systematic structure-based search for ochratoxin-degrading enzymes in proteomes from filamentous fungi. *Biomolecules*, 11(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/biom11071040>
- Lešić, T., Vulić, A., Vahčić, N., Šarkanj, B., Hengl, B., Kos, I., Polak, T., Kudumija, N., & Pleadin, J. (2022). The occurrence of five unregulated mycotoxins most important for traditional dry-cured meat products. *Toxins*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/toxins14070476>
- Leys, N. M. E. J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., & Springael, D. (2004). Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1944–1955. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1944-1955.2004>
- Li, S., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Vitti, T. G., & Crow, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin α and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145(1), 82–90. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8155>
- Lin, L. L., Chen, M. H., Chien, H. C. R., Kan, S. C., Chen, C. C., Hu, H. Y., & Hsu, W. H. (2007). Characterization of a bifunctional aminoacylase/carboxypeptidase from radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Journal of Biotechnology*, 128(2), 322–334. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.10.011>
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471. [https://doi.org/0095-1137/00/\\$04.00+0](https://doi.org/0095-1137/00/$04.00+0)
- Liu, Y., Galani Yamdeu, J., Gong, Y., & Orfila, C. (2020). A review of post-harvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1521–1560. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12562>
- Liu, Y., Li, M., Liu, Y., Bai, F., & Bian, K. (2019). Effects of pulsed ultrasound at 20 kHz on the sonochemical degradation of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 12(4), 357–366. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2431>
- Liu, C., Zhao, C., Liu, H., Du, W., Sun, J., Zhou, W., & Sun, C. (2023). Biodegradation of ochratoxin A by two novel strains of *Brevibacillus* sp. isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Food Bioscience*, 54, 102847. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102847>

- Liuzzi, V. C., Fanelli, F., Tristezza, M., Haidukowski, M., Picardi, E., Manzari, C., Lionetti, C., Grieco, F., Logrieco, A. F., Thon, M. R., Pesole, G., & Mulè, G. (2017). Transcriptional analysis of *Acinetobacter* sp. neg1 capable of degrading ochratoxin A. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02162>
- Loffredo, E., Scarcia, Y., & Parlavecchia, M. (2020). Removal of ochratoxin A from liquid media using novel low-cost biosorbents. *Environmental Science and Pollution Research*, 1881, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09544-z>
- Lohkamp, B., Andersen, B., Piškur, J., & Dobritzsch, D. (2006). The crystal structures of dihydropyrimidinases reaffirm the close relationship between cyclic amidohydrolases and explain their substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13762–13776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513266200>
- Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2017). Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives. *Toxins*, 9(4), 111. <https://doi.org/10.3390/toxins9040111>
- López-García, R. (2010). Mycotoxin management: an international challenge. In *Ensuring Global Food Safety* (First Edit, Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374845-4.00012-6>
- Lu, C. Y., Li, Y. Q., Tian, Y., Han, M. X., Rao, M. P. N., Li, Y. R., Zhu, Z. N., Wei, D. Q., An, D. Di, & Li, W. J. (2017). *Alcaligenes endophyticus* sp. nov., isolated from roots of *Ammodendron bifolium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), 939–943. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001719>
- Lund, F., Filtenborg, O., & Frisvad, J. C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12, 173–180. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80094-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80094-8)
- Luo, H., Wang, G., & Chen, N. (2022). A superefficient ochratoxin A hydrolase with promising potential for industrial applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(2), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.01964-21>
- Luo, S., Du, H., Kebede, H., Liu, Y., & Xing, F. (2021). Contamination status of major mycotoxins in agricultural product and food stuff in Europe. *Food Control*, 127, 108120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108120>
- Luo, Y., Liu, X., & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control*, 89, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.016>
- Lykidis, A., Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, I. J., Ivanova, N. N., Hooper, S. D., Lapidus, A., Lucas, S., González, B., & Kyrpides, N. C. (2010). The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009729>
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. In *Mycopathologia*, 162(3), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0057-2>
- Makkar, N. S., & Casida, L. E. (1987). *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil? *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 323–326. [https://doi.org/0020-7713/87/04323-04\\$02.00/O](https://doi.org/0020-7713/87/04323-04$02.00/O)

- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8(7), 12–15. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>
- Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurz, M., Zepnik, H., Mantle, P., Völkel, W., Hard, G. C., & Dekant, W. (2005). Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206(1), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.007>
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 795–799. [https://doi.org/0099-2240/98/\\$04.00+0](https://doi.org/0099-2240/98/$04.00+0)
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60(2013), 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., & Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
- Matera, I., Ferraroni, M., Bürger, S., Scozzafava, A., Stolz, A., & Briganti, F. (2008). Salicylate 1,2-dioxygenase from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*: crystal structure of a peculiar ring-cleaving dioxygenase. *Journal of Molecular Biology*, 380(5), 856–868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.041>
- Matossian, M. K. (1981). Mold poisoning: an unrecognized english health problem, 1550–1800. *Medical History*, 25(1), 73–84. <https://doi.org/10.1017/S0025727300034116>
- McSweeney, P.L.H. (2007). Bacterial surface-ripened cheeses. In: *Cheese Problems Solved*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 289-297.
- Medina, Á., González-Jartín, J. M., & Sainz, M. J. (2017a). Impact of global warming on mycotoxins. *Current Opinion in Food Science*, 18, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.009>
- Medina, Á., Mohale, S., Samsudin, N. I. P., Rodríguez-Sixtos, A., Rodríguez, A., & Magan, N. (2017b). Biocontrol of mycotoxins: dynamics and mechanisms of action. *Current Opinion in Food Science*, 17, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.008>
- Mobashar, M., Blank, R., Hummel, J., Westphal, A., Tholen, E., & Südekum, K. H. (2012). Ruminal ochratoxin A degradation - Contribution of the different microbial populations and influence of diet. *Animal Feed Science and Technology*, 171(2–4), 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.10.002>
- Mobashar, M., Hummel, J., Blank, R., & Südekum, K. H. (2010). Ochratoxin A in ruminants - a review on its degradation by gut microbes and effects on animals. *Toxins*, 2(4). <https://doi.org/10.3390/toxins204809>
- Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E., & Prillinger, H. (2004). *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6), 661–671. <https://doi.org/10.1078/0723202042369947>

- Mondani, L., Palumbo, R., Tsitsigiannis, D., Perdakis, D., Mazzoni, E., & Battilani, P. (2020). Pest management and ochratoxin A contamination in grapes: a review. *Toxins*, 12(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/toxins12050303>
- Mwabulili, F., Xie, Y., Li, Q., Sun, S., Yang, Y., & Ma, W. (2023). Research progress of ochratoxin A bio-detoxification. *Toxicon*, 222, 107005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.107005>
- Nahle, S., El Khoury, A., Savvaidis, I., Chokr, A., Louka, N., & Atoui, A. (2022). Detoxification approaches of mycotoxins: by microorganisms, biofilms, and enzymes. *International Journal of Food Contamination*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40550-022-00089-2>
- Natsch, A., & Emter, R. (2020). The specific biochemistry of human axilla odour formation viewed in an evolutionary context. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0269>
- Natsch, A., Gfeller, H., Gygax, P., Schmid, J., & Acuna, G. (2003). A specific bacterial aminoacylase cleaves odorant precursors secreted in the human axilla. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5718–5727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210142200>
- Ndiaye, S., Zhang, M., Fall, M., Ayessou, N. M., Zhang, Q., & Li, P. (2022). Current review of mycotoxin biodegradation and bioadsorption: microorganisms, mechanisms, and main important applications. *Toxins*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/toxins14110729>
- Nešić, K., Habschied, K., & Mastanjević, K. (2021). Possibilities for the biological control of mycotoxins in food and feed. *Toxins*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13030198>
- Nguyen, P. A., Strub, C., Fontana, A., & Schorr-Galindo, S. (2017). Crop molds and mycotoxins: alternative management using biocontrol. *Biological Control*, 104(2017), 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.004>
- Nobre, C., González, A., Losoya, C., Teixeira, J. A., Belmares, R., & Abrunhosa, L. (2022). Detoxification of ochratoxin A and zearalenone by *Pleurotus ostreatus* during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132525>
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (2005). Código de Buenas Prácticas Vitivinícolas para limitar al máximo la presencia de ocratoxina A en los productos derivados de la viña. *Resolución VITI-OENO 1/2005*.
- Orozco-Cortés, P. C., Flores-Ortiz, C. M., Hernández-Portilla, L. B., Vázquez Medrano, J., & Rodríguez-Peña, O. N. (2023). Molecular docking and *in vitro* studies of ochratoxin A (OTA) biotransformation testing three endopeptidases. *Molecules*, 28(5), 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules28052019>
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>
- Özpinar, H., Augonyte, G., & Drochner, W. (1999). Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an *in vitro* system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(98\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(98)00041-6)

- Palleroni, J., & Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophila* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(3), 606–609. [https://doi.org/0020-7713/93/030606-04\\$02.OO/0](https://doi.org/0020-7713/93/030606-04$02.OO/0)
- Palumbo, J. D., O’Keeffe, T. L., & Mahoney, N. E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164(5), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9057-0>
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention - A review. *Food Additives and Contaminants*, 23(4), 398–410. <https://doi.org/10.1080/02652030500376102>
- Park, D. L., Njapau, H., & Boutrif, E. (1999). Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *Food, Nutrition and Agriculture*, 23, 49–55. <http://www.fao.org/docrep/X2100T/x2100t08.htm#TopOfPage>
- Pascual, C., & Collins, M. D. (1999). *Brevibacterium avium* sp. nov. isolated from poultry. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1527–1528. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1527>
- Patharajan, S., Reddy, K. R. N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2011). Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. *Food Control*, 22(2), 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.024>
- Peng, M., Zhang, Z., Xu, X., Zhang, H., Zhao, Z., & Liang, Z. (2023). Purification and characterization of the enzymes from *Brevundimonas naejangsanensis* that degrade ochratoxin A and B. *Food Chemistry*, 419(17), 135926. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135926>
- Peng, M., Zhao, Z., & Liang, Z. (2022). Biodegradation of ochratoxin A and ochratoxin B by *Brevundimonas naejangsanensis* isolated from soil. *Food Control*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108611>
- Peraica, M., & Rašić, D. (2012). The impact of mycotoxicoses on human history. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63(4), 513–518. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2259>
- Pérez-Pantoja, D., De La Iglesia, R., Pieper, D. H., & González, B. (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 736–794. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x>
- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., & Lebrihi, A. (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1495–1502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03700.x>
- Péteri, Z., Téren, J., Vágvölgyi, C., & Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24(3), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.003>

- Piotrowska, M., Nowak, A., & Czyzowska, A. (2013). Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *European Food Research and Technology*, 236(3), 441–447. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1908-3>
- Pitout, M. J. (1969). The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 18, 485–491. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952\(69\)90224-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952(69)90224-X)
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56(1), 184–192. <https://academic.oup.com/bmb/article-abstract/56/1/184/388023>
- Pitt, J. I., & Miller, J. D. (2017). A concise history of mycotoxin research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7021–7033. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04494>
- Ponsone, M. L., Nally, M. C., Chiotta, M. L., Combina, M., Köhl, J., & Chulze, S. N. (2016). Evaluation of the effectiveness of potential biocontrol yeasts against black sur rot and ochratoxin A occurring under greenhouse and field grape production conditions. *Biological Control*, 103, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.012>
- Pulvirenti, A., de Vero, L., Blaiotta, G., Sidari, R., Iosca, G., Gullo, M., & Caridi, A. (2020). Selection of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains and their screening for the adsorption activity of pigments, phenolics and ochratoxin A. *Fermentation*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6030080>
- Puopolo, G., Tomada, S., & Pertot, I. (2018). The impact of the omics era on the knowledge and use of *Lysobacter* species to control phytopathogenic microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/jam.13607>
- Qian, Y., Zhang, X., Fei, Q., & Zhou, Y. (2021). Comments on the ochratoxin A degradation mechanism by *Lysobacter* sp. CW239 — Wei Wei et al. (2020). *Environmental Pollution*, 281. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117063>
- Qu, Y., & Spain, J. C. (2011). Molecular and biochemical characterization of the 5-nitroanthranilic acid degradation pathway in *Bradyrhizobium* sp. strain JS329. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 3057–3063. <https://doi.org/10.1128/JB.01188-10>
- Que, L., & Ho, R. Y. N. (1996). Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chemical Reviews*, 96(7), 2607–2624. <https://doi.org/10.1021/cr960039f>
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramón, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2948–2953. <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.2948-2953.1992>
- Ráduly, Z., Szabó, L., Madar, A., Pócsi, I., & Csernoch, L. (2020). Toxicological and medical aspects of *Aspergillus*-derived mycotoxins entering the feed and food chain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02908>
- Ramos-Girona, A.J., Marín-Sillué, S., Molino-Gahete, F., Vila-Donat, P., & Sanchís-Almenar, V. (2020). Las micotoxinas: el enemigo silencioso. *Arbor (Consejo Superior de Investigaciones Científicas)*, 196 (795). <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1004>
- RASFF (2022). Annual Report 2021. Publications Office of the European Union, Luxemburgo.

- Ratray, F. P., & Fox, P. F. (1999). Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 891–909. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75308-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75308-7)
- Rawlings, N. D., & Barret, A. J. (2013a). Introduction: metallopeptidases and their clans. In *Handbook of proteolytic enzymes* (pp. 325–370). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00077-6>
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (2013b). Catalytic mechanisms for metallopeptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (pp. 371–396). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00077-6>
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 32(Suppl.1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh071>
- Reh fuss, M., & Urban, J. (2005). *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(5), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.03.003>
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>
- Rodríguez, A., Bernáldez, V., Rodríguez, M., Andrade, M. J., Núñez, F., & Córdoba, J. J. (2015). Effect of selected protective cultures on ochratoxin A accumulation in dry-cured Iberian ham during its ripening process. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 923–928. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.059>
- Rodríguez, H., Reverón, I., Doria, F., Costantini, A., De Las Rivas, B., Muñoz, R., & García-Moruno, E. (2011). Degradation of ochratoxin A by *Brevibacterium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), 10755–10760. <https://doi.org/10.1021/jf203061p>
- Roux, V., & Raoult, D. (2009). *Brevibacterium massiliense* sp. nov., isolated from a human ankle discharge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 1960–1964. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007864-0>
- Roy, S., Shaw, D., Sarkar, T., & Choudhury, L. (2023). Mycotoxins in fermented foods: a comprehensive review. In *Novel Research in Microbiology Journal* 7(2), 1897–1917. <https://doi.org/10.21608/nrmj.2023.293196>
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D., & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 514–525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Sadeghian, I., & Hemmati, S. (2021). Characterization of a stable form of carboxypeptidase G2 (glucarpidase), a potential biobetter variant, from *Acinetobacter* sp. 263903-1. *Molecular Biotechnology*, 63(12), 1155–1168. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00370-3>
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2006). AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Research*, 34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl343>
- Sakin, F., Tekeli, İ. O., Yipel, M., & Kürekci, C. (2018). Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Sürk, a Turkish dairy food, as studied by HPLC. *Food Control*, 90, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.012>

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor.
- Sánchez-Arroyo, A., Plaza-Vinuesa, L., de las Rivas, B., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2023). The salicylate 1,2-dioxygenase from *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986^T is a bifunctional enzyme that inactivates the mycotoxin ochratoxin A by a novel amidohydrolase activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124230>
- Sandlin, N., Russell Kish, D., Kim, J., Zaccaria, M., & Momeni, B. (2022). Current and emerging tools of computational biology to improve the detoxification of mycotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3). <https://doi.org/10.1128/aem.02102-21>
- Santamaría, L., Reverón, I., de Felipe, F. L., Rivas, B. de las, & Muñoz, R. (2018). Ethylphenol formation by *Lactobacillus plantarum*: Identification of the enzyme involved in the reduction of vinylphenols. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(17). <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-18>
- Santillán, M., & Mackey, M. C. (2008). Quantitative approaches to the study of bistability in the *lac* operon of *Escherichia coli*. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(Suppl.1). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0086.focus>
- Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2018). Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: a review. *Crop Protection*, 110(2018), 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.013>
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145, 69–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
- Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., & Binder, E. M. (2012). *Microorganism for biological detoxification of mycotoxins, namely ochratoxins and/or zearalenons, as well as method and use thereof* (Patent US8119172B2).
- Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Loibner, A. P., Braun, R., & Binder, E. M. (2002). Evidence of ochratoxin A-detoxification activity of rumen fluid, intestinal fluid, and soil samples as isolation of relevant microorganisms from these environments. *Mycotoxin Research*, 18, 183–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02946092>
- Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Nitsch, S., Mohnl, M., Täubel, M., Loibner, A. P., Braun, R., & Binder, E. M. (2003). Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, 19(2), 124–128. <https://doi.org/10.1007/BF02942950>
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A. P., & Binder, E. M. (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(6), 543–551. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500181>
- Schrödinger, L. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.
- Seibert, C. M., & Raushel, F. M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, 44(17), 6383–6391. <https://doi.org/10.1021/bi047326v>

- Selouane, A., Bouya, D., Lebrihi, A., Decock, C., & Bouseta, A. (2009). Impact of some environmental factors on growth and production of ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis*, *A. niger*, and *A. carbonarius* isolated from moroccan grapes. *Journal of Microbiology*, 47(4), 411–419. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0236-6>
- Sharma, N., Patiyal, S., Dhall, A., Pande, A., Arora, C., & Raghava, G. P. S. (2021). AlgPred 2.0: an improved method for predicting allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Briefings in Bioinformatics*, 22(4). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa294>
- Shi, L., Liang, Z., Li, J., Hao, J., Xu, Y., Huang, K., Tian, J., He, X., & Xu, W. (2014). Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW14. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1879–1885. <https://doi.org/10.1002/jfsa.6507>
- Singh, M. K., & Dominy, B. N. (2010). Thermodynamic resolution: how do errors in modeled protein structures affect binding affinity predictions? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(7), 1613–1617. <https://doi.org/10.1002/prot.22691>
- Skrinjar, M., Rasic, J. L., & Stojicic, V. (1996). Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiologica*, 41(1), 26–28. <https://doi.org/10.1007/BF02816335>
- Sorbo, A., Pucci, E., Nobili, C., Taglieri, I., Passeri, D., & Zoani, C. (2022). Food safety assessment: overview of metrological issues and regulatory aspects in the European Union. *Separations*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/separations9020053>
- Söylemez, T., Yamaç, M., Eninanç, A. B., & Yıldız, Z. (2023). Ochratoxin A biodegradation by *Agaricus campestris* and statistical optimization of cultural variables. *Food Science and Biotechnology*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01417-8>
- Steyn, P. S. (1995). Mycotoxins, general view, chemistry, and structure. *Toxicology Letters*, 82, 843–851. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03525-7](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03525-7)
- Structural Genomics Consortium (2008). Protein production and purification. *Nature methods*, 5(2), 135-146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
- Tang, J., Yin, L., Zhao, Z., Ge, L., Hou, L., Liu, Y., Chen, X., Huang, K., & Gan, F. (2023). Isolation, identification, and safety evaluation of OTA-detoxification strain *Pediococcus acidilactici* NJB421 and its effects on OTA-induced toxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113604>
- Tarazona, A., Gómez, J. V., Mateo, F., Jiménez, M., & Mateo, E. M. (2021). Potential health risk associated with mycotoxins in oat grains consumed in Spain. *Toxins*, 13(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins13060421>
- Thoden, J. B., Marti-Arbona, R., Raushel, F. M., & Holden, H. M. (2003). High-resolution X-ray structure of isoaspartyl dipeptidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 42(17), 4874–4882. <https://doi.org/10.1021/bi034233p>
- Tolosa, J., Ruiz, M. J., Ferrer, E., & Vila-Donat, P. (2020). Ochratoxin A: occurrence and carry-over in meat and meat by-products. A review. *Revista de Toxicología*, 37(2), 106–110.
- Trivedi, A. B., Doi, E., & Kitabatake, N. (1992). Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(5), 741–745. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.741>

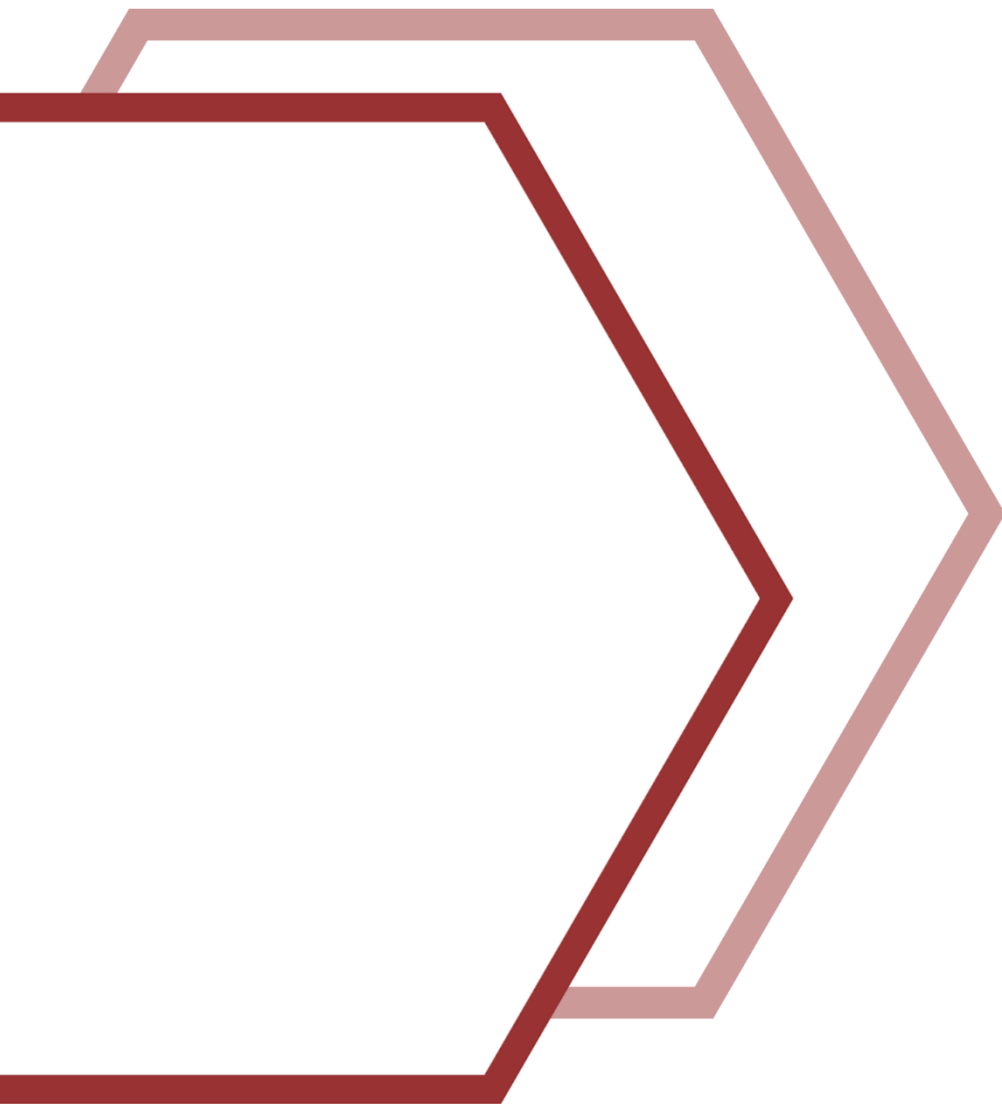
- Troxler, R., Funke, G., Von Graevenitz, A., & Stock, I. (2001). Natural antibiotic susceptibility of recently established coryneform bacteria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20, 315–323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s100960100503>
- Upadhaya, S. D., Yang, L., Seo, J. K., Kim, M. H., Lee, C., Lee, C. H., & Ha, J. K. (2011). Effect of feed types on ochratoxin A disappearance in goat rumen. *Asian-Australasian Association of Animal Production Societies*, 24(2), 198–205. <https://doi.org/https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10318>
- Upadhaya, S. D., Song, J. Y., Park, M. A., Seo, J. K., Yang, L., Lee, C. H., Cho, K. J., & Ha, J. K. (2012). Isolation, screening, and identification of swine gut microbiota with ochratoxin A biodegradation ability. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(1), 114–121. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11104>
- Valero, A., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2008). Brief *in vitro* study on *Botrytis cinerea* and *Aspergillus carbonarius* regarding growth and ochratoxin A. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 327–332. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02434.x>
- Van Der Fels-Klerx, H. J., Liu, C., & Battilani, P. (2016). Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 717–726. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2066>
- van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205, 1112–1113. <https://doi.org/10.1038/2051112a0>
- van Walbeek, W., Scott, P. M., Harwig, J., & Lawrence, J. W. (1969). *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology*, 15(11), 1281–1285. <https://doi.org/10.1139/m69-232>
- Vandamme, P., & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2285–2289. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63247-0>
- Vandrisse, C. M., & Escalante-Semerena, J. C. (2019). Protein acetylation in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 73, 111–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518>
- Varadharajan, B., & Parani, M. (2021). DMSO and betaine significantly enhance the PCR amplification of ITS2 DNA barcodes from plants. *Genome*, 64(3), 165–171. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0221>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., & Velankar, S. (2022). AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Varga, J., Kocinfé, S., Péteri, Z., Vágvölgyi, C., & Tóth, B. (2010). Chemical, physical, and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. *Toxins*, 2(7), 1718–1750. <https://doi.org/10.3390/toxins2071718>

- Varga, J., Péteri, Z., Tábori, K., Téren, J., & Vágvölgyi, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.034>
- Varga, J., Rigó, K., & Téren, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00230-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00230-0)
- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008>
- Wang, L., Hua, X., Shi, J., Jing, N., Ji, T., Lv, B., Liu, L., & Chen, Y. (2022a). Ochratoxin A: occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 210, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.010>
- Wang, L., Wang, Q., Wang, S., Cai, R., Yuan, Y., Yue, T., & Wang, Z. (2022b). Bio-control on the contamination of ochratoxin A in food: current research and future prospects. *Current Research in Food Science*, 5, 1539–1549. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.09.007>
- Wegst, W., & Lingens, F. (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters*, 17(1–3), 341–344. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00433.x>
- Wei, M., Dhanasekaran, S., Legrand Ngolong Ngea, G., Abiso Godana, E., Zhang, X., Yang, Q., Zheng, X., & Zhang, H. (2022). *Cryptococcus podzolicus* Y3 degrades ochratoxin A by intracellular enzymes and simultaneously eliminates citrinin. *Biological Control*, 168, 104857. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104857>
- Wei, W., Liu, C., Ke, P., Chen, X., Zhou, T., Xu, J., & Zhou, Y. (2021). Toxicological and physiological effects of successive exposure to ochratoxin A at food regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 151, 112128. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112128>
- Wei, W., Qian, Y., Wu, Y., Chen, Y., Peng, C., Luo, M., Xu, J., & Zhou, Y. (2020). Detoxification of ochratoxin A by *Lysobacter* sp. CW239 and characteristics of a novel degrading gene carboxypeptidase cp4. *Environmental Pollution*, 258, 113677. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113677>
- Wu, F. (2008). A tale of two commodities: how EU mycotoxin regulations have affected U.S. tree nut industries. *World Mycotoxin Journal*, 1(1), 95–102. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x011>
- Wu, M. R., Hou, T. T., Liu, Y., Miao, L. L., Ai, G. M., Ma, L., Zhu, H. Z., Zhu, Y. X., Gao, X. Y., Herbold, C. W., Wagner, M., Li, D. F., Liu, Z. P., & Liu, S. J. (2021). Novel *Alcaligenes ammonioxydans* sp. nov. from wastewater treatment sludge oxidizes ammonia to N₂ with a previously unknown pathway. *Environmental Microbiology*, 23(11), 6965–6980. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15751>
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kua, K., Wang, X., Chen, G., & Yuan, Z. (2011). Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, 12, 1–10. <https://doi.org/10.2174/138920011794520026>
- Xiang, D. F., Patskovsky, Y., Xu, C., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Sisco, A. A., Sauder, J. M., Burley, S. K., Almo, S. C., & Raushel, F. M. (2010). Functional identification and structure determination of two novel prolidases from Cog1228 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, 49(31), 6791–6803. <https://doi.org/10.1021/bi100897u>

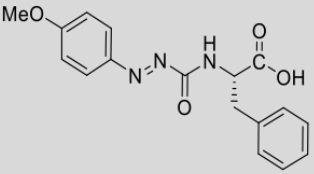
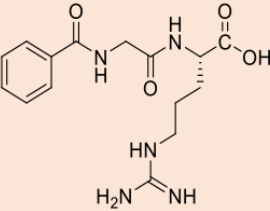
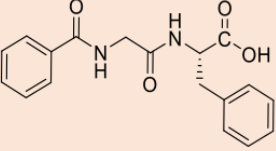
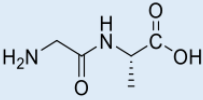
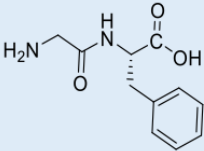
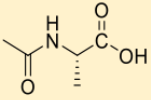
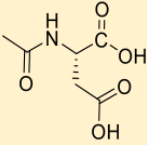
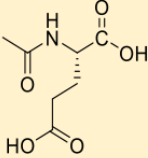
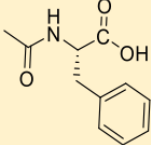
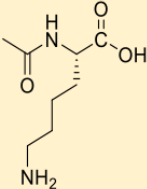
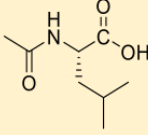
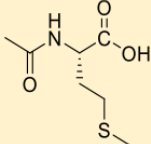
- Xiang, D. F., Patskovsky, Y., Xu, C., Meyer, A. J., Sauder, J. M., Burley, S. K., Almo, S. C., & Raushel, F. M. (2009a). Functional identification of incorrectly annotated prolidases from the amidohydrolase superfamily of enzymes. *Biochemistry*, 48(17), 3730–3742. <https://doi.org/10.1021/bi900111q>
- Xiang, D. F., Xu, C., Kumaran, D., Brown, A. C., Sauder, J. M., Burley, S. K., Swaminathan, S., & Raushel, F. M. (2009b). Functional annotation of two new carboxypeptidases from the amidohydrolase superfamily of enzymes. *Biochemistry*, 48(21), 4567–4576. <https://doi.org/10.1021/bi900453u>
- Xiao, H., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Phillips, G. D., & Vitti, T. G. (1991). Effect of a hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science*, 69(9), 3706–3714. <https://doi.org/10.2527/1991.6993706x>
- Xiong, B., Li, Z., Liu, L., Zhao, D., Zhang, X., & Bi, C. (2018). Genome editing of *Ralstonia eutropha* using an electroporation-based CRISPR-Cas9 technique. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1170-4>
- Xiong, K., Wang, X. L., Zhi, H. W., Sun, B. G., & Li, X. T. (2017). Identification and safety evaluation of a product from the biodegradation of ochratoxin A by an *Aspergillus* strain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(2), 434–443. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7742>
- Xiong, K., Zhi, H., Liu, J., Wang, X., & Zhao, Z. (2020). Detoxification of ochratoxin A by a novel *Aspergillus oryzae* strain and optimization of its biodegradation. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(1), 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.06.001>
- Xu, X., Pang, M., Liu, J., Wang, Y., Wu, X., Huang, K. L., & Liang, Z. (2021). Genome mining reveals the genes of carboxypeptidase for OTA-detoxification in *Bacillus subtilis* CW14. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 800–810. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.085>
- Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Yamamoto, H. (1990). Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiology and Immunology*, 34(2), 99–119. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1990.tb00996.x>
- Yang, Q., Dhanasekaran, S., Legrand, G., Ngea, N., Tian, S., Li, B., & Zhang, H. (2022). Unveiling ochratoxin A controlling and biodetoxification molecular mechanisms: opportunities to secure foodstuffs from OTA contamination. *Food and Chemical Toxicology*, 169, 113437. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113437>
- Yang, Q., Wang, J., Zhang, H., Li, C., Zhang, X. (2016). Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products. *World Mycotoxin Journal*, 9(2), 269–278. <https://doi.org/10.3920/WMJ2015.1911>
- Yang, Y., Zhong, W., Liu, Z., Xue, X., Gao, Q., & Wang, D. (2023a). Isolation and identification of a *Cytobacillus oceanisediminis* strain with ochratoxin A detoxification ability. *Food Control*, 151(29), 109797. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109797>
- Yang, Y., Zhong, W., Wang, Y., Yue, Z., Zhang, C., Sun, M., Wang, Z., Xue, X., Gao, Q., Wang, D., Zhang, Y., & Zhang, J. (2023b). Isolation, identification, degradation mechanism and exploration of active enzymes in the ochratoxin A degrading strain *Acinetobacter pittii* AP19. *Journal of Hazardous Materials*, 465, 133351. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133351>

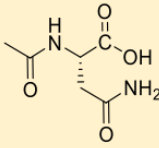
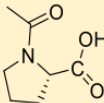
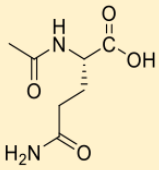
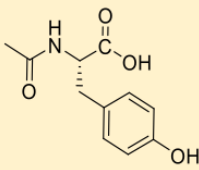
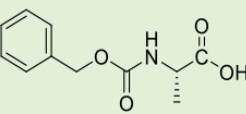
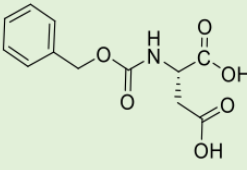
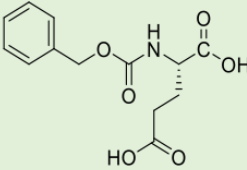
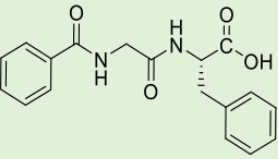
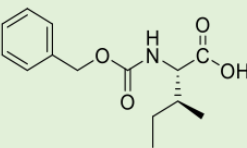
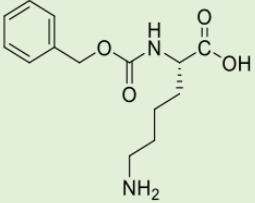
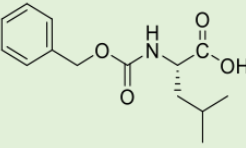
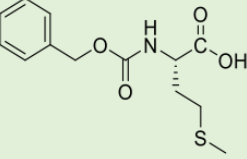
- Zakhia-Rozis, N., Catalá, A.I., & Soriano, J.M. (2007). Trazabilidad y descontaminación/detoxificación de las micotoxinas. En *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, pp. 119-129.
- Zhang, H. H., Wang, Y., Zhao, C., Wang, J., & Zhang, X. L. (2017). Biodegradation of ochratoxin A by *Alcaligenes faecalis* isolated from soil. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 661–668. <https://doi.org/10.1111/jam.13537>
- Zhang, H., Zhang, Y., Yin, T., Wang, J., & Zhang, X. (2019). Heterologous expression and characterization of a novel ochratoxin A degrading enzyme, N-acyl-L-amino acid amidohydrolase from *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 11(9), 518. <https://doi.org/10.3390/toxins11090518>
- Zhang, Y., Li, Z., Lu, Y., Zhang, J., Sun, Y., Zhou, J., Tu, T., Gong, W., Sun, W., & Wang, Y. (2022a). Characterization of *Bacillus velezensis* E2 with abilities to degrade ochratoxin A and biocontrol against *Aspergillus westerdijkiae* fc-1. *Toxicon*, 216, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.07.006>
- Zhang, L., Jiang, Z., Tsui, T. H., Loh, K. C., Dai, Y., & Tong, Y. W. (2022b). A review on enhancing *Cupriavidus necator* fermentation for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from low-cost carbon sources. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.946085>
- Zhang, Y., Li, D., Yan, Q., Xu, P., Chen, W., Xin, H., Wu, D., Zhou, M., Xu, Y., Zhang, A., Wei, W., & Jiang, Z. (2022c). Genome-wide analysis reveals the emergence of multidrug resistant *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain SINDOREI isolated from a patient with sepsis. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.989259>
- Zhao, M., Wang, X. Y., Xu, S. H., Yuan, G. Q., Shi, X. J., & Liang, Z. H. (2019). Degradation of ochratoxin A by supernatant and ochratoxinase of *Aspergillus niger* W-35 isolated from cereals. *World Mycotoxin Journal*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.3920/wmj2019.2446>
- Zheng, R., Qing, H., Ma, Q., Huo, X., Huang, S., Zhao, L., Zhang, J., & Ji, C. (2022). A newly isolated *Alcaligenes faecalis* ANSA176 with the capability of alleviating immune injury and inflammation through efficiently degrading ochratoxin A. *Toxins*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/toxins14080569>
- Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., & Liu, Y. (2015). Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. *Food Control*, 50, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.042>

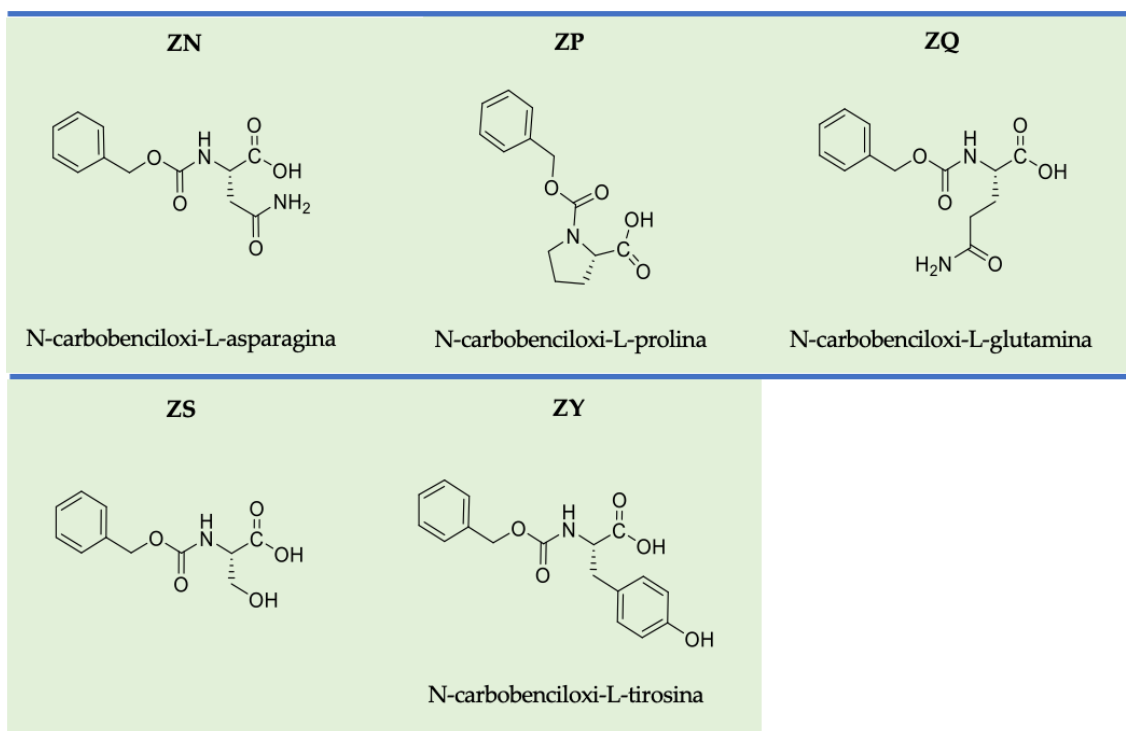
VII. Anexos



ANEXO I. Estructura química de los sustratos empleados en esta tesis

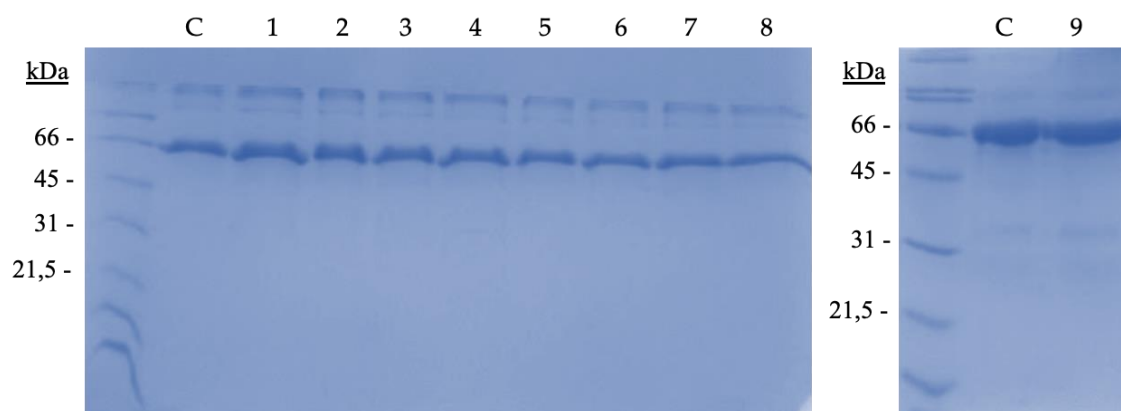
<p>4MF</p>  <p>N-(4-metoxifenilazofornil)-L-fenilalanina</p>	<p>HR</p>  <p>Hipuril-L-arginina</p>	<p>HF</p>  <p>Hipuril-L-fenilalanina</p>
<p>GA</p>  <p>Glicil-L-alanina</p>	<p>GF</p>  <p>Glicil-L-fenilalanina</p>	<p>AA</p>  <p>N-acetil-L-alanina</p>
<p>AD</p>  <p>N-acetil-L-ácido aspártico</p>	<p>AE</p>  <p>N-acetil-L-ácido glutámico</p>	<p>AF</p>  <p>N-acetil-L-fenilalanina</p>
<p>AK</p>  <p>N-acetil-L-lisina</p>	<p>AL</p>  <p>N-acetil-L-leucina</p>	<p>AM</p>  <p>N-acetil-L-metionina</p>

<p style="text-align: center;">AN</p>  <p style="text-align: center;">N-acetil-L-asparagina</p>	<p style="text-align: center;">AP</p>  <p style="text-align: center;">N-acetil-L-prolina</p>	<p style="text-align: center;">AQ</p>  <p style="text-align: center;">N-acetil-L-glutamina</p>
<p style="text-align: center;">AY</p>  <p style="text-align: center;">N-acetil-L-tirosina</p>	<p style="text-align: center;">ZA</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-alanina</p>	<p style="text-align: center;">ZD</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-ácido aspártico</p>
<p style="text-align: center;">ZE</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-fenilalanina</p>	<p style="text-align: center;">ZF</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-isoleucina</p>	<p style="text-align: center;">ZI</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-metionina</p>
<p style="text-align: center;">ZK</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-lisina</p>	<p style="text-align: center;">ZL</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-leucina</p>	<p style="text-align: center;">ZM</p>  <p style="text-align: center;">N-carbobenciloxi-L-metionina</p>



Figuras realizadas con el programa *ChemDraw® Professional 19.0*.

ANEXO II. Ensayo de actividad endopeptidasa sobre albúmina de suero bovino



Actividad endopeptidasa sobre BSA de las proteínas producidas en este trabajo, *Bl*OTasa (carril 1), *Cr*OTasa (carril 2), *Aj*OTasa (carril 3), *An*OTasa (carril 4), *Sd*OTasa (carril 5), *Rw*OTasa (carril 6), *Lc*OTasa (carril 7), *Sn*OTasa (carril 8) y *Ps*SDO (carril 9). También se muestra la proteína BSA incubada sin enzima (C). El marcador de peso molecular *Broad-Range* (*Bio-Rad*, EEUU) aparece a la izquierda. Gel SDS-PAGE 15% de acrilamida.

ANEXO III. Características de las enzimas destoxificadoras de ocratoxina A analizadas en esta tesis

Proteína	Código	Familia	aa/kDa	Hidrólisis de OTA	Rendimiento (mg/L)	T _{ópt} (°C)	pH _{ópt}	Perfil hidrolítico			
								Micotoxinas	A- ^a	Z- ^a	Otros
<i>Af</i> OTasa	WP_026482608.1	M20D	420/44	+++	8,65	55	7	OTA, OTB	AF, AL, AM, AY	ZF, ZL, ZM, ZY, ZS, ZE, ZK	HF, GF
<i>Cn</i> OTasa	WP_0111615094.1	M20D	433/47	+++	4,08	30-55	6,5-7	OTA, OTB	AA, AF, AL, AM, AY, AN, AQ	ZA, ZF, ZL, ZI, ZM, ZY, ZS, ZN, ZQ, ZK	HF, GF, GA
<i>Sn</i> AH	WP_200911391.1	M20D	422/45	+	4,90	-	-	OTA	-	-	-
<i>An</i> OTasa	A0A075TJ05.1	M38	486/52	+++	2,67	65	6-6,5	OTA, OTB		ZF, ZL, ZY	HF, GF
<i>Bl</i> OTasa	WP_101553338.1	M38	410/42	+++	29,76	55	8	OTA, OTB	AF, AL, AY	ZF, ZL, ZM, ZY, ZS, ZN, ZK	HF, GF, GA
<i>Lc</i> OTasa	WP_036192648.1	M38	419/44	+++	2,00	45	6,5-7	OTA, OTB	AA, AF, AL, AM, AY, AQ, AK	ZL, ZI, ZM, ZY, ZS, ZK	HF, GF
<i>Sd</i> OTasa	WP_088366708.1	M38	428/44	+++	13,14	55	6,5	OTA, OTB	AF, AL, AM	ZF, ZL, ZY	HF, GF
<i>Sn</i> OTasa	WP_152984101.1	M38	415/44	+++	2,50	45	6,5	OTA, OTB	AM		HF
<i>Rw</i> OTasa	WP_029994416.1	M38	418/44	+++	3,60	37-45	6,5-7	OTA, OTB	AM		HF, GF
<i>Ps</i> SDO	PWJ76357.1	Cupin	374/42	+	7,10	-	-	OTA, OTB	AA, AF, AL, AM, AY, AE, AK	ZA, ZF, ZE, ZK	HF, GF, GA

T_{ópt}, temperatura óptima; pH_{ópt}, pH óptimo; A-, derivados N-acetil; Z-, derivados N-carbobenciloxi

^aNo se han incluido los sustratos sobre los que la actividad relativa es inferior a 5%

ANEXO IV. Alineamiento de secuencia de *CnOTasa* con proteínas de *Cupriavidus basilensis* Ö16 descritas previamente como degradadoras de ocratoxina A

A

CPA3	CPA1	<i>CnOTasa</i>	CPA2	Proteína
100	17,65	16,79	17,78	CPA3
	100	19,83	17,59	CPA1
		100	34,16	<i>CnOTasa</i>
			100	CPA2

B

CPA3	--MGTMPKRPSPIILRRLLPLCAAGLLCISGLAAATAKTPVHKTKAAHAAAAAPAEPRSGLP	58
CPA1	-----MLNRATPLFASANTCALVTAAIVGAAVV-LAPSPARA-----	36
<i>CnOTasa</i>	MAVRDSASRPTTRFALAGLALAAGLLCNTAQQAQ-TTPAPISA-----DTLHA	46
CPA2	-----MTREPT-LTPF-----QLLP	14
:		
CPA3	GSVTTALKRAHVPAASATSFYVIKVGAPAPRVSWNAQTPMNPASTMKLVTTFAGLQLL-GP	117
CPA1	QGV----P--MPQVAAKSWMLFDVTSQQALASQNAADVRIEPASLTKLMTAYLAFALKEK	90
<i>CnOTasa</i>	QIE----T--RAKAVEKQLIAWRDI-----HQHPGLGNYETRTAKLVADH-----LRKL	90
CPA2	HLL----P--AIQIDAETFIGIRROI-----HAQPELGFVEVGATSKLVATL-----LESW	58
	: : : * : *	
:		
CPA3	GYRWQTALYADNQPGADGTVNGNVYLRGYGDPKLV-----EEMAKLVSAARTAG	167
CPA1	RLTIDQTVVPTTIVQKVKSDSRMFL-EANKPVSVDLLGLIVQSGNDAALALAEAVGG	149
<i>CnOTasa</i>	GMEVKTGVAKTGVVGLKGGKPGFVV-AL-----R-----ADMDALPVKEKRVV	133
CPA2	GVEVHTGIGKSGVVGQLKLGNGQRRL-GI-----R-----ADMDALPVVEATGL	101
	: : : : *	
:		
CPA3	ATTINGDLVLDRSYFDSALDNGATIDGETQRAYNVSPDALLYAFKTLSTITPDPANQSV	227
CPA1	S-----EEGFVAMMNRQAQRMG--KNTHF-----SNTDGI PDPNHYYT	186
<i>CnOTasa</i>	P-----FASKA--KGQYLGKEVDVMHA-----CGH-----DTHVAI	162
CPA2	P-----YASKI--PG-----KMHA-----CGH-----DGHTAI	122
	: : . : . : :	
:		
CPA3	AVSVTPALAQKLDNHLALSNGKCGDWSAR-ARPAVTPQPDGTVLASFDGSYAADCGEHV	286
CPA1	AMDLATLTTIRIKDFP----EYYSMYSQKEFTYKIRQPNRNLRY-----	228
<i>CnOTasa</i>	LLMATAEVLAMKDKQLP----GT-----VKFIFQPAEESPADFEPNGSNTWGAQ	207
CPA2	LLAAAKALADSR-DFD----GT-----LNLIFQPDE-----ENLCGARA	156
	: : : : **	
:		
CPA3	VN-----IATLSHNEFAW--GGFV-----AEWQLAGGRFTHQPALRMG	322
CPA1	-----IDPTVDG-----LKTGHTKS-AGYCLISS-----AKRPLANVPNGS	263
<i>CnOTasa</i>	MVSEGLVDNPKVDIPLGLHVSSGIESGKLGWRSGPSMAAADQFVIDVKGRQTHGARPWGG	267
CPA2	MIEDGLFERFPDCAVAFALHNPMPGVPAGTFRVLPGPVSLSSDVAADVTIKGVGGHGAMPHRA	216
	: . * . .	
:		
CPA3	RAPRNAFLARHYG-QPLSEIVRDINKFSNNVMARQLYLTIGAEMDRGGPATTTRSARKV-	380
CPA1	RRLV-----SIVIGTTTEAV-----RTQESLKIILNYGFQ	292
<i>CnOTasa</i>	IDPI---VVASQIVMGLQTIQSRQVNAMLE-----PSVITVG--TIHGGNRMNIVPEKVE	317
CPA2	RDPI---AASAAIVTALQTVVARNVAP-DD----TAVLSVG--FIRGGATHNVIPESVT	265
	: : : . : .	
:		
CPA3	----VQRWLRARQGLDMPGLVL-----DNGSGLSREERISAYDMSRLLQQ	420
CPA1	FFDTLRLYDRGQVLATPEIYKKESTVKIGVKDETYITVPKGTGGRIK-----PVLERQ	346
<i>CnOTasa</i>	MMGTVVRTYDEGMKKDIHARMKRTTE-----AIATSAGAEANFRVVELYNATINQP	367
CPA2	LGLNVRAARPETRALVEQRIREIVS-----LTAQAQGVAEAHIDYRQLTTPMVTQ	315
	: : . * . : :	
:		
CPA3	ALASEVGPVLMDSLPIIGVDGTLRNRLTRAGAAGNAYMKTGTLNDVRALAGYVDALNGDR	480
CPA1	EL--LVAPLA---A---GQQVG--TVKL-MDGATKVAEFPVVALEDVPEAGF-----	387
<i>CnOTasa</i>	ALTEKMAPTLQRVA---GEGNW--M-I-TPKATASEDFSF-YQEKVPLFFNLGVTPKGQ	419
CPA2	AETTLAQVVCADLV---GADQV-VTQA-PKGLNGSEDFAW-MLNEVPGCYLILGNGEGE-	368
	* : : . *	
:		
CPA3	YVVVSYINHANAQA--ARDAHDALLQWVYQGAP-----	511
CPA1	--FG-R-----LWDTIRLWFKRK-----	402
<i>CnOTasa</i>	DVTKAPSNNHSPFVYVDEPALINGVRAALSILTVDYVMVAQR	459
CPA2	--FGGCMVHNPGYDFNDQVLPGLGAACWVRLAQTYLAG---	403

Matriz de identidad (A) y alineamiento (B) de *CnOTasa* de *C. necator* DSM 13513^T con proteínas de *C. basilensis* Ö16 degradadoras de OTA previamente descritas por Al-nussairawi (2020) (CPA1, CPA2 y CPA3). Se indica (*) identidad entre aminoácidos, (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo. Los guiones representan espacios introducidos para maximizar similitudes. El alineamiento y la matriz de identidad se obtuvieron mediante el programa *Clustal Omega*.

ANEXO V. Alineamientos de secuencias para el diseño de oligonucleótidos degenerados

Género *Alcaligenes*

ANE	MTFSFRLSLLAASCLMAGTAMAQASSGLVDQALS KADALEQQVIEWRRHIHQNPELSYQE	60
APA	MKYSFRLSLLAATCLMASTALAQASNPIIDTAMSKADALEQQVIEWRRHIHQNPELSYQE	60
AFA	MKHSFRLSLLAATCLMAGTALAQASNPMMDTALS KADALEQQVIEWRRHIHQNPELSYQE	60
AAQ	MKNPFCLSLLAATCLMAGTA-AQASNPMMDTAMSKADALEQQVIEWRRHIHQNPELSYQE * . * *****:****. ** ***** . : * * :*****	59
	2049 →	
ANE	HNTAAYIKAALETMPGYEIQGTGIAQTGIKAVLKGKPGPVVALRADMDALPVLERNDLFP	120
APA	HNTAAYIKAALETMPGYEIQGTGIAQTGIKAVLKGKPGPVVALRADMDALPVQERNDLFP	120
AFA	HNTAAYIKAALETMPGYQIQGTGIAQTGVKAVLKGKPGPVVALRADMDALPVQERNDLFP	120
AAQ	HNTAAYIKAALETMPGYQIQGTGIAQTGVKAVLKGKPGPVVALRADMDALPVQERNDLFP *****:*****:*****:***** *****	119
ANE	KSTAKQWQGKEVPVSHACGHDTHVAMLLGAAKVFSDMRDQLPGTVLLFQPAEEQGPGT	180
APA	KSTAKGTWQGKEVSVSHACGHDTHVAMLLGAAKVFSDMRAELPGTIVLLFQPAEEQGPVK	180
AFA	KSVAKGTWQGKEVSVSHACGHDTHVAMLLGAAKVFSDMRDELPGTIVLLFQPAEEQGPVK	180
AAQ	KSVAKGTWQGKEVSVSHACGHDTHVAMLLGAAKVFSDMRDELPGTIVLLFQPAEEQGPVK **.*. ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	179
ANE	PLSGANAMMKEGVLDPKVDVIMGQHIGPAFPAGSIGYRQGSIMASGDVFTITLDGKGGH	240
APA	PLSGANAMMAEGVLDPKVDVVMGQHIGPSYPAGSIGYRQGSIMASGDVFSISLAGKGGH	240
AFA	PLSGANAMMAEGVLDPKVDVVMGQHIGPSYPAGSIGYRQGSIMASGDVFSISLAGKGGH	240
AAQ	PLSGANAMMAEGVLDPKVDVVMGQHIGPSYPAGSIGYRQGSIMASGDVFSISLAGKGGH ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	239
ANE	GSSPWSASSPVVAAAETVVALNNIIAQRTNPLDGTTVVTVGSLQSGNRPNVLPESAHISG	300
APA	GSSPWNAASPVVAAAETVVALNNIIAQRTNPQDGTTVVTVGSLQSGNRPNVLPESADISG	300
AFA	GSSPWNAASPVVAAAETVVALNNIIAQRTNPQDGTTVVTVGSLQSGNRPNVLPESADISG	300
AAQ	GSSPWNAASPVVAAAETVVALNNIIAQRTNPQDGTTVVTVGSLHSGNRPNVLPESADISG *****.*:***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	299
ANE	TVRSLSKMNQATAHDLIKLYAQNIANSGLKSTVKIDTGYEVLISDPAVTQVLVSPALNQA	360
APA	TVRSLSKQNQATAHELIQRYAQNIANHDLKATVRIDTGYEVLVSDPKATQTVIPALDLA	360
AFA	TVRSLSKQNQATAHELIQRYAQNIANHDLKATVRIDTGYEVLVSDPKATQTVIPALDLA	360
AAQ	TVRSLSKHNQATAHELIQRYAQNIANHDLKATVRIDTGYEVLVSDPKATQTVIPALDLA ***** *****:***: ***** .*.***:***:*****:*** .** * ***: *	359
ANE	TDGIGAKEVPPMGSEDFGAFGKNVPLVFWRLNASPYADKPGAPNHSPEFMIDEKALRIG	420
APA	TDGIGAKEVPPMGSEDFGAFGKNVPVFWRLNASPYSDKMGSPNHSPEFMIDEKALRIG	420
AFA	TDGIGAKEVAPMGSEDFGAFGKNVPVFWRLNASPYSDKMGAPNHSPEFMIDEKALRIG	420
AAQ	TDGIGAKEVAPMGSEDFGAFGKNVPVFWRLNASPHSDKMGAPNHSPEFMIDEKALRIG ***:***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	419
	← 2050	
ANE	TRALVASSLTYMIDNKKP	438
APA	TRALLASSLTYMIQSNKP	438
AFA	TRALVASSLTYMMDHKKP	438
AAQ	TRALVASSLTYMMENKKP ****:*****: : **	437

Género *Brevibacterium*

2047

BCA	MVTVFTNAKVFDGTRFVPGRRDVVVDGDRITAITEEGQGSHNAGDEFV DATDRTLVPGII	60
BEP	MVTVLTHATVFDGTRFLPGTRDVIDGGRITSVTEGGQGSHNAGDDYVDCTGKTIIPGVI	60
BLI	MVTVLTHATVFDGTRFLPGTRDVIDGGRIAAVTEGGQGSHNAGDNHIDCTGQTIIPGVI	60
BPE	MVTVLQATVFDGTRFLPGTRDVIDDGRIASVAEGGQGSHNAGDDYVDCTGRTIIPGVI	60
BSE	MVTVLTHATVFDGTRFLPGTRDVIDGGRIASVAEGGQGSHNAGDDHIDCAGKTIIPGVI	60
BAN	MVTVFNKNAKVFDGTRFLPGLRDIVVDGGAISSVTEGGQSHDAGDTYVDCAGKTIIPGVI	60
BAU	MVTVFNKNAKVFDGFRFLAGVRDIVVDGGAIVAVTEGGQSHDAGDTYIDCAGKTIIPGVI	60
	****:.*:***** **: * **:*:*.. * :::* *****:*** .:*.:.:*.:**:*	
	→	
BCA	DCHVHLMSAGAAANVSFAFHDPFSLQFYNSVRHMADTLAGGVTTVRDAGGTDLGTKTAVETG	120
BEP	DCHVHLTSSGAAATANFHDHPFSLQFYNSVANMEATLKGGVTTVRDAGGTDLGAKVAVETG	120
BLI	DCHVHLTSSGAAATSNFHDHPFSLQFYNSVKNEATLKGGVTTVRDAGGTDLGAKVAVETG	120
BPE	DCHVHLTSSGAAATSNFHDHPFSLQFFNSVKNEATLNGGVTTVRDAGGTDLGAKVAVETG	120
BSE	DCHVHLTSSGAAATSNFHDHPFSLQFYNSVKNEATLKGGVTTVRDAGGTDLGAKVAVETG	120
BAN	DCHVHLMSTGASNSSSFHDHPFSLQFYNSVDNMEKTLKGGVTTVRDAGGTDLGAKVAVETG	120
BAU	DCHVHLMSTGASNSSSFHDHPFSLQFYNSVDNMEKTLKGGVTTVRDAGGTDLGAKVAVETG	120
	***** *:**: : *****:*** .* ** *****:***:*.*****	
BCA	VVPGPRLTIAVNIMSQTGGHGDHNLVSGAESPFLLAHPGRPSGVADGVEGVQRKARELLR	180
BEP	VVRGPRLTIAVIMSQTGGHGDHNLVSGAESPFLLAHPGRPSGVADGLEEVQKKARELLR	180
BLI	VVRGPRLTIAVNIMSQTGGHGDHNLVSGAESPFLLAHPGRPSGVADGLEEVQKKARELLR	180
BPE	VVRGPRLTIAVNIMSQTGGHGDHNLVSGAESPFLLAHPGRPSGVADGLEEVQKKTREMLR	180
BSE	VVRGPRLTIAVNIMSQTGGHGDHNLVSGAESPFLLAHPGRPSGVADGLEEVQKKTRELLR	180
BAN	IVRGPRLTIAVNIMSQTGGHGDHNLVSGADSPFLAHPGRPSGVADGLEEVQKKTRELLR	180
BAU	IVRGPRLTIAVNIMSQTGGHGDHNLVSGADSPFLAHPGRPSGVADGLEEVQKKTRELLR	180
	:* **:.:***.***** *****:***** *****:*. **:*:**:*	
BCA	AGADHIKICSTGGVLSRDPDRHSQFSDAEIAMIVAEAAAQGAHVMSHAQQGAPGIKA AVR	240
BEP	AGADHIKICSTGGVLSRDPDRHSQFTEAEIAVIVAEAAAQGASVMMSHAQQGAPGIKNAVR	240
BLI	AGADHIKICSTGGVLSRDPDRHSQFTEAEISVIVAEAAAQGAHVMSHAQQGAPGIKNAVR	240
BPE	AGADHIKICSTGGVLSRDPDRHSQFTEAEIAVIVAEAAAQGAHVMSHAQQGAPGIKNAVR	240
BSE	AGADHIKICSTGGVLSRDPDRHSQFTEAEIAVIVAEAAAQGAYVMMSHAQQGAPGIKNAVR	240
BAN	AGADHIKICSTGGVLSRDPDRHSQFTEAEIAVIVAEAAAQGAHVMSHAQQGAPGIKNAVR	240
BAU	AGADHIKICSTGGVLSRDPDRHSQFTEAEIAVIVAEAAAQGAHVMSHAQQGAPGIKNAVR	240
	*****:***:***** ***** ***** *	
BCA	AGVRSIEHGIYLDDEAIDLMLHEHGTFLVPTLQAPRAVIKAAEAGANMPQSVIDKAKTVID	300
BEP	AGVRSIEHGIYLDDEAIDLMLCEHGTFLVPTLQAPQAVIKAADTGAALPASVVDKARRVVE	300
BLI	AGVRSIEHGIYLDDEAIDLMLREHGTFLVPTLQAPQAVIKAADAGAGLPASVVDKARRVVD	300
BPE	AGVRSIEHGIYLDDEAIDLMLCEHGTFLVPTLQAPQAVIKAADAGAGLPASVVDKARRVVD	300
BSE	AGVRSIEHGIYLDDEAIDLMLHEHGTFLVPTLQAPQAVIKAADAGAGLPASVVDKARRVVD	300
BAN	AGVRSIEHGIYLDDEAIDLMLENGFTLVPTLQAPQAVIKAAEAGSALPQSVVDKAHSVIE	300
BAU	AGVRSIEHGIYLDDEAIDLMLENGFTLVPTLQAPQAVIKAAEAGSALPQSVVDKAHSVIE	300
	***** *:**:*****:*****:*. **:*:**:*	
BCA	AHHSIVRAHEAGVRIAMGTDAGVGPGENLEEISLLAGAGLSGAEALAAGTSVAADLLG	360
BEP	AHQESIARAHEAGVRIALGTDAGVGPGENLEEISLLAEVGLSTTEALAAGTSVAARLLD	360
BLI	AHQESIARAHEAGVRIALGTDAGVGPGENLEEISLLAEVGLSTTEALAAGTSVAARLLD	360
BPE	AHQESIGRAHAAGVRIALGTDAGVGPGENLEEISLLAEVGLSTTEALAAGTSVAARLLD	360
BSE	AHQESISRAHEAGVRIALGTDAGVGPGENLEEISLLAEVGLSTTEALAAGTSVAARLLD	360
BAN	AHQESITRAYEAGVRIAMGTDAGVGPGENLEEISLLAGVGLSTSEALAAGTSVAAEELLG	360
BAU	SHYASITKAHEAGVRIAMGTDAGVGPGENLEEISLLAEVGLSTTEALAAGTSIAVELLLG	360
	:* ** :*: ** *:*****:***** .*** :*****:*. ** *	
	← 2048	
BCA	HEDRGRIAPDLLADLVLDGLSTDDVDRGIEDRVSQVWLGGRV	404
BEP	DDRVRIGAGGLADLVVVDGLRTADVDRGIEENRVNAVYLDGELV	404
BLI	DDRVRIGSEGGLADLVVVDGLRTADVDRGIEDRVNSVYLDGALV	404
BPE	DDRVRIGSEGGLADLVVVDGLRTADVDRGIEDRVNSVYLDGGLV	404
BSE	EDRVRIGEGGLADLVVVDGLRTADVDRGIEENRVNSVYLDGGRV	404
BAN	HDNVGRIEAGALADLVVVDGLSTEDVDRGIESRVSSVHLGGDLI	404
BAU	HDNVGRIEAGALADLVVVDGLSTADVDRGIESRVSSVHLGGALV	404
	.: ** :. *****:***** * *****.*** * ** *	

Género *Lysobacter*

LSP	-----MRPL-----LLLVACALA--PATLLANEANPVAVHCGQVFSRSGEVRGPHTL	46
LCO	MTVR-LVRTAVCTALA-----LSCLSFASHAASGSTALHCGQLFDSRSGDVLGPHTV	51
LEN	MPRTLTRPTAAAPLALAVLACALAGAAQAAPPAEPTALRCGKLFDAKSGKLLGPHTV	60
LCA	-----MTRLATAVSIALAAAAGAFAPALAAAAPAEPLALQCGKLFDAKSGKLVGARTV	54
LSO	----MLKPLSLALLAAIASI--PVHAEAQTAAPAKDAAQALQCGQVFDARSGLTGPQTL	54
LDA	-----MRYCLPA-----LVLMMTALPAAAATTALQCGDVFDAKSGKLVGARTI	43
LNI	----MKPLALALAA-----IT-ASVAHAHAEPARALHCGQLFDAKSGKLLDARTV	45
	:.**:**:*	
LSP	LVRNGRIEQMVTGGHADVLGTPSIDLRGHTCMPGWTDLHVHLGSSQSSPDSYSEGFRLLDDV	106
LCO	LIRDDRIAAVTAGHA-EVPGTPGIDLSGHTCTPGWTDLHVHLGSSQSSPDSYSEGFRLLDDV	110
LEN	TVRDGKIAEVRAGLN-DVAGARAVDLSQHTCTPGWTDLHVHLGSSQSSAQSSEGFRLDPV	119
LCA	VVRDGGKIEVLDGRA-EAPGARAIIDLSQHTCTPGWTDLHVHLGSSQSSPQSYSEGFRLDEV	113
LSO	LVRNGKIEQVIGGASADVAGATRVLDLSGHTCMPGWTDLHVHLGSSQSSPQSYSEGFRLLDDV	114
LDA	VVRDGGKVAEVLPSGS-SVADARAIDLSGHTCTPGWTDLHVHMASQSSPQSYSEGFRLLDDV	102
LNI	VVRDGGKVAEVLPGA-SVADAQSVLDLSGHTCTPGWTDLHVHMGSSQSSPQSYSEGFRLLDDT	104
	:*:.: : . . . : ** ** *	
	2156	
LSP	DYAFRSVGYARKTLLAGFTSVRDLGGEVAPHLRDAINQGLVDGPRIWAAGKSIATTGGHA	166
LCO	DYAFRSVGYAKKTLLAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAINQGLVDGPRIWAAGKSIATTGGHA	170
LEN	DFAFRAVGYANKTLQAGFTSVRDLGGEVTPHLRDAINQGLVAGPRIWAAGKSIATTGGHA	179
LCA	DFAFRAVGYANKTLQAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAINQGLVEGPRIWAAGKSIATTGGHA	173
LSO	DYAFRSVDYAKKTLMAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAINQGLVSGPRIWAAGKSIATTGGHA	174
LDA	DFAFRSVDYAKKTLMAGFTSVRDLGGEVAPHLRDAINQGLVDGPRIWAAGKSIATTGGHA	162
LNI	DYAFRSVGYAKKTLLAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAINQGLVDGPRIWAAGKSIATTGGHA	164
	*:***:*.**.*** *	
	→	
LSP	DPTNGYNSMLSHLLGPPGPTTEGVINSVDEARQAVRQRYKEGSDVIKIDTATGGVLSYARSG	226
LCO	DPTNGYNSLHLLGPPGPTTEGVINSVADARQAVRQRYKDGSDVIKIDTATGGVLSYARSG	230
LEN	DPTNGMNDALSHLIGPPGPTTEGVINSIDARQAVRQRYKEGSDVIKIDTATGGVLSYAKSG	239
LCA	DPTNGYNDALSHLIGPPGPTDGVINSIDARQAVRQRYKEGSDVIKIDTATGGVLSYAKSG	233
LSO	DPTNGYNDALSHLIGPPGPTTEGVINSIDARQAVRQRYKEGSDVIKIDTATGGVLSYAKSG	234
LDA	DPTNGVNSVLAHLIGPPGPTTEGVINSIDARQAVRQRYKEGSDVIKIDTATGGVLSYAKSG	222
LNI	DPTNGYNDALSHLIGPPGPTTEGVINSIDARQAVRQRYKEGSDVIKIDTATGGVLSYAKSG	224
	* *	
LSP	DAPQFTVDEVSAVVQTAKDYGVAHAHAHGEEMRRAVEAGVTSIEHGTYSDEVMMLMK	286
LCO	DAPQFRVDEIQAVDITAKDYGVAHAHAHGEEMRRAVEAGVTSIEHGTYSDEVMMLMK	290
LEN	DAPQFTVEEVKAIVDTAKDYGVRVAHAHAHGEEMKRAVLGGVTSIEHGTYSPEVMSLMK	299
LCA	DAPQFTVEEVKAIVDTARDYGYRVAHAHAHGEEMKRAMLGGVTSIEHGTYSMTDEVMSLMK	293
LSO	DAPQFTVEEVKAIVDTAKDYGVRVAHAHAHGEEMKRAVLGGVTSIEHGTYSDEVMMLMK	294
LDA	DAPQFTVEEVKAIVDTAKDYGVRVAHAHAHGEEMKRAVLGGVTSIEHGTYSMTDEVMSLMK	282
LNI	DAPQFTVDEVKAIVDTAKDYGVRVAHAHAHGEIRRAVQGGVTSIEHGTYSPEVMSLMK	284
	* *	
LSP	QRGTWYIPTIHAGRFVAEKAEIDGYFPEVVRPKAARIGALIQDTAARAHRAVGVKIAFGTD	346
LCO	RKGTWYVPTIYAGRFVADKAKIDGYFPDVRPKAARIGELIQATAARAYKAGVKMAFGTD	350
LEN	QRGTWYVPTIYAGRFVADKAKIDGYFPDVRPKAARIGAMIQQTAANAYKNGVKIAFGTD	359
LCA	QKGTWYIPTIYAGRFVADKAKIDGYFPDVRPKAARIGALIQDTAARAYKNGVKIIFGTD	353
LSO	QHGTWYVPTIYAGRFVADKAKIDGYFPDVRPKAARIGALIQDTAANAYKNGVKIAFGTD	354
LDA	QKGTWYIPTIYAGRFVAEKAKMDGYFPEVVRPKAARIGALIQDTAEKAYKSGVKIAFGTD	342
LNI	QKGTWYVPTIYAGRFVADKAKVDGYFPELVRPKAARIGALIQDTASRAYKNGVKIAFGTD	344
	:**	
	←	
LSP	MGVGPBGDNAREFLYMVEAGIPAAQALQAATIRAAEVLGVDDQGVLAPEGKRAVAVVRGN	406
LCO	MGVGPBGDNAREFVYLVEAGVPAVALQMATIRAAEVLGVDDQGVIAPEGKRAVAVVRGN	410
LEN	MGVGPBGDNAREFVYMVEAGIPAAVALQAATIRAAEVLGVDDQGVIEGKRAVAVVRGN	419
LCA	MGVGPBGDNAREFLYMVEAGIPAAVALQAATIRAAEVLGVDDQGVIEGKRAVAVVRGN	413
LSO	MGVGPBGDNAREFIYMVEAGIPAPVAFQAATIRAAEVLGVDDQGVIEGKRAVAVVRGN	414
LDA	MGVGPBGDNAREFLYMVEAGIPAAVALQAATIRAAEVLGVDDQGVIEAGKRAVAVVRGN	402
LNI	MGVGPBGDNAREFVYMVEAGIPAAVALQAATIRAAEVLGVDDQGVIEAGKRAVAVVRGN	404
	* *	
	2157	
LSP	PLDNIETVLDVAFVMDKGVYKQPERDAQATSASAPAP 444	
LCO	PLEDINRVLDVAFVMDKGVVYSQPGTSP----- 438	
LEN	PVADINAVLDVAFVMDKGAIVYKQAL----- 444	
LCA	PVEDINAVMKVEFVMDKGVYKQTF----- 438	
LSO	PLEDIQQVMKVDVMDKGAIVFRTPEA----- 440	
LDA	PLQDIGAVLKVDFVMDKGTVYRQP----- 426	
LNI	PIEDI GAVLKVDFVMDKGVYRQPQ----- 430	
	*: *	

Género *Shingomonas*

SDO	MKT-MFLAALLAAATPALAQTAAAPP-----APPAVTYIHAGALLDRPGQAPRGNSTIIVR	54
SJE	MRKTIAAAALLMGAAMPVVAQT---A-----PASKVTYIHAGALLDRPGQAPRGNSTIIVR	52
SAD	MLKTIATAMVLAMAAPVAQPAAPAAA--APATVAYIHAGALLDRPGQPPRGNSTIIVR	58
SCA	MIRTIATALALAIAGPALAQSAAPAPGAAPVAAKVTYIHAGRLDRPGQPPRGNSTIIVR * : * :. * *.:** *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:*	60
SDO	DGKIAEVRDGFVPPEAGAKLVALNDKFLVPLGLIDLHVHLLGIGGDPLRARM TALNTEQAD	114
SJE	DDKIAEVRNGFVPAEAGAKLVALNDKFLVPLGLIDLHVHLLGIGGDPMRARLSALNIEGAD	112
SAD	DGVVAEIRDGFVAPPAGATLVLSRRFVMPGIMDMHVHLWGIGGDPLRERLARMTTDDAD	118
SCA	DGRIAEVRDGFAPPEGAALIDLKDRFVPLGLIDLHVHLLGIGGDPMRARLLALTNDAD *.:**:*:* *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:**	120
SDO	DVLYGAGNAKATLNAGFTTVRDLGGDPRGIRALRDAVDRGDVTGPTIVNAGTAISVTGGH	174
SJE	NVLYGAGNARATLHAGFTTVRDLGGEPRESIRALRDAVDRGDVDGPTIVNAGTAISVTGGH	172
SAD	DMMTSVANARKTLEAGFTTVRDLGGDARGIRALRDAIERGDVAGPSIVNAGQMSVSGGH	178
SCA	DLLIGISNARVTIDAGFTTIRDPGDDPRSIRALRDAIERGDVAGPTIVNGGLMLSVTGGH ::: . .**:*:*:*:* *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:**	180
	2188 →	
SDO	GDPLNGLAEPYAHAVAQSVNDLDCGPAFCVRRRQIGLGAQVIKTIATGGVLSNVSGGL	234
SJE	GDPLNGIAEPEFAHAVKETVENTCDGPADCVRRRQVGLGAQVIKTIATGGVLSNVSGGL	232
SAD	GDGTNGLAEWADAVHAHQMNVCDAECRRVRRQVGLGAQVIKFAATGGVLSNVAGGL	238
SCA	GDGNSGVRADVAEMI IQKQEQVCDGAVDCARAVRRQIALGAQVIKFAATGGVLSNVSGGL ** *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.	240
SDO	GRAFTPEEMKAI VDTAHNLGRKVAASHAAEGTKAALTAGVDTIEHGSFIDDEAIAMFKK	294
SJE	GRAFTPEEMKAI VDTAHNLGRKVAASHAAEGTKAALAAGVDTVEHGSFIDEETIAAFKR	292
SAD	GRAMTPEEMRAIVETAHALGRKATAHSHAAEGTRAALAEAGVDSVEHASYLDDDTIRLFKA	298
SCA	GRAMTPEEMRAIVETAHGLGRKVAASHAAEGTKAALTAGVDTIEHGSFLDDEAIRLFKE ***:*:*:*:*:* *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *	300
SDO	TGAYLVPTETIAPVAAVAQARSGVLPAAVLPKAEAAAAAMQDSHRRAYKAGVKFAFGTDSG	354
SJE	TGAYLVPTETIAPVAAVAQARAGSLPAAVLPKAEAAAAAMQESHKAYKAGVKFAFGTDSG	352
SAD	KGAWLVPTETIAPIAAQAQARGALPPATIPKAEAAAAAMHASHKRAFAAGVKFAFGTDTG	358
SCA	KGAWLVPTMLAPRAAVAQARGGALPPAVIPKAEAAAAAMFESHKKAIAAGVKIAFGTDTG . **:*:*:* *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *	360
SDO	VSKHGDNGQEFALLVEKVGMPTEAIRSATVTAAEVLNQGDRIGTIEPGKAADIIAVDSS	414
SJE	VSKHGDNAQEFALLVEKVGMPADAIRSATVTAAEVLGQGNIGTIEPGKAADIIAVDAS	412
SAD	VSKHGGNATEFAQLI-DLGMTPAQAIRSATVDAADLLGR-DDLGLLAPGKRADI IAVSGS	416
SCA	VSKHGDNAQEFALMV-KAGMKPADIAAATVNAADALGRKGELGSIIEPGKWADI IAVSGD ***:*:*:* *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.	419
	2189	
SDO	PLQDVRQLERVRVFMHKGDVAKPLTD-----	440
SJE	PLKDVQRQLERVRVFMHKGAVAKPIAE-----	438
SAD	PLEDVTRLEHVDFVMHRGVVAKRPAA-----	442
SCA	PLSDVTRLESVEFVMRRGAVHKAGGKRQGFPPQ **.* *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *.:** *	452

Género *Stenotrophomonas* (SnOTasa)

SMO	--MSFHRSCLAAALLLACAPAWADPVAVHCGRFLFDARSQMRGPHTLLVVDGRIQQVVSG	58
SNI	MPMPIMRRHLAVLLLLACAPACAEPVAVHCGRFLFDARSQQLKGPHTLVVAHGRIQQVLSG	60
SAC	--MP-IRRRLASLLLLACAPAWAEPVAVQCGRFLFDARSQQLKGPHTLLVADGRIRQVLPG * * ** ***** *:****:*****:*****:*. .****:**: *	57
	<u>2160</u> →	
SMO	GNADVLGWQAVDLRDKVCLPGWTDLHVHLGSSAQSYSEGFRLLDPVDYAFRAVGYAEKT	118
SNI	ADADGGGVRSDLRDKVCLPGWTDLHVHLGSSPQSYSEGFRLLDPVDYAFRAVGYAEKT	120
SAC	TGADAAGTRVVDLGDVCLPGWTDLHVHLGSSPQSYSEDFRLLDPVDHAFRAVGYAEKT . ** * : ** ***** ***** ***** .*****:*****:*****	117
SMO	LMAGFTSVRDLGGTVSPHLRDAVAQGLVKGPRIFAAGRSIATTGGHADPTNGWNDQLSHL	178
SNI	LMAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAISQGLLKGPRIFAAGKSIATTGGHADPTNGWNDQLSHL	180
SAC	LMAGFTSVRDLGGEVSPHLRDAINQGLVRGPRIFAAGKSIATTGGHADPTNGWNERLAHL ***** ***** : ** : ***** :*****:*****:*****:*. : **	177
SMO	IGPPGPTQGVVNSVDDARQAVRQRYKEGSDVIKITATGGVLSYARSGDAPQFTVDEVKAI	238
SNI	IGPPGPTQGVVNSVDDARQAVRQRYKEGSDVIKITATGGVLSYARSGDAPQFTVDEIKAI	240
SAC	VGAPGPTQGVVNSVDEARQAVRQRYKEGSDLIKITATGGVLSYARSGDAPQFTVDEIKAV :* ****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*. : **	237
SMO	VETAHDYGFRVAHAHAGTEGMKRAVLGGVTSIEHGTYMDDEVMRLMKQRGTWYIPTFYAG	298
SNI	VDTAHDYGFRVAHAHAGTEGMKRAVLGGVTSIEHGTYMDDEVMRLMKQHGTWYVPTFYAG	300
SAC	VDTARDYGFRVAHAHAGTEGMKRAVQAGVTSIEHGTYMDDEVMRLMKQHGTWYVPTFYAG *.:**.:*****:*****.*****:*****:*****:*****:*****	297
SMO	RFVADKAAIDGYFPEVVRPKAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREF	358
SNI	RFVTDKAAIDGYFPEVVRPKAARIGALISQTAAKAYRNGVKIAFGTDQGVGPHGDNAREF	360
SAC	RFVTEKAAIDGYFPEVVRPKAARIGALISQTAAKAYRNGVRIAFGTDQGVGPHGDNAREF ***:*.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	357
SMO	IYMVEAGIPAAAYALQAATVHAAEVLGVDDQGVLEPGKRADVIALAGDPLEDIGAVMDVRF	418
SNI	IYMVEAGIPAAAYALQAATVHAAQVLGVDDQGVLEAGKRADVIALAANPLEDINAVMDVRF	420
SAC	VYMVEAGIPAAAYALQAATVHAAQVLGVDDQGVLEPGKRADVIALAGDPLEDINAVLDVRF :*****:*****:***** ***** .:*****.**:****	417
	← <u>2161</u>	
SMO	VMKDGVIHKQP	429
SNI	VMKDGVIYKQ-	430
SAC	VMKDGVIYKQ- *****: **	427

ANEXO VI. Publicaciones derivadas de los resultados presentados en esta tesis

Sánchez-Arroyo, A., Plaza-Vinuesa, L., de las Rivas, B., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2023). The salicylate 1,2-dioxygenase from *Pseudaminobacter salicylatoxidans* DSM 6986^T is a bifunctional enzyme that inactivates the mycotoxin ochratoxin A by a novel amidohydrolase activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124230>

Sánchez-Arroyo, A., Plaza-Vinuesa, L., de las Rivas, B., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2024). Structural and functional analysis of the key enzyme responsible for the degradation of ochratoxin A in the *Alcaligenes* genus. *International Journal of Biological Macromolecules*. (En revisión).



<https://orcid.org/0000-0003-3247-9450>