

NOVEL BIO-STRATEGIES FOR THE DETOXIFICATION OF MYCOTOXINS USING LACTIC ACID BACTERIA

Maria, J.C.^{1*}, Laranjo, V.², Abrunhosa L.⁴, António Inês^{1,2}

¹Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801 Vila Real

²Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Biologia e Ambiente, Edifício de Enologia, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal

³CEB-Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

KEYWORDS: Mycotoxins, lactic acid bacteria and carboxypeptidase

The occurrence of mycotoxigenic moulds such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* in food and feed has an important impact on public health and also constitutes a major economic problem. This is due through the synthesis of highly toxic metabolites known as mycotoxins by these kind of moulds. Most of the mycotoxins are carcinogenic, mutagenic, neurotoxic and immunosuppressive, being ochratoxin A (OTA) one of the most important. OTA is toxic to animals and Humans, mainly due to its nephrotoxic properties. Some group of Gram-positive bacteria named lactic acid bacteria (LAB) are able to control moulds' growth, improving the shelf life of many fermented products and reducing health risks due to exposure to mycotoxins. Some LAB are capable of mycotoxin detoxification.

From previous work of our group was observed OTA biodegradation by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. So, we wanted to have a better understanding of this OTA degradation process and identify which molecules were present in this process.

For achieving our aim we used some bioinformatics tools (BLAST, CLUSTALX2, CLC Sequence Viewer 7, Finch TV), we designed specific primers and we did gene specific PCR. Through the employment of bioinformatics tools it was possible to identify several proteins belonging to the carboxypeptidase family that participate in the process of OTA degradation, such as serine type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase and membrane carboxypeptidase.

LAB can play an important role in the mycotoxins detoxification, being carboxypeptidase proteins one of the molecules present in the OTA degradation process.

Acknowledgements: This work was funded by FEDER through COMPETE and by FCT; Ref. FCOMP-01-0124-FEDER-028029 and PTDC/AGR-TEC/3900/2012, respectively. Luís Abrunhosa was supported by grant Incentivo/EQB/LA0023/2014 from ON.2 – O Novo Norte.

NOVAS BIO-ESTRATÉGIAS PARA A DESTOXIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A UTILIZANDO BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO

Maria, J.C.^{1*}, Laranjo, V.², Abrunhosa L.³, Inês, A.^{1,2}

¹Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801 Vila Real

²Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Biologia e Ambiente, Edifício de Enologia, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal

³CEB-Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

Palavras-chave: Micotoxinas, bactérias do ácido láctico e carboxipeptidase

A ocorrência de bolores micotoxigénicos pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* em alimentos para consumo Humano e animal, tem um impacto importante sobre a saúde pública e constitui também um importante problema económico. Isto é devido à síntese por este tipo de fungos filamentosos de metabolitos altamente tóxicos conhecidos como micotoxinas. A maioria das micotoxinas são substâncias cancerígenas, mutagénicas, neurotóxicas e imunossupressoras, sendo a ocratoxina A (OTA) uma das mais importantes. A OTA é uma micotoxina, tóxica para os animais e Humanos principalmente devido às suas propriedades nefrotóxicas. Alguns grupos de bactérias gram positivas nomeadamente as bactérias do ácido láctico (BAL) são capazes de controlar o crescimento de fungos, melhorando e aumentando a vida útil de muitos produtos fermentados e, assim, reduzir os riscos para a saúde provocados pela exposição às micotoxinas. Algumas BAL são, também, capazes de destoxificar certas micotoxinas. Em trabalhos anteriores do nosso grupo foi observada a biodegradação da OTA por estirpes de *Pediococcus parvulus* isoladas de vinhos do Douro.

Assim, com este trabalho, pretendeu-se compreender com maior detalhe o processo de biodegradação da OTA pelas referidas estirpes e identificar quais as enzimas que estão associadas à sua biodegradação.

Para atingir este objetivo utilizaram-se algumas ferramentas bioinformáticas (BLAST, CLUSTALX2, CLC Sequence Viewer 7, Finch TV), desenharam-se primers específicos e realizaram-se PCR específicos para os genes envolvidos.

Através da utilização de ferramentas de bioinformática, foi possível identificar várias proteínas que pertencem à família das carboxipeptidases e que podem eventualmente participar no processo da degradação da OTA, tais como D-Ala-D-Ala carboxipeptidase serínica e carboxipeptidase membranária.

Estas BAL podem desempenhar um papel importante na destoxificação da OTA, sendo as carboxipeptidases uma das enzimas envolvidas na sua biodegradação.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado por fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade - COMPETE e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia -FCT, ref. FCOMP-01-0124-FEDER-028029 e PTDC/AGR-TEC/3900/2012, respetivamente. Luís Abrunhosa recebeu apoio através da bolsa Incentivo/EQB/LA0023/2014 do ON.2 – O Novo Norte.

NOVAS BIO-ESTRATÉGIAS PARA A DESTOXIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A UTILIZANDO BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO



Maria, J.C.^{1*}, Pereira, V.L.¹, Abrunhosa L.³, Inês, A.^{1,2}

¹Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801 Vila Real

²Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Biologia e Ambiente, Edifício de Enologia, Apartado 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal

³CEB-Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

*josecmaria79@gmail.com

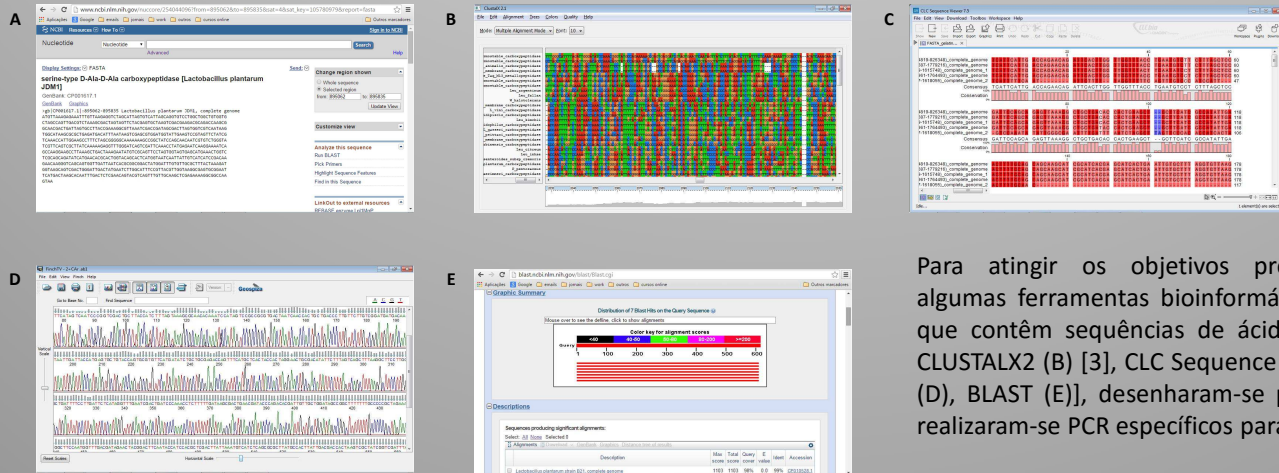
INTRODUÇÃO

A ocorrência de bolores micotoxigénicos pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* em alimentos para consumo humano e animal, tem um impacto importante sobre a saúde pública e constitui também um importante problema económico. Isto é devido à síntese por este tipo de fungos filamentosos de metabolitos altamente tóxicos conhecidos como micotoxinas. A maioria das micotoxinas são substâncias cancerígenas, mutagénicas, neurotóxicas e imunossupressoras, sendo a ocratoxina A (OTA) uma das mais importantes. A OTA é uma micotoxina, tóxica para os animais e humanos principalmente devido às suas propriedades nefrotóxicas. Alguns grupos de bactérias gram positivas nomeadamente as bactérias do ácido láctico (BAL) são capazes de controlar o crescimento de fungos, melhorando e aumentando a vida útil de muitos produtos fermentados e, assim, reduzir os riscos para a saúde provocados pela exposição às micotoxinas. Algumas BAL são, também, capazes de destoxificar certas micotoxinas. Em trabalhos anteriores do nosso grupo [1] foi observada a biodegradação da OTA por estirpes de *Pediococcus parvulus* isoladas de vinhos do Douro.

OBJECTIVOS

Com este trabalho pretendeu-se compreender com maior detalhe o processo de biodegradação da OTA pelas referidas estirpes e identificar quais as enzimas que estão associadas à sua biodegradação.

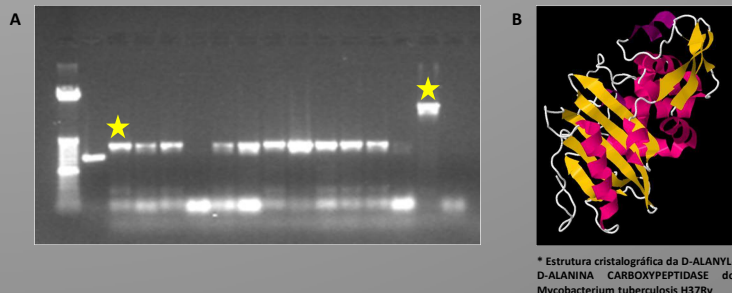
MATERIAL E MÉTODOS



Para atingir os objetivos propostos utilizaram-se algumas ferramentas bioinformáticas [Bases de dados que contêm seqüências de ácidos nucleicos (A) [2], CLUSTALX2 (B) [3], CLC Sequence Viewer 7 (C), Finch TV (D), BLAST (E)], desenharam-se primers apropriados e realizaram-se PCR específicos para os genes envolvidos.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Após realização de PCR para os genes envolvidos e posterior confirmação por sequenciação do produto amplificado, foi possível identificar várias proteínas que pertencem à família das carboxipeptidasas (A) e que podem eventualmente participar no processo da degradação da OTA, tais como D-Ala-D-Ala carboxipeptidase serínica (B) e carboxipeptidase membranas. Estas BAL podem desempenhar um papel importante na destoxificação da OTA, sendo as carboxipeptidasas uma das enzimas envolvidas na sua biodegradação.



REFERÊNCIAS

[1] Abrunhosa L, Inês A, Rodrigues AI, Guimarães A, Pereira VL, Parpot P, Mendes-Faia A, Venâncio A. 2014. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 1: 45-52. [2] NCBI (National Center for Biotechnology Information) - GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [3] Larkin, M.A. et al. 2007. *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.

AGRADECIMENTOS

This work was funded by FEDER funds through the COMPETE and by national funds through FCT, Ref. FCOMP-01-0124-FEDER-028029 and PTDC/AGR-TEC/3900/2012, respectively. Luis Abrunhosa received support through grant Incentivo/EQB/LA0023/2014 from ON.2 – O Novo Norte.