

- lites by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis and Random Amplified Polymorphic DNA PCR. *J Food Protect.* 10:2234-2239.
- Martín A, Córdoba JJ, Aranda E, Córdoba MG y Asensio MA (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Int J Food Microbiol.* 110: 8-18.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Justesen AF y Córdoba JJ (2011a) A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. *Food Control* (enviado).
- Rodríguez A, Luque MI, Andrade MJ, Rodríguez M, Asensio MA y Córdoba JJ (2011b). Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. *Food Microbiol.* 28:1190-1199.
- Rodríguez A, Luque MI, Justesen AF y Córdoba JJ (2011c) Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *Int J Food Microbiol.* 149:226-235.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Martín A y Córdoba JJ (2011d) Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin producing molds in foods. *Food Microbiology* (enviado).
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ y Asensio MA (2010a). Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Pep-tides.* 31:541-547.
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ y Asensio MA (2010b). Characterization of the novel antifungal chitosanase PgChP and the encoding gene from *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:519-528.
- Sánchez B, Rodríguez M, Casado EM, Martín A y Córdoba JJ (2008). Development of an Efficient fungal DNA extraction method to be used in Random Amplified Polymorphic DNA-PCR analysis to differentiate cyclopiazonic acid mold producers. *J Food Protect.* 12: 2497-2503.

Actividad del Grupo de Bacterias Lácticas de Oviedo

Juan Evaristo Suárez Fernández,
en nombre de todos los integrantes, pasados y presentes, del grupo
Universidad de Oviedo

El grupo de bacterias lácticas del Área de Microbiología de la Universidad de Oviedo se formó en 1992, por dos razones: a) la importancia de las fermentaciones alimentarias y especialmente las lácteas, en Asturias y b) el papel de ciertas cepas del género *Lactobacillus* en la protección frente al asentamiento de patógenos sobre las mucosas intestinal y vaginal y la posibilidad de utilizarlas como organismos probióticos, fundamentalmente como parte de alimentos funcionales. En 1996 se constituyó como Unidad Asociada al C.S.I.C a través del Instituto de Productos Lácteos de Asturias, asociación que ha sido renovada recientemente por novena vez.

Estudios preliminares mostraron que los lactobacilos mesófilos eran predominantes en muchas de las fermentaciones de vegetales y quesos llevadas a cabo en Asturias. Debido a ello, nuestro trabajo se centró inicialmente sobre cepas del género *Lactobacillus* y posteriormente se extendió a *Lactococcus*, habiéndose enfocado en la transformación de las materias primas dirigido por las BAL, en el análisis de sistemas naturales de conservación de los productos y en el estudio de los fagos responsables de alteraciones de la fermentación. De modo paralelo, hemos venido trabajando con lactobacilos aislados de vagina, centrándonos en la identificación de las especies más frecuentes, los mecanismos de reconocimiento entre las bacterias y las células epiteliales sobre las que se asientan y los sistemas de antagonismo microbiano que protegen a la mucosa de la invasión por microorganismos patógenos.

Dentro de los resultados obtenidos en estos años podríamos destacar los siguientes:

- Selección de cepas útiles en el desarrollo de iniciadores definidos para quesos artesanales. Para ello se analizaron diferentes propiedades biotecnológicas en 125 cepas de *Lactobacillus* y 600 de *Lactococcus*, aisladas a partir de fermentaciones espontáneas (Herrero *et al.*, 1996).
- Los genes de la α - y β -galactosidasa de *Lb. plantarum* han sido secuenciados y se ha estudiado su expresión (Mayo *et al.*, 1994).

- Se han identificado dos genes de estrés por frío en *Lb. plantarum* y se ha analizado su expresión (Mayo *et al.*, 1997).
- Se han caracterizado dos bacteriocinas producidas por *Lb. plantarum* y *Lc. lactis* respectivamente. La primera es un antibiótico que posee un amplio rango de cepas susceptibles y que ha sido producida en cultivo continuo para utilizarla como preservante natural de quesos. Se ha determinado su secuencia de aminoácidos, su estructura y su modo de acción: abre poros en las membranas biológicas (Turner *et al.*, 1999). La segunda es plasmídica y su gen estructural forma parte de un operón inducible formado por tres proteínas. Inhibe la formación de septos de división y es bactericida (Martínez *et al.*, 2000).
- Se han aislado fagos de *Lb. plantarum* y *Lb. casei*, habiéndose estudiado su morfología, rango de hospedador, estructura del genoma, ciclo de desarrollo, etc. Se ha determinado que la fuente principal de fagos en la industria láctea es la leche de partida, que la pasteurización actúa como agente selector principal sobre el tipo de fagos que se instalarán en la factoría y que ello determina que haya gran variabilidad entre los fagos que se convierten en endémicos (Madera *et al.*, 2004). El fago A2 (Fig. 1) de *Lb. Casei* se ha estudiado con mayor profundidad (Brüssow y Suárez, 2006). La secuenciación del genoma (García *et al.*, 2003), nos permitió conocer sus módulos funcionales. Entre ellos tenemos el conmutador genético que gobierna que el fago siga un ciclo lisogénico o lítico (García *et al.*, 1999). Utilizando el represor, se han diseñado cepas resistentes al virus que fermentan la leche en presencia del fago (Álvarez *et al.*, 1999). Igualmente se ha diseñado un sistema de cuantificación de compuestos genotóxicos muy sensible, que ha sido patentado (Soberón *et al.*, 2007). Adyacente al interruptor está el sistema de integración del genoma fágico, que se ha usado para desarrollar vectores de integración conteniendo el módulo integrasa-*attP*.

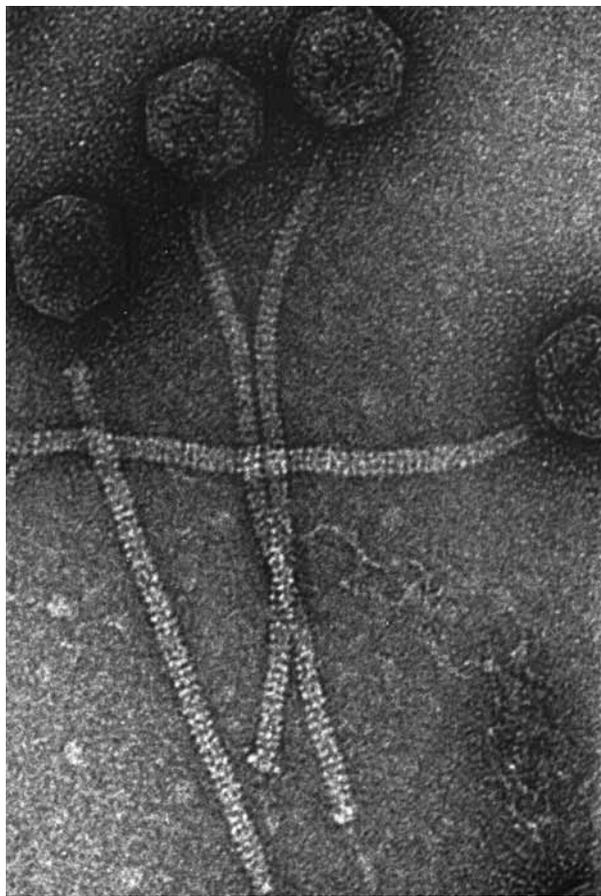


Figura 1. El fago A2. Pertenece a la familia *Siphoviridae* porque tiene cola larga no contráctil. Nótese la espina al final de la cola. El tamaño de los viriones es de unos 300 nm.

Tanto los vectores como las cepas resistentes a virus están protegidos por patente (Álvarez *et al.*, 1998). A partir del estudio del bloque de replicación del ADN viral, localizamos el origen, *oriC*, que utilizamos para obtener cepas resistentes a la infección fágica durante la fermentación de leche (Moscoso y Suárez, 2000). En el bloque morfogenético viral hay dos operones de expresión tardía, el primero de los cuáles media la biosíntesis de las proteínas estructurales y de las terminasas, mientras el otro comprende el conjunto holina-lisina (García *et al.*, 2003; Ribelles *et al.*, 2011). Las dos proteínas mayoritarias de la cápsida y las dos de la cola son el producto de sendos genes, debido a una “secuencia deslizante” en los ARN mensajeros que provoca el retroceso de parte de los ribosomas a la pauta -1 (Rodríguez *et al.*, 2005).

- Se han aislado *Lactobacillus spp.* de vagina e intestino y se ha determinado su capacidad de colonización y adherencia a las mucosas, así como su efecto protector frente a patógenos prevalentes en dichas cavidades. Así, se ha demostrado que los proteoglicanos de la superficie celular eucariótica median la adherencia y se han identificado adhesinas bacterianas con las que establecen interacción específica. El estudio de la producción de agua oxigenada nos llevó a descubrir que actúa sobre los lisógenos, induciendo sus profagos. Esto selecciona bacterias que albergan únicamente profagos defectivos, en su mayoría no

inducibles por el tratamiento con agentes quimioterápicos que activan la respuesta SOS. Por tanto, los lactobacilos vaginales son excepcionales en dos aspectos: producen agua oxigenada y no generan fagos activos aislables de los exudados obtenidos de dicha cavidad (Martín *et al.*, 2010; Martín y Suárez, 2010).

REFERENCIAS

- Álvarez MA, Herrero M y Suárez JE (1998). The site-specific recombination system of the *Lactobacillus* species bacteriophage A2 integrates into gram positive and gram negative bacteria. *Virology*. 250:185-193.
- Álvarez MA, Rodríguez A y Suárez JE (1999). Stable expression of the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 repressor blocks phage propagation during milk fermentation. *J Appl Microbiol*. 86:812-816.
- Brüssow H, Suárez JE (2006) *Lactobacillus* phages. In: Calendar R (ed) *The bacteriophages*, 2nd ed. Oxford University Press, New York. pp. 653-666.
- García P, Ladero V, Alonso JC, Suárez JE (1999) Cooperative interaction of C1 protein regulates lysogeny of *Lactobacillus casei* by bacteriophage A2. *J Virol*. 73:3920-3929.
- García P, Ladero V y Suárez JE (2003). Analysis of the morphogenetic cluster and genome of the temperate *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Arch Virol*. 148:1051-1070.
- Herrero M, Mayo B, Gonzalez B y Suárez JE (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J Appl Bacteriol*. 81:565-570.
- Madera C, Monjardín C y Suárez JE (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* strains bacteriophages in dairies. *Appl Environ Microbiol*. 70:7365-7371.
- Martín R, Escobedo S y Suárez JE (2010). Induction, structural characterization, and genome sequence of Lv1, a prophage from a human vaginal *Lactobacillus jensenii* strain. *Int Microbiol*. 13:113-121.
- Martín R, Soberon N, Escobedo S, Suárez JE (2009) Bacteriophage induction versus vaginal homeostasis: role of H₂O₂ in the selection of *Lactobacillus* defective prophages. *Int Microbiol*. 12:131-136.
- Martín R, Soberon N, Vanechoutte M, Florez AB, Vázquez F y Suárez JE (2008). Evaluation of newly isolated human vaginal lactobacilli and selection of probiotic candidates. *Int Microbiol*. 11:261-266.
- Martín R, Suárez JE (2010). Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*. 76:400-405.
- Martínez B, Rodríguez A y Suárez JE (2000). Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology*. 146:949-955.
- Mayo B, Arca P, González B y Suárez JE (1994). Cloning and expression of the plasmid encoded β-d-galactosidase gene from a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *FEMS Microbiol Lett*. 122:145-152.
- Mayo B, Derzelle S, Fernández M, Leonard C, Ferain T, Hols P, Suárez JE y Delcour J (1997). Cloning and characterization of *cspL* and *cspP*, two cold inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*. 179:3039-3042.
- Moscoso M y Suárez JE (2000). Characterization of the DNA replication module of bacteriophage A2 and use of its origin of replication as a defense against infection during milk fermentation by *Lactobacillus casei*. *Virology*. 273:101-111.
- Ribelles P, Rodríguez I y Suárez JE (2011). LysA2, the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 lysin is an endopeptidase active on a wide spectrum of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotech*. 92: (en prensa).
- Rodríguez I, García P y Suárez JE. (2005). A second case of -1 ribosomal frameshifting affecting a major virion protein of the *Lactobacillus* bacteriophage A2. *J Bacteriol*. 187:8201-8204.
- Soberon N, Martín R y Suárez JE (2007). New method for evaluation of genotoxicity, based on the use of real-time PCR and lysogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 73: 2815-2819.
- Turner DL, Brennan L, Meyer HE, Lohaus C, Siethoff C, Costa H, González B, Santos H y Suárez JE (1999). Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic. *Eur J Biochem*. 264:833-839.