



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA

MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS

Identificación de *Lactobacillus*, genes que codifican las enzimas de la biosíntesis de folatos y cuantificación del ácido fólico en yogur comercial

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOCIENCIAS

PRESENTA:

Q.B.P. ALMA JULIET ORTEGA NAVA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARCO ANTONIO LEYVA VÁZQUEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER JIMÉNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR EXTERNO:

DR. LUIS ARTURO BELLO PÉREZ

Chilpancingo de los Bravo, Gro., Julio ,2017.



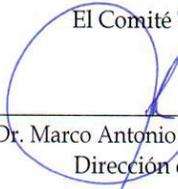
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA
Maestría en Biociencias

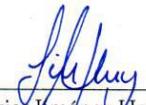
Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. C.P. 39090. Tel 01 747 47 1 93 10 ext: 3601

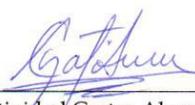
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo el día 1 del mes de junio de dos mil diecisiete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada "Identificación de *Lactobacillus*, genes que codifican las enzimas de la biosíntesis de folatos y cuantificación del ácido fólico en yogur comercial", presentada por la alumna Alma Juliet Ortega Nava, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del Comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
Dirección de tesis

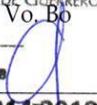

Dr. Javier Jiménez Hernández
Codirección de tesis


Dra. Natividad Castro Alarcón

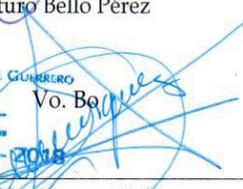

Dr. Arturo Ramírez Peralta


Dr. Luis Arturo Bello Pérez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 Vo. Bo
Coordinación del
Posgrado de la FCQB


Dra. Amalia Vences Velázquez
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 Vo. Bo
Unidad Académica de
Ciencias Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2014-2018


Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas en la Universidad Autónoma de Guerrero bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, la codirección del Dr. Javier Jiménez Hernández, la asesoría de la Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares; la asesoría del Dr. Luis Arturo Bello Pérez en CEPROBI-IPN; el Laboratorio de Investigación en Microbiología bajo la asesoría de la Dra. Natividad Castro Alarcón; el Laboratorio de Bioquímica, Estructura y Termodinámica de proteínas perteneciente a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas en la Universidad Autónoma de Guerrero bajo la asesoría del Dr. Eneas Alejandro Chávelas Adame.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico a través de una Beca de manutención otorgada núm. 411918.

Al proyecto FOMIX “Fortalecimiento del programa de posgrado Maestría en Biociencias” clave: 249671, por el apoyo económico otorgado para realizar el desarrollo del trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Marco A. Leyva Vázquez por la oportunidad de realizar esta tesis, por su confianza, por su gran calidad como ser humano, profesor y director de tesis. De igual manera quiero agradecer a mis profesores de la Maestría en Biociencias por transmitirme sus conocimientos, guiarme y apoyarme siempre. A la Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares, al Dr. Eneas A. Chávelas A., al Dr. Javier Jiménez Hernández, a la Dra. Natividad Castro Alarcón, al Dr. Arturo Ramírez Peralta, al Dr. Luis Arturo Bello Pérez, a la Dra. Ma. Elena Moreno Godínez y al Dr. José Cruz Mora por todas las atenciones y asesorías brindadas. A todo mi sínodo por estar al pendiente de mi trabajo en todo momento, porque siempre recibí el apoyo de parte de cada uno de ustedes, por su disposición, compromiso y aprecio.

Gracias a mi hija Samantha Yulieth Camargo Ortega, a mi mamá Marciana Nava Reyna, a mi padrino Javier D. Lagunas Marín, a mi esposo Omar Nadir Camargo Morales, a mi suegro Leonel Camargo Dimas y a mis demás familiares por su apoyo incondicional y por acompañarme en cada momento de esta travesía.

Al mismo tiempo quiero agradecer a mis hermanos de sangre y a aquellos que los son por elección: Aura, Donaldo, Axel, Amparo, Lizbeth, Augusto, Remberto y Victor; a mis amigos y compañeros de la maestría Adán, Juan Carlos, Joseph, Magui e Itzel, y por supuesto a mis comadres Lilian y Bety.

Por último pero no menos importante a todos aquellos compañeros del Laboratorio de Biomedicina Molecular que me apoyaron siempre y que no menciono por qué no terminaría de escribir sus nombres, a todos ustedes MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIA

Dedico esta TESIS a mi hija Samantha Yulieth Camargo Ortega como la herencia más grande que un ser humano puede poseer y compartir a quien más ama "El conocimiento". Recuerda que los límites tú te los pones pero también tu eres la que decide cuando quitarlos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	19
ANEXOS.....	21
REFERENCIAS.....	25



RESUMEN

Antecedentes: Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias Gram positivas conocidas por conferir efectos beneficios para la salud del humano por la producción de algunas vitaminas entre ellas los folatos. Estos cumplen con funciones esenciales en el metabolismo celular y su deficiencia ha sido implicada en una serie de problemas de salud. Algunas BAL son utilizadas como probióticos los cuales son añadidos en la fermentación de alimentos como el yogur, especialmente las BAL del género *Lactobacillus*. Algunos autores han reportado algunas BAL aisladas de yogur como productoras de folato. La habilidad de los *Lactobacillus* de producir folatos puede conferir una importante habilidad biotecnológica, permitiendo el desarrollo de nuevos yogures bio enriquecidos en folato. **Objetivo:** por lo anterior el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de genes que están involucrados en la biosíntesis de folatos presentes en *Lactobacillus* aislados de muestras de yogur natural y cuantificar la concentración de ácido fólico en las mismas. **Material y métodos:** El diseño de iniciadores se realizó a través del análisis *in silico* utilizando bases de datos curadas y programas bioinformáticos. La identificación y cuantificación de *Lactobacillus* se realizó a través del medio de cultivo selectivo agar Rogosa y el sistema API 50CHL. La cuantificación de ácido fólico contenido en las muestras de yogur natural fue analizada por HPLC de fase reversa. La presencia de los genes codificantes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de folato fue analizada a través de PCR de punto final. **Resultados:** Las especies del género *Lactobacillus* más frecuente en las muestras de yogur analizadas es *delbrueckii*. Las cepas que se encontraron presentes en mayor cantidad fueron *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* con 2.5×10^6 UFC/mL y 2×10^6 UFC/mL respectivamente. En el análisis estadístico no se observan diferencias significativas en la asociación entre la presencia de los genes en cada cepa aislada de las muestras de yogur natural y la concentración de ácido fólico de las mismas. **Conclusiones:** Los genes codificantes de las enzimas involucradas en el ciclo de folatos presentes en *Lactobacillus* aislados de yogur natural comercial parecen ser suficientes para generar DHP, pero no para generar el sustrato de todas las reacciones que se incluyen en la biosíntesis de novo hasta llegar a las formas de folato DHF y THF.

Palabras clave: *Lactobacillus*, genes, enzimas, folato, yogur.



ABSTRACT

Background: Lactic acid bacteria (BAL) are Gram-positive bacteria known to confer beneficial effects to the human health for the production of some vitamins including folates. These effects in cellular metabolism and their deficiency has been implicated in different health problems. Some BAL are used as probiotics which are added in the fermentation of foods such as yogurt, especially BAL of the genus *Lactobacillus*. Some authors have reported some BALs isolated from yogurt as folate producers. The ability of *Lactobacillus* to produce folates can confer an important biotechnological ability, allowing the development of new bio-enriched folate yogurt. **Aim:** the objective of this study was to identify the presence of genes that are involved in the folate biosynthesis present in *Lactobacillus* isolated from samples of natural yogurt and to quantify the concentration of folate. **Materials and methods:** The design of primers was performed through *in silico* analysis using curated databases and bioinformatics programs. The identification and quantification of *Lactobacillus* was done through the selective culture medium Rogosa agar and the API 50CHL system. The quantification of folate contained in the natural yoghurt samples was analyzed by reverse phase HPLC. The presence of genes encoding the enzymes involved in folate biosynthesis was analyzed through endpoint PCR. **Results:** The species of the genus *Lactobacillus* most frequent in the samples of yogurt analyzed is *delbrueckii*. *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii ssp lactis* with 2.5×10^6 UFC/mL y 2×10^6 UFC/mL respectively. In the statistical analysis, there were no significant differences in the association between the presence of the genes in each of them isolated from the natural yogurt samples and the folic acid concentration of the same. **Conclusions:** The genes encoding the enzymes involved in the folate cycle present in *Lactobacillus* isolated from commercial natural yogurt appear to be sufficient to generate DHP but not to generate the substrate from all the reactions that are included in de novo biosynthesis until they reach the forms folate DHF and THF.

Keywords: *Lactobacillus*, genes, enzymes, folate, yogurt.



INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un grupo de microorganismos que están presentes naturalmente en una variedad de nichos ecológicos tales como los alimentos y en el tracto gastrointestinal de animales, incluyendo los seres humanos. Ciertas cepas de BAL probióticas son capaces de producir, liberar y/o aumentar compuestos beneficiosos específicos en alimentos. Estos ingredientes pueden ser macronutrientes o micronutrientes tales como vitaminas y pueden estar naturalmente presentes en ciertos alimentos o añadidos durante el procesamiento (Adolfsson, *et al.*, 2004; Leblanc, *et al.*, 2011). Además de sus propiedades tecnológicas importantes en la producción de alimentos, las LAB pueden conferir propiedades benéficas a sus anfitriones, en particular, los miembros del género *Lactobacillus*, razón por la cual estas bacterias son los microorganismos probióticos utilizados comúnmente (Le Blanc, *et al.*, 2011). El término probiótico se definió como “microorganismo vivo que ingerido en las cantidades adecuadas confiere un beneficio saludable al huésped” (FAO & OMS, 2006). Algunos productos como el yogur contienen microorganismos como probióticos, estos confieren una serie de beneficios para la salud al huésped, entre los que destaca la producción de vitaminas (Parra, 2012; Rossi, *et al.*, 2011).

Wegkamp, *et al.*, 2010 ha descrito que se han realizado estudios con BAL en el que las cepas tienen una producción alta de metabolitos tales como D-alanina, sorbitol, riboflavina y folato. Algunos autores han reportado algunas BAL aisladas de yogur como productoras de folato (Masuda, 2012). El término “folatos” se utiliza de forma genérica para referirse a una familia de vitaminas hidrosolubles del grupo B, concretamente la vitamina B9, que tienen estructura y propiedades nutricionales similares a las del ácido fólico (Fajardo., 2013). Los folatos son un grupo de compuestos heterocíclicos basados en el esqueleto de ácido 4-((pteridin-6-metil amino) benzoico) (Pte o grupo pteroil) conjugado con uno o más residuos de ácido L-glutámico (Glu) (Olivares ., 2005). Los seres humanos son auxotróficos para el folato e incapaces de sintetizar la mayoría de las vitaminas, por lo tanto tienen que ser obtenidas a través de la dieta (Le Blanc, *et al.*, 2011; Le Blanc, *et al.*, 2007; Wegkamp, *et al.*, 2008). Los folatos se encuentran en una amplia variedad de alimentos como en los cereales, legumbres y vegetales o verduras de hojas verdes (Pompei, *et al.*, 2007). Los productos lácteos son



considerados como una excelente fuente de grandes cantidades de vitaminas del grupo B, incluida el folato, a pesar de que algunas vitaminas se pierden durante el procesamiento en la producción del yogur, se ha considerado que el uso y dependiendo del tipo de cultivo bacteriano durante el procesamiento de este alimento potencia la producción de folato y varía ampliamente (Adolfsson, *et al.*, 2004). Las plantas, hongos, algunos protozoarios y bacterias pueden sintetizar folato de novo, a través de una vía biosintética general con algunas modificaciones (Rossi, *et al.*, 2011) (Anexo 1). La síntesis de folato de novo requiere pirofosfato de 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina (DHPPP) y ácido para-aminobenzoico (pABA) (Le Blanc, *et al.*, 2013; Sybesma *et al.*, 2003). La primera enzima de la biosíntesis de folato a partir de pterin es GTP ciclohidrolasa I (EC 3.5.4.16), resultando 7,8-dihidroneopterin trifosfato. Dihidroneopterin aldolasa (EC 4.1.2.25) produce 6-hidroximetil-7,8-dihidropterin, el cual es pirofosforilado por la hidroximetil dihidropterin pirofosfocinasa (HPPK, EC 2.7.6.3) produciendo 6- hidroximethyl-7,8-dihidropterin (de Crécy-Lagard *et al.*, 2007; Wegkamp, *et al.*, 2010).

La moléculas 6- hidroximethyl-7,8-dihidropterin junto con pABA son condensadas por la dihidropteroato sintasa (EC 2.5.1.15), resultando dihidropteroato el cual es glutamatado por la dihidrofolato sintasa (EC 6.3.2.12) obteniendo así dihidrofolato (DHF), este es reducido por la dihidrofolato reductasa (EC 1.5.1.3) a tetrahidrofolato (THF) y la Folilpoliglutamato sintasa (EC 6.3.2.17) adiciona un γ -glutamyl (Rossi, *et al.*, 2011).

La ruta biosintética de folatos en bacterias ha sido estudiada e identificada a través del análisis bioinformático en algunos *Lactobacillus*. La predicción de genes codificantes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de folatos en estas bacterias es utilizada mediante un algoritmo BLAST, realizando el alineamiento de secuencias con base en la identidad de secuencias (Santos, *et al.*, 2008). La biodisponibilidad de secuencias genómicas de varios *Lactobacillus* proveen una importante contribución con respecto a los genes de la biosíntesis de folato en estas bacterias (Le Blanc, *et al.*, 2013).



JUSTIFICACIÓN

En la población mexicana uno de los principales problemas de salud pública es la deficiencia de nutrientes. A través de los años se han implementado diversas estrategias para tratar de solucionar este problema; una de estas estrategias es la fortificación de alimentos con micronutrientes o vitaminas. El ser humano es incapaz de sintetizar la mayoría de las vitaminas incluido el folato, por ello debe ser obtenido de la dieta. El folato es de gran importancia debido a que está implicado en funciones esenciales del metabolismo celular tales como la replicación del ADN, reparación, metilación y síntesis de nucleótidos, síntesis de otras vitaminas y algunos aminoácidos. La deficiencia de folato está asociada con malformaciones del cierre del tubo neural, anemia megaloblástica, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras. El requerimiento recomendado de folato es una ingesta mínima de diaria de 400 μg para un hombre adulto y de 300 μg para mujeres y niños. Es importante identificar alimentos disponibles y de fácil acceso para la población, que sean fuentes de folato. Se ha descrito que algunos productos lácteos fermentados como el yogur, contienen concentraciones de hasta 110 μg de ácido fólico/L. Por otra parte, se conoce que los *Lactobacillus* pueden conferir propiedades benéficas para sus hospederos tales como la producción de vitaminas, por ello se sugiere el uso de estos microorganismos como productores de vitaminas representando una alternativa natural favoreciendo la producción y fortificación de alimentos como el yogur con concentraciones elevadas de vitaminas como el folato. Por tanto, en este estudio se propone realizar la identificación de genes codificantes de las enzimas que participan en el ciclo de folato presentes en *Lactobacillus* aislados de yogur natural comercial y cuantificar la concentración de ácido fólico presente en dichas muestras con la finalidad de obtener datos que aporten información que permita identificar y determinar que cepas favorecen la biosíntesis de folato y puede representar un importante potencial biotecnológico en la industria alimentaria para el desarrollo de yogur naturalmente bioenriquecido en folato.



OBJETIVOS

General:

Identificar los genes de la biosíntesis del folato presentes en *Lactobacillus* y determinar la concentración de ácido fólico en yogur natural comercial.

Específicos:

1. Diseñar iniciadores a través del análisis *in silico* para los genes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de folato en *Lactobacillus*.
2. Identificar especies del género *Lactobacillus* presentes en yogur natural comercial.
3. Determinar los genes de la biosíntesis del folato presentes en *Lactobacillus* aislados de yogur natural comercial.
4. Cuantificar la concentración de ácido fólico en yogur natural comercial.



MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de la investigación

Estudio: observacional transversal.

Objeto de estudio: yogur natural comercial.

Tipo de muestreo: Por conveniencia.

Tamaño de la muestra: 10 muestras de yogur natural comercial.

a) *Criterios de selección de los sistemas de estudio.*

Criterios de inclusión: Muestras de yogur natural comercial sin caducar que contengan únicamente cultivos lácticos (género *Lactobacillus*).

Criterios de exclusión: Muestras de yogur natural comercial que contengan otras bacterias ácido lácticas diferentes al género *Lactobacillus* y aquellas muestras con ácido fólico adicionado.

Criterios de eliminación: Muestras de yogur natural comercial mal conservadas o son sello de seguridad violado

b) *Variables.*

- Variable dependiente: concentración de folato.
- Variable independiente: especies de *Lactobacillus* y genes que codifican las enzimas que participan en la biosíntesis de folato.

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Nombre y definición	Instrumento de medición	Tipo y escala de medición	Unidades y/o categorías de medición	Formas de análisis
VARIABLE DEPENDIENTE				
Concentración de folato	HPLC	Cuantitativa/ continua	µg/100g	Frecuencia absoluta, relativa y prueba de ji cuadrada
VARIABLE INDEPENDIENTE				
Especies de <i>Lactobacillus</i>	Cultivo de especies de <i>Lactobacillus</i>	Cualitativa/ dicotómica	0= Ausente 1= Presente	Frecuencia absoluta y relativa
Genes que codifican a las enzimas que participan en el ciclo del folato	PCR (Termociclador)	Cuantitativa/ continua	pb	Frecuencia absoluta y relativa



c) Consideraciones éticas y de bioseguridad

Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, Especificaciones Físicoquímicas y Microbiológicas, Información Comercial y Métodos de Prueba. El manejo y eliminación de residuos peligrosos biológicos infecciosos se realizará de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Diseño de iniciadores para los genes codificantes de enzimas del ciclo de folatos

Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes que codifican para las enzimas involucradas en el ciclo del folato (Anexo 1): dihidrofolato reductasa (EC. 1.5.1.3), GTP ciclohidrolasa 1 (EC. 3.5.4.16), glicerofosfatasa (EC. 3.1.3.1), dihidroneopterin aldolasa (EC. 4.1.2.25), 7,8-dihidroxi-metilpterin-pirofosfocinasa [HPPK] (EC. 2.7.6.3), 3-deoxi-7-fosfoheptunolato sintasa (EC. 2.5.1.54), dihidrofolato sintasa (EC. 6.3.2.12), folilpoliglutamato sintasa (EC. 6.3.2.17), dihidropteroato sintasa (EC. 2.5.1.15), 4-amino-4-deoxicorismato liasa (EC. 4.1.3.38), nudix pirofosfohidrolasa (EC. 3.6.1.-), corismato sintasa (EC. 4.2.3.5), enolpiruvilshikimato fosfato sintasa [EPSP sintasa] (EC. 2.5.1.19), shikimato cinasa (EC. 2.7.1.71), shiquimato oxidoreductasa (EC. 1.1.1.25), 3-dehidroquinato hidrolasa (EC. 4.2.1.10), 3-dehidroquinato sintasa (EC. 4.2.3.4) y aminodeoxicorismato sintasa (EC. 2.6.1.85) en cepas de *Lactobacillus* a través del análisis *in silico* utilizando las bases de datos NCBI y UniProtK (ENA). El alineamiento de secuencias FASTA entre diferentes especies de *Lactobacillus* se realizó con el programa Biology WorkBench. Para el diseño de iniciadores y la validación se utilizaron los programas *In silico* PCR Amplification, Sequence Manipulation Suite, Primer 3 y *e!* EnsemblBacteria (Anexo 2).

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *Lactobacillus* fueron aisladas de nueve muestras de yogur natural de marcas comerciales para ser cuantificadas e identificadas bioquímicamente (tabla 2). Los *Lactobacillus* fueron cultivados en el medio agar Rogosa OXOID® llevado a pH 5.4 ± 0.2 cuya



composición en g/L es: triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; glucosa, 20 g; polisorbato Tween 80, 1 mL; fosfato monopotásico, 6 g; citrato de amonio, 2 g; acetato de sodio anhídrido, 17 g; sulfato magnésico, 0.575 g; sulfato de manganeso, 0.12 g; sulfato ferroso, 0.034; agar, 20 g; 1.32 mL de ácido acético glacial. Las condiciones de incubación fueron a 37 °C bajo tensión de CO₂ durante 24 horas para el aislamiento previo a la identificación bioquímica y de 72 a 96 horas para la cuantificación de *Lactobacillus*.

La producción de biomasa de las cepas aisladas para realizar la extracción de ADN por el método de choque térmico se llevó a cabo en caldo Luria Bertani (LB) cuya composición en g/L es : cloruro de sodio 5.0, extracto de levadura 5.0, peptona de caseína 10.0 (pH 7.2 ± 0.2). El cultivo fue incubado durante 48 horas a 37°C con agitación a 200 rpm y bajo tensión parcial de CO₂.

Cuantificación de Lactobacillus

La cuantificación de los *Lactobacillus* (tabla 2) se realizó mediante el recuento de colonias haciendo microdiluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁶ y se siembran las últimas 3 microdiluciones en cajas con medio de cultivo Rogosa Agar, depositando 10 µL en cuadrantes organizados por cada dilución. Esta cifra se multiplica por el factor de dilución de la muestra para obtener las UFC/g de muestra.

Identificación bioquímica de Lactobacillus

Las cepas fueron identificadas bioquímicamente mediante el sistema API 50CHL de la marca Biomerieux bajo las condiciones de incubación establecidas por el proveedor utilizando el cultivo de *Lactobacillus* en caldo LB incubado previamente durante 48 horas a 37°C con agitación (200 rpm) y bajo tensión de CO₂.

Identificación de genes codificantes de las enzimas que participan en el ciclo de folatos

La presencia de los genes que codifican a las enzimas que participan en el ciclo del folato se determinó realizando reacciones en cadena de la polimerasa de punto final (PCR por sus siglas en inglés). La PCR se realizó con 20 ng de ADN genómico; la mezcla de reacción fue la



siguiente: buffer de PCR Mater Mix 2X (concentración final 1X), $MgCl_2$ (concentración final 4 mM), desoxinucleótidos trifostato (concentración final 0.4 mM), iniciadores (concentración final 10 μM) y 0.05 U/ μL de Taq ADN polimerasa. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C, las temperaturas de alineamiento serán específicas para cada gen (Anexo 3), y extensión a 72 °C, todos durante 30 segundos. Con un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 minutos y uno final de extensión a 72 °C por 5 minutos. Como control positivo se utilizó ADN de *Lactobacillus plantarum* ATCC WCFS1 y ADN de *Lactobacillus* (probiótico VSL#3 y co-cultivos aislados de yogur). Como control negativo se utilizaron muestras sin ADN para cada PCR respectivamente. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en buffer TAE, teñido con bromuro de etidio y visualizando bajo luz UV.

Cuantificación de folato por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Teniendo en cuenta las propiedades químicas del folato se lleva a cabo la extracción pesando 10 g de yogur y se añade 40 mL de H_2O pH 5 a 45 °C con agitación magnética en un homogeneizador (Ultra Turrax-IKA) a 8000 rpm por 10 minutos, posteriormente se aforó a 50 mL y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos seguido de una filtración en membrana con poro de 0.45 μm .

La cuantificación de ácido fólico se realizó por HPLC en fase reversa en un equipo Waters 515 acoplado a un detector Waters UV-Vis 2487 (λ , 254 nm) y a un detector de fluorescencia Waters (λ excitación= 440 nm, λ emisión= 565 nm,). La separación se realizó en una columna Thermo Scientific™ Hypersil™ ODS C18 (150mm * 4.6 mm * 0.5 μm), la fase móvil fue buffer de fosfatos 0.1 N: metanol (85:15) conteniendo 5 mM de hexansulfonato de sodio y un flujo de 0.8 mL/min (Albalá-Hurtado *et al*, 1997). Los valores de área obtenidos se interpolan en la curva patrón de ácido fólico de 0.005-0.04 $\mu g/mL$ (Figura 1).

Análisis estadístico

Se calcularon frecuencias simples mediante el programa STATA 11.0. Las asociaciones entre las variables se calcularon mediante la prueba de ji cuadrada. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de $P < 0.05$.



RESULTADOS

Diseño de iniciadores a través del análisis *in silico*.

La búsqueda de las enzimas que están involucradas en el ciclo de la biosíntesis de folatos por bacterias ácido lácticas está sustentada con base a las publicaciones de Rossi, *et al.*, 2011; LeBlanc *et al.*, 2013; Tuesink, Bas *et al.*, 2005 y la base de datos Kegg (Anexo 1). El nombre de las enzimas involucradas en la biosíntesis de folato es correspondiente a la nomenclatura utilizada por la comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (E.C.). Utilizando las bases de datos de bioinformática Uniprot y NCBI se archivaron las secuencias correspondientes a la secuencia de cada enzima (Anexo 2).

El resultado del alineamiento de secuencias correspondientes a cada enzima específicas para el género *Lactobacillus* se realizó en al menos 5 especies de *Lactobacillus* obteniendo una región de 200 pb altamente conservada entre las especies del género *Lactobacillus*, a partir de la cual se realizó el diseño de iniciadores (tabla 1).

Tabla 1. Lista de iniciadores para los genes codificantes de las enzimas del ciclo de folatos presentes en el género *Lactobacillus* diseñados a través del análisis *in silico*

Enzima (E.C.)	Iniciadores		Producto esperado (pb)
3.6.1.-	F.- GGTGAGCTGCCGATTAAGT	R.- CGAAAGTCGACGTGTGATG	155
3.5.4.16	F.TCGTCTGAGGGGTTGGATAA	R.-ACGTAAGCAATGTGGGCTTT	155
4.2.3.5	F.TGGATGAGATTAGTTGGGATGA	R.-GGTCGCGATATCCACACTTT	164
2.5.1.19	F.- TAAATTCGGGCGAGAGATTG	R.- TTTCTGGTCGGCAATTTTTC	186
2.7.1.71	F.-AAAGAGTGGACAAGATGAGAATTG	R.- AAAATTTCCGGGATGGTCAG	154
1.1.1.25	F.- GCGAAACCAAGCTTATGCAG	R.- GGTTCACCAAACACCGTCTC	157
4.2.3.4	F.-GATTTATATGCGCGGTATTGC	R.- AGAATTGCCGGATCAATGAC	162
4.1.3.38	F.- TGAACCATACTACGCGCAA	R.- GCGCCACTTAGCATCTAACC	151
2.6.1.85	F.- TTATTGGTATTGCGGGATCG	R.- CCTTGAACATGAGCCATTTG	178
6.3.2.12	F.- CTTACCAGCCGCTTTGAG	R.- TCAGCAACCGCCTTATCTTT	165
6.3.2.17	F.- GTGTTTTGACCGAGGTTGCT	R.- AAAACGCAACCATTGACTCC	185
2.5.1.15	F.- TGAGCACCGGTTAATCTCA	R.- CGATTACGTCAGCTCCTGCT	152



Identificación bioquímica y cuantificación de *Lactobacillus*

Las muestras de yogur natural comercial analizadas para la identificación y cuantificación de *Lactobacillus* fueron nueve, dentro de las que se encuentra el yogur de tipo normal, light y griego, para ello se consideró la metodología previamente mencionada. En la identificación de *Lactobacillus* las especies del género *Lactobacillus* que predomina es *delbrueckii*, esta especie se identificó en seis de las muestras analizadas, de las cuales cuatro corresponden a la subespecie *lactis* y las otras dos corresponden a las subespecies *bulgaricus* y *delbrueckii* (Tabla 2). Otras especies que fueron identificadas son: *acidophilus* y *plantarum*. Para la cuantificación de *Lactobacillus* las cepas que se encontraron presentes en mayor cantidad fueron *Lactobacillus plantarum* (Alpura normal) y *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* (Lala normal) con 2.5×10^6 UFC/mL y 2×10^6 UFC/mL respectivamente.

Cuantificación de ácido fólico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En la Figura 1 se muestra la curva patrón de ácido fólico con un coeficiente $r = 0.9976$ obtenida mediante el análisis por triplicado de soluciones estándar a partir de la cual se realiza la cuantificación de ácido fólico en las muestras. La concentración de ácido fólico de las muestras de yogur natural comercial analizadas se encuentra en un rango de entre 1.17 y 5.47 ($\mu\text{g}/100$ g de yogur) correspondiendo a las muestras de yogur natural normal marca *Yoplait* y yogur natural normal marca *Lala* respectivamente (tabla 2). También se realizó la cuantificación de ácido fólico en una muestra de leche en la cual se obtuvo una concentración de 4.4 ($\mu\text{g}/100\text{mL}$ de leche) (Anexo 4). En el análisis estadístico no se observan diferencias significativas en la asociación entre las UFC/mL y la concentración de ácido fólico de las muestras analizadas. En la Figura 2 se muestra un gráfico de regresión lineal en el cual se muestra que no hay una relación lineal entre las UFC de *Lactobacillus* y la concentración de folato cuantificado en las muestras analizadas.

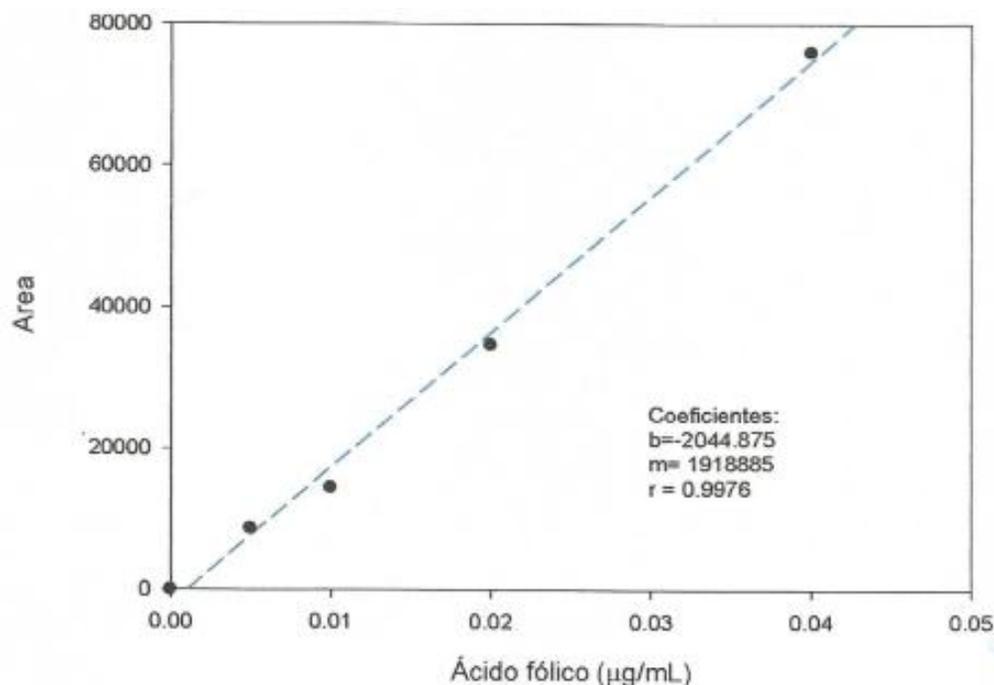


Figura 1. Curva patrón de ácido fólico. Se realizó la curva de calibración a partir de 4 soluciones estándar de ácido fólico a diferentes concentraciones (0.0 µg/mL, 0.005 0.01 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.04 µg/mL). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 2. *Lactobacillus* aislados de nueve muestras de yogur natural de marcas comerciales

Tipo de yogur	Marca	Probiótico aislado	UFC/mL	Ácido Fólico (µg/100 g)
Light	Yoplait (YL)	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis 1</i>	1.6X10 ⁶	1.99
Normal	Vitalinea (VN)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1.5X10 ⁶	3.73
Normal	Nutriyogur (NN)	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis 1</i>	1.5X10 ⁶	3.85
Normal	Alpura (AN)	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	2.5X10 ⁶	1.41
Normal	Danone (DN)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1.5X10 ⁷	2.08
Normal	Yoplait (YN)	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	1X10 ⁶	1.17
Normal	Lala (LN)	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis 1</i>	2X10 ⁶	5.47
Griego	Oikos (OD)	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp lactis 1</i>	1.3X10 ⁶	1.49
Griego	Yoplait (YG)	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	2X10 ⁶	3.82



Figura 1. Curva patrón de ácido fólico. Se realizó la curva de calibración a partir de 4 soluciones estándar de ácido fólico a diferentes concentraciones (0.0 µg/mL, 0.005 0.01 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.04 µg/mL). Las mediciones se realizaron por triplicado.

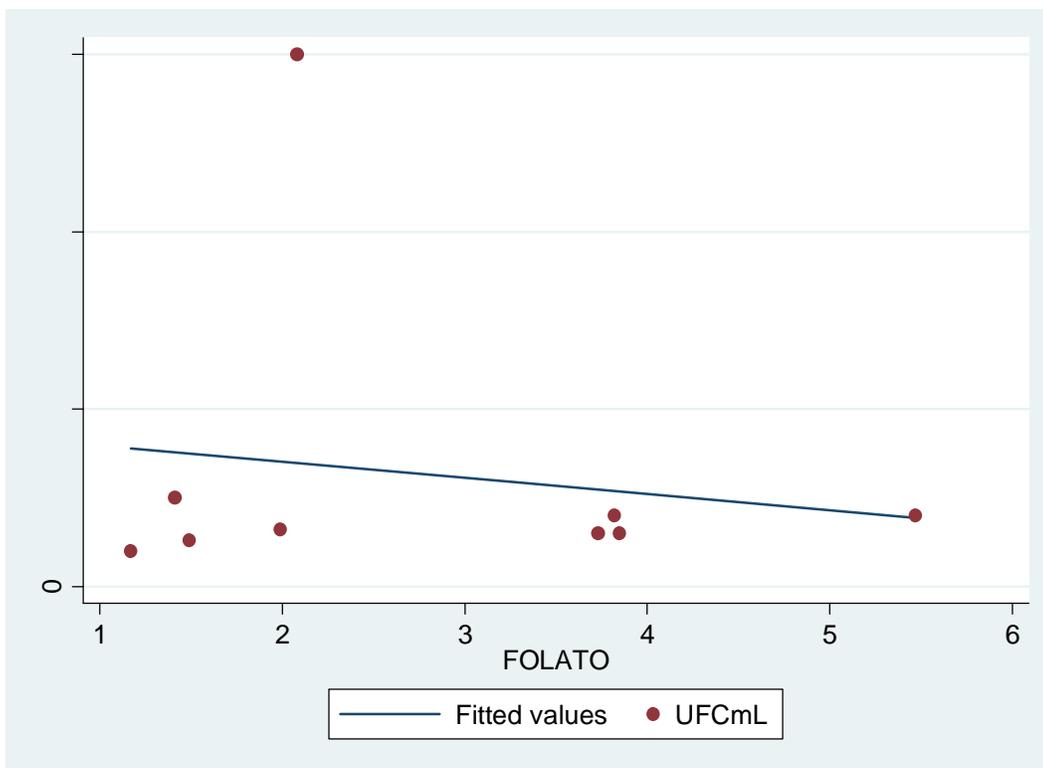


Figura 2. Gráfico de regresión lineal. Concentración de folato en el eje de las abscisas frente a cantidad de *Lactobacillus* (UFC/mL) en el eje de las ordenadas ($p=0.6998$).

Identificación de genes codificantes de las enzimas que participan en el ciclo de folatos

La detección de la presencia de los genes involucrados en el ciclo de folato se realizó por PCR de punto final en cinco especies diferentes de *Lactobacillus*, las cuales fueron aisladas de nueve muestras de yogur natural de marcas comerciales. Se obtuvo amplificación en el 60 % de las muestras para tres genes de las cepas evaluadas para al menos uno de los genes buscados. En ninguna cepa se detectó la presencia de los genes codificantes de las enzimas E.C. 1.1.1.25, E.C. 6.3.2.12 y E.C. 2.6.1.85. Los genes con mayor frecuencia en las muestras analizadas son E.C. 3.6.1, E.C. 2.5.1.19 y E.C. 2.7.1.71 correspondientes al 66.7 %. En las cepas aisladas de dos muestras de yogur (VN y LN) no se detectó la presencia de ninguno de los genes analizados; sin embargo, una de estas muestras contiene la mayor concentración de ácido fólico en comparación de las muestras que tienen presentes algunos genes codificantes



de las enzimas del folato (Figura 3). Mientras que en al menos tres de las muestras analizadas (YN, AN y OD) en las que se detectó la presencia de cuatro genes se cuantificaron concentraciones menores a 1.50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Se realizó el análisis de la presencia de 12 genes involucrados en la biosíntesis de folato, ya que seis genes codificantes de las enzimas de folato no se encuentran en *Lactobacillus*. En el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas en la asociación entre la presencia de los genes en cada cepa aislada de las muestras de yogur natural y la concentración de ácido fólico de las mismas.

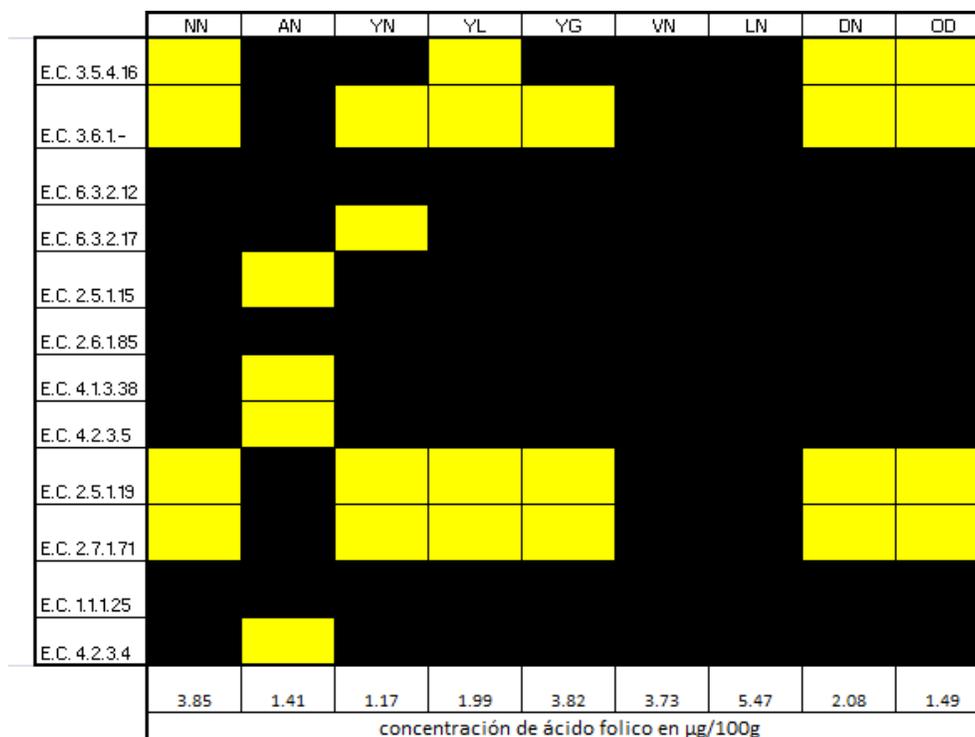


Figura 3. Mapa de calor representando la distribución de genes involucrados (lado izquierdo) en la biosíntesis de folato en *Lactobacillus* aislados de yogur natural. El color amarillo indica la presencia y el color negro indica ausencia de los genes. La presencia de los genes involucrados en la biosíntesis de folato se evaluó en nueve muestras de yogur natural comercial (parte superior) mismas en las que se realizó la cuantificación de ácido fólico (parte inferior).



DISCUSIÓN

Identificación bioquímica y cuantificación de *Lactobacillus*

A nivel industrial las empresas alimentarias que se encargan de la producción de productos lácteos fermentados como el yogur, para ello suelen utilizar cultivos puros o co-cultivos debido a que de esta manera controlan las condiciones de crecimiento, garantizan calidad de su producto (Ramírez, *et al.*, 2011). Los probióticos generalmente son añadidos como cultivos adjuntos y deben garantizarse su viabilidad en los alimentos (Fernández, *et al.*, 2015). De acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-181-SCFI-2010 los probióticos utilizados en la producción de yogur son: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*; sin embargo, también se establece que pueden ser utilizadas otras especies del género *Lactobacillus* en la producción de yogur. En este trabajo durante el aislamiento e identificación de género y especie de cepas de *Lactobacillus* aisladas de yogur natural de marcas comerciales predomina *Lactobacillus delbrueckii* [*ssp. lactis*, *ssp. delbrueckii* y *ssp. bulgaricus*] (tabla 2). Las muestras de yogur natural analizadas en este estudio fueron de tipo normal, light y griego. Las cepas que se encontraron presentes en mayor cantidad fueron *Lactobacillus plantarum* (Alpura normal) y *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* (Lala normal) con 2.5×10^6 UFC/mL y 2×10^6 UFC/mL respectivamente. En la cuantificación de *Lactobacillus* quedó de manifiesto que si bien las etiquetas de cada yogur comercial indican cierta cantidad de cultivos lácticos viables (10^8 UFC/g de yogur), al hacer la cuantificación de estos después de ser envasados muestran una disminución en la cuenta viable; sin embargo, se encuentra dentro de los valores establecidos por la norma oficial mexicana NOM-181-SCFI-2010 y la norma del codex alimentarius CODEX STAN 243-2003., en las cuales se indica que como mínimo deben de conservarse microorganismo viables 10^6 UFC/g de yogur. La disminución en la cuenta de *Lactobacillus* aislados con respecto a la cantidad etiquetada, es un evento normal tomando en cuenta las fases de crecimiento microbiano; al adicionarse los *Lactobacillus* a la leche inicia el proceso de fermentación láctea ocurriendo la fase de adaptación, posteriormente las bacterias comienzan a utilizar el sustrato multiplicándose en la fase exponencial, es aquí donde el yogur es envasado. Por último, el producto es conservado en refrigeración lo cual mantiene al cultivo en una fase estacionaria, la cantidad



de *Lactobacillus* comienza a disminuir por que el cultivo pasa a la fase de muerte celular al agotarse completamente el sustrato del medio en el que se encuentran, resultando en la disminución de la cuenta de UFC/g de muestra. Por otra parte, esto puede deberse a la formulación del yogur, de acuerdo a Donkor, et al., (2007) la formulación del yogur con prebióticos mejora la viabilidad del *Lactobacillus acidophilus* y del *L. casei*, en el yogur durante su almacenamiento refrigerado. Los resultados indican que la cantidad de *Lactobacillus* aislados corresponden a los establecidos en la Norma Oficial Mexicana antes mencionada tomando en cuenta el rango mínimo de viabilidad de estos cultivos lácticos.

Cuantificación de ácido fólico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En este estudio se esperaba que exista una correlación entre la cantidad de UFC/mL de *Lactobacillus* aisladas de cada muestra de yogur analizadas y la concentración de ácido fólico de dichas muestras; sin embargo, los resultados muestran concentraciones de ácido fólico de entre 1.17 y 5.47 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ de yogur) correspondiendo a las muestras YN (1×10^6 UFC/mL) y LN (2×10^6 UFC/mL) respectivamente. Mientras que la muestra (AN) con mayor cantidad de *Lactobacillus* (2.5×10^6 UFC/mL) contiene una concentración de ácido fólico de 1.41 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de yogur, muestra en la que se esperaba encontrar la concentración de ácido fólico más alta obtenida del análisis de yogur natural comercial. Por otra parte, se realizó el análisis de la concentración de ácido fólico en una muestra de leche de vaca de marca comercial, las tablas de composición de los alimentos y los documentos de revisión basados en el ensayo microbiológico informan los valores totales de folato para la leche en el rango de 5-7 $\mu\text{g} / 100\text{ g}$ (Forssen et al., 2000; Arcot y Shrestha, 2005). En la muestra de leche analizada en este estudio se detectó una cantidad de 4.44 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de leche (Anexo 4). Este resultado por evidencia que se encuentra ligeramente por debajo de este valor de referencia, sin embargo; se encuentra dentro de los valores detectados de manera similar en un estudio realizado por Iyer y Tomar, 2013., en el que se realiza la detección de folatos en muestras de leche de vaca, oveja, cabra, etc. A partir de diversos métodos de extracción y cuantificación en los que se encuentran concentraciones de folato en un rango entre 1.6-6.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de leche. En este estudio se observa que hay diferencia de concentraciones entre las muestras de yogur; sin embargo, la cantidad de *Lactobacillus* (UFC/mL) no se relaciona con la concentración de



ácido fólico correspondiente a cada muestra, ya que en la muestra de leche (sin *Lactobacillus*) se detectó una de las concentraciones más altas analizadas en este estudio. Además, se esperaría encontrar una mayor concentración de ácido fólico en muestras de yogur en comparación con la concentración de ácido fólico presente en la muestra de leche, de acuerdo a Sybesma, *et al.*, 2003 es bien conocido que la leche es una fuente de folato conteniendo entre 20-50 $\mu\text{g/L}$ y que productos lácteos como el yogur han sido reportados por contener concentraciones de folato de hasta 110 μg de ácido fólico/L, atribuyendo la diferencia de concentraciones de folato como resultado directo de la producción de folato adicional por las BAL en el yogur. El análisis estadístico no mostró una relación lineal entre las UFC y la concentración de folato (figura 2). La figura 2 muestra una tendencia la cual es entre menos UFC hay una mayor concentración de folato en las muestras analizadas, esto pone en evidencia que la concentración de folato no depende de la cantidad de UFC de *Lactobacillus*.

Identificación de genes codificantes de las enzimas que participan en el ciclo de folatos

El diseño de iniciadores de un gen en específico de las especies de un solo género puede llevarse a cabo con programas bioinformáticos, a través de la comparación de una secuencia problema con secuencias similares que se encuentran en una base de datos curadas. Este análisis no es insustancial e intrascendente, ya que se debe validar que los iniciadores que han sido diseñados amplifiquen una secuencia específica del gen correspondiente a la enzima de interés y que dicha secuencia es altamente conservada en las especies del género *Lactobacillus* y no en otro género bacteriano, de esta manera podemos decir que nuestros iniciadores son específicos del género *Lactobacillus*. Además, el análisis *in silico* proporciona información a cerca de la relación evolutiva entre las especies comparadas. La biosíntesis *de novo* (Anexo 1) se lleva a cabo con la presencia de DHPPP o de pABA, precursores necesarios para la biosíntesis de folatos (Rossi *et al.*, 2011). En la figura 3 se muestra la detección de la presencia de los genes involucrados en el ciclo de folato se realizó por PCR de punto final en cinco especies diferentes de *Lactobacillus*, las cuales fueron aisladas de nueve muestras de yogur natural de marcas comerciales. Estos resultados sugieren la síntesis de folato por parte de los *Lactobacillus* está dada a partir de shikimato o corismato (ver anexo 1) hasta obtener



DHP; 7,8-dihidropteroato, la cual resulta de la condensación de las moléculas 6-Hydroxymethyl-7,8-dihidropterin pirofosfato y pABA por la acción de dihidropteroato sintasa (EC 2.5.1.15) (de Crécy-Lagard et al., 2007). No se detectó la presencia del gen codificante de la enzima EC 6.3.2.12 por lo que se sugiere que no se generan las formas de folato DHF (dihidrofolato) y THF (tetrahidrofolato) en esa matriz alimentaria. Sin embargo la biosíntesis de folato hasta producir DHP puede ser suficiente para que al consumir el producto analizado, se produzcan las formas de folato antes mencionadas. Una vez producido DHP es glutamatado por EC 6.3.2.12 generando DHF, posteriormente es reducida por la acción de la dihidrofolato reductasa para obtener THF, esta reacción está dada por la actividad de las conjugasas presente en las células de la mucosa yeyunal (Rossi *et al.*, 2011; de Crécy-Lagard et al., 2007 y LeBlanc *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- El diseño de iniciadores a través del análisis *in silico* permitió identificar la presencia de genes codificantes de las enzimas involucradas en el ciclo de folatos en BAL del género *Lactobacillus* utilizando un solo par de iniciadores específicos para amplificar cada gen.
- La especie del género *Lactobacillus* que predomina en la elaboración de muestras de yogur natural comercial analizadas es *delbrueckii*. Género y especie establecida dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba considerándose esta una de las cepas más utilizadas en la industria alimentaria en la fermentación de productos lácteos más no la única.
- Los genes codificantes de las enzimas involucradas en el ciclo de folatos presentes en *Lactobacillus* aislados de yogur natural comercial parecen ser suficientes para generar DHP, pero no para generar el sustrato de todas las reacciones que se incluyen en la biosíntesis de novo hasta llegar a las formas de folato DHF y THF.



- La concentración de ácido fólico detectado en la mayoría de las muestras analizadas no depende de la cantidad de UFC de *Lactobacillus* analizados en las muestras y que debido a las concentraciones bajas de folato que se detectaron no puede marcarse una diferencia significativa comparada con el valor de la concentración de folato cuantificado en la muestra de leche que se toma de referencia.



ANEXOS

ANEXO 1.

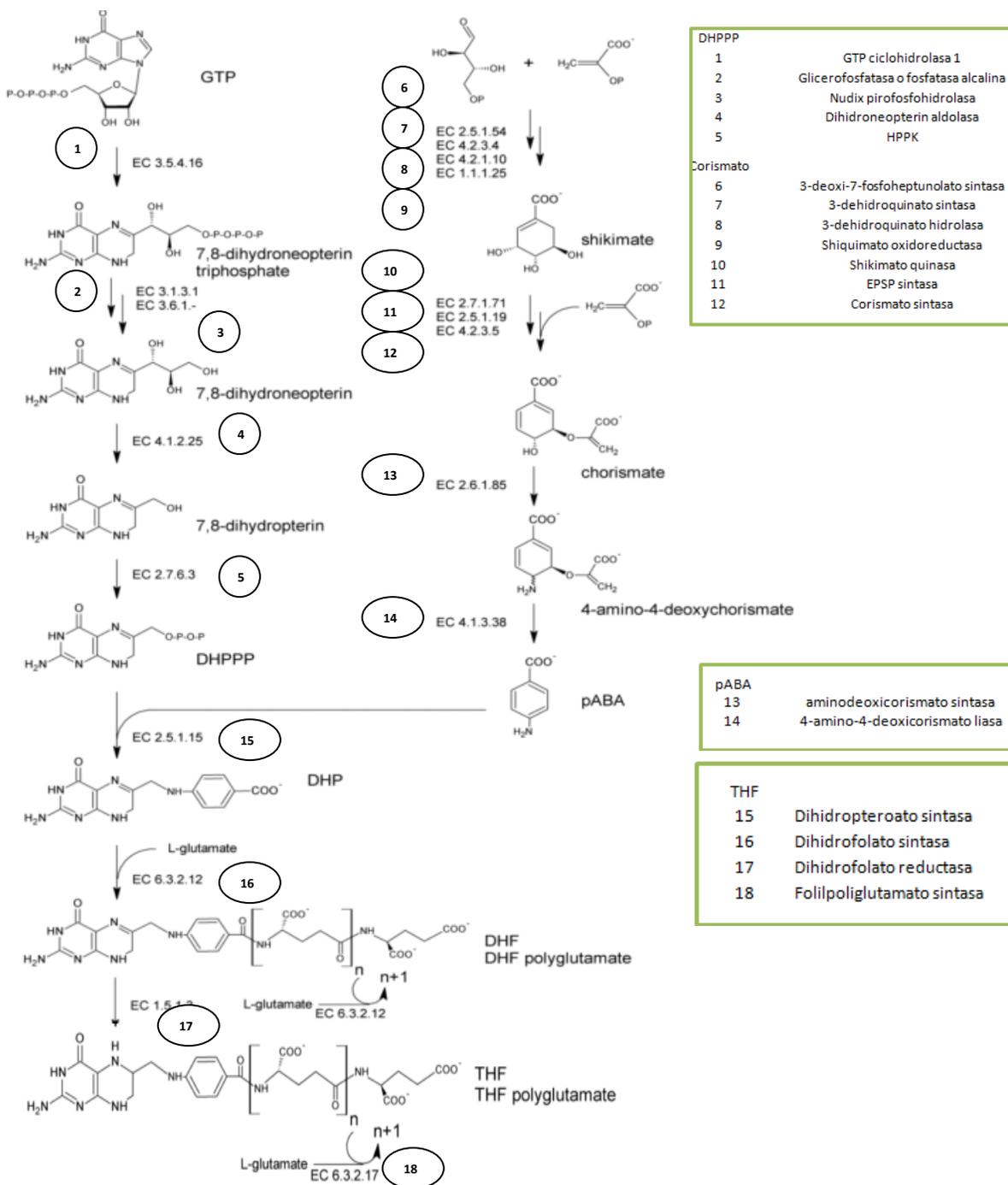


Figura 3. Vía de la biosíntesis de folato bacteriana de Novo (Tomada y modificada de Rossi, *et al.*, 2011) Abreviaturas: GTP, guanosin trifosfato; DHPPP, 6-hidroximetil-7,8-dihidropterin pirofosfato; pABA, ácido para-aminobenzoico; DHP, 7,8-dihidropteroato; DHF, dihidrofolato; THF, tetrahidrofolato. Tomado y modificado de Rossi *et al.*, 2011.w



ANEXO 2.

Tabla 3. Lista de iniciadores para los genes codificantes de las enzimas del ciclo de folatos diseñados a través del análisis *in silico*

Enzima (EC)	Iniciadores		Producto esperado (pb)
2.7.6.3	F.- TCCTCGACCACCTTACAAT	R.- CGGTTAGCCATTTCTGGATG	154
4.1.2.25	F.- TGTGTTTGCGGAAGAGAAAA	R.- TGAGCAACAACTCCGCAAT	150
3.6.1.-	F.- GGTGAGCTGCCGATTAAGT	R.- CGAAAGTCGACGTGTTGATG	155
3.1.3.1.	F.TGGAAAAGTTGGACAATTACTTAC	R.- CAATCGAAATGTGTCATTCCA	159
3.5.4.16	F.TCGTCTGAGGGGTTGGATAA	R.-ACGTAAGCAATGTGGGCTTT	155
4.2.3.5	F.TGGATGAGATTAGTTGGGATGA	R.-GGTCGCGATATCCACACTTT	164
2.5.1.19	F.- TAAATTCGGGGCAGAGATTG	R.- TTTCTGGTCGGCAATTTTTC	186
2.7.1.71	F.-AAAGAGTGGACAAGATGAGAATTG	R.- AAAATTTCCGGGATGGTCAG	154
1.1.1.25	F.- GCGAAACCAAGCTTATGCAG	R.- GGTTCACCAAACACCGTCTC	157
4.2.1.10	F.-TGCCTAATAGTGCACGTGATG	R.- GCATCGCCTACTGTACCAAA	110
4.2.3.4	F.-GATTTATATGCGCGGTATTGC	R.- AGAATTGCCGGATCAATGAC	162
2.5.1.54	F.- AGAAGTCGGCAAAACGAAGA	R.- TTGTTGTCAAACGTGCGAAT	150
4.1.3.38	F.- TGAACCATACTACGCGCAAA	R.- GCGCCACTTAGCATCTAACC	151
2.6.1.85	F.- TTATTGGTATTGCGGGATCG	R.- CCTTGAACATGAGCCATTG	178
1.5.1.3	F.TGATTGAATATGTTGGGCAGA	R.GGTAACAAATTAGGAAAACCTTCAA	163
6.3.2.12	F.- CTTACCAGCCGCTTTGAG	R.- TCAGCAACCGCCTTATCTTT	165
6.3.2.17	F.- GTGTTTTGACCGAGGTTGCT	R.- AAAACGCAACCATTGACTCC	185
2.5.1.15	F.- TGAGCACCGGTTAATCTCA	R.- CGATTACGTCAGTCTCTGCT	152

ANEXO 3.

Tabla 4. Temperatura de alineamiento de los iniciadores de los genes codificantes de las enzimas del ciclo de folatos presentes en el género *Lactobacillus* diseñados a través del análisis *in silico*

Enzima (EC)	Temperatura de alineamiento (°C)
3.6.1.-	56.2
3.5.4.16	62.0
4.2.3.5	62.0
2.5.1.19	60.2
2.7.1.71	52.5
1.1.1.25	60.2
4.2.3.4	60.2
4.1.3.38	62.0
2.6.1.85	49.8
6.3.2.12	52.5
6.3.2.17	50.0
2.5.1.15	62.0

ANEXO 4.

Tabla 5. Análisis de concentración de ácido fólico en nueve muestras de yogur natural y una muestra de leche (marcas comerciales).

Muestra(s)	Contenido de: ácido fólico		
	Resultado (µg/100 g)	LDM (µg/100 g)	LCM (µg/100 g)
Yoghurt Marca Vitalínea	3.73	0.33	0.72
Yoghurt natural, Marca Lala	5.47	0.33	0.72
Yoghurt natural, Marca Danone	2.08	0.33	0.72
Yoghurt light natural, Marca Yoplait	1.99	0.33	0.72
Yoghurt Griego natural, Marca Yoplait	3.82	0.33	0.72
Yoghurt Oikos, natural, Marca Danone	1.49	0.33	0.72
Yoghurt natural, Marca Yoplait	1.17	0.33	0.72
Leche deslactosada, Marca Santa Clara	4.44	0.33	0.72
Yoghurt natural Alpura	1.41	0.33	0.72
Yoghurt natural Nutri Yoghurt	3.85	0.33	0.72

La tabla muestra los resultados de la media de tres repeticiones con un CV menor al 5%.

LDM: Límite de detección

LCM: Límite de cuantificación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolfsson, O., Meydani, S. N., & Russell, R. M. (2004). Yogurt and gut function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 245–256.
- Arcot J, Shrestha A. (2005). Folate: methods of analysis. *Trends Food Sci Technol* 2005; 16: 253-66
- Codex Alimentarius. Norma del codex para leches fermentadas (2003) CODEX STAN 243-2003.
- De Crécy-Lagard, V., Basma, E. Y., Díaz, G. R., Noiriel, A., and Hanson, A.D. (2007). “Comparative Genomics of Bacterial and Plant Folate Synthesis and Salvage: Predictions and Validations.” *BMC Genomics* 8 (2): 245.
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, T, P., Vasiljevic y Shah, N.P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 17(6):657-665.
- Fajardo, V., Alonso, E., y Varela, G., (2013). “Cuantificación de Folato Total En Alimentos Ready-to-Eat” *Nutrición Hospitalaria*. 28 (3): 1210–18.
- FAO. (2002). Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Por Latham M. C. *Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
- FAO. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 85*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
- Fernández, M., Hudson, J. A., Korpela, R., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2015). Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. *BioMed Research International*. 2015, 1–13.
- Iyer, R., and Tomar, S. K. (2013). Determination of Folate/folic Acid Level in Milk by Microbiological Assay, Immuno Assay and High Performance Liquid Chromatography. *The Journal of dairy research* 80.2 : 233–9.
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponible en línea: <http://www.genome.jp/kegg>. (fecha de acceso: 9 de Junio 2015).
- Laiño, J. E., Leblanc, J.G., and de Giori, G, S. (2012). Production of Natural Folates by Lactic Acid Bacteria Starter Cultures Isolated from Artisanal Argentinean Yogurts. *Canadian journal of microbiology* 58.5.
- LeBlanc, J.G., Savoy de Giori, G., Smid, E.J., Hugenholtz, J., and Sesma, F. 2007. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade micrigranisms. *REVISTA*, VOL(NUM):PAGINAS

- Leblanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M. P., Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1297–1309.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 160–168.
- Masuda, M., Ide, M., Utsumi, H., Niuro, T., Shimamura, Y., Murata, M.(2014). Production Potency of Folate, Vitamin B 12 , and Thiamine by Lactic Acid Bacteria Isolated from Japanese Pickles. *Biosci Biotechnol Biochem* ;76(11):2061-2067.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.
- Olivares, A. B., Berrueto, G. R., Cava, M. J. B., Graciá, C. M., & Caston, M. J. P. (2005). Estimación de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(1): 5–14.
- Parra, R.A. (2012). Yogur en la salud humana. *Lasallista de Investigación*, 9(2):162–177.
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Raimondi, S., Matteuzzi, D., & Rossi, M. (2007). Administration of folate-producing bifidobacteria enhances folate status in Wistar rats. *The Journal of Nutrition*, 137(12): 2742–2746.
- Ramírez, R.C.J., Rosas, U.P, Velázquez, M.Y., Ulloa,J.A., & Francisco Arce R. F. (2011). “Bacterias Lácticas : Importancia En Alimentos Y Sus Efectos En La Salud.” *Revista Fuente 2* (7): 16. 202-216.
- Rossi, M., Amaretti, A. & Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*, 3(1):118–134.
- Santos, F., Wegkamp, A., De Vos, W. M., Smid, E. J., & Hugenholtz, J. (2008). High-level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10): 3291–3294.
- Sweeney, MR., McPartlin J, Scott J. (2007). Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health*. 7:41.
- Sybesma, Wilbert, Marjo Starrenburg, Linda Tijsseling, Marcel H N Hoefnagel, and Jeroen Hugenholtz. (2003). “Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria.” *Metab. Eng.* 69 (8): 4542–48.
- Teusink B, van Enkevort FHJ, Francke C, et al. (2005). In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):7253-7262.

Wegkamp, A., Mars, A. E., Faijes, M., Molenaar, D., de Vos, R. C. H., Klaus, S. M. J., Smid, E. J. (2010). Physiological responses to folate overproduction in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 100.