



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

CRISTINA SERRANO AMATRIAIN

**TESIS DOCTORAL
2014**



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

Dr. Luis Román Fernández Lago, Profesor Titular y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA: Que la memoria titulada “Ingeniería metabólica para la producción de ácido fólico” presentada por la licenciada Dña. Cristina Serrano Amatriain para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. José Luis Revuelta Doval en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide el presente certificado

en Salamanca a _____

Fdo.: Dr. Luis Román Fernández Lago



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

Dr. José Luis Revuelta Doval, Catedrático de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA: Que la licenciada Dña. Cristina Serrano Amatriain ha realizado en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, bajo su dirección, el trabajo titulado “Ingeniería metabólica para la producción de ácido fólico” para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, y como director del trabajo, expide el presente certificado en:

Salamanca a _____

Fdo.: Dr. José Luis Revuelta Doval

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Prof. José Luis Revuelta por la oportunidad que me ha dado de trabajar junto a él y de desarrollar mi tesis doctoral en su laboratorio.

A Angie, por toda la ayuda y el apoyo ofrecidos durante todo el desarrollo de este trabajo, y a Alberto. Al resto de mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes: Patri (Pili), Cris, Loli, José, Silvi, Patri, Rodri, José Miguel y Rubén. Gracias por toda la ayuda que me habéis ofrecido con mis experimentos pero sobre todo por los buenos momentos que hemos pasado juntos dentro y fuera del labo. A los compañeros del departamental, Héctor, Roberto y Alberto que, aunque nos hayamos conocido en la recta final de mi tesis, me habéis hecho pasar muy buenos momentos.

A todos los amigos que he hecho en Salamanca durante este tiempo. A Natha y Lucho (y el pequeño Lucio), por haberme dejado formar parte de vuestra pequeña familia, espero que podamos seguir juntándonos en el futuro allá donde estemos. A mis chicas: Miriam, Merce, Yoli y Carmen, por apoyarme siempre que lo he necesitado y sobre todo por haberme hecho pasar tan buenos ratos. Al resto de la panda, a quien conocí gracias a Thais, a los que no podría mencionar uno a uno porque seguro que me dejaría a alguno, gracias a todos por haberme hecho estos años más llevaderos y haberme hecho sentir parte del grupo desde el primer día.

A mis amigos de Pamplona y de la universidad, en especial a mis grandes amigas: Laura, gracias por sacar siempre un hueco para tomar un café conmigo cada vez que he ido a Pamplona, por preocuparte siempre por mi y por todo tu apoyo; y Marta, gracias por estar siempre ahí, por nuestras interminables conversaciones al teléfono y por decirme siempre lo que realmente piensas.

A Itsaso, por nuestras reuniones en Bilbao o Pamplona, allá donde toque, para ponernos al día. Y Paula, por todo tu apoyo desde la distancia. Dinamarca nos unió y espero que siga así por mucho tiempo. Gracias por seguir ahí.

Por último agradecerles todo el apoyo a mi familia: mis hermanos David, por todos los consejos para la maquetación de esta tesis, e Ignacio, y a mis cuñadas Maier y Marta. A mi tía Margarita. Y a mis padres por haberme apoyado siempre en todas mis decisiones y no haber dudado nunca de mi.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
<i>Ag</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
AICAR	Aminoimidazol carboxamida ribonucleótido
AIR	Aminoimidazol ribonucleótido
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
AMT	Aminometil transferasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	ARN transferente
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
CAIR	Carboxiaminoimidazol ribonucleótido
DHF	7,8-dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHNA	Dihidroneopterin aldolasa
DHPS	Dihidropteroato sintetasa
DLD	Dihidrolipoamida deshidrogenasa
ECF	Factor de acoplamiento a energía (De la terminología inglesa "Energy Coupled Factor")
FAICAR	Formaminoimidazolcarboxamida ribonucleótido
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (De la terminología inglesa "Food and Drug Administration")
FGAM	Formilglicinamidina ribonucleótido
FGAR	Formilglicinamida ribonucleótido
FTHFS	5-formil-tetrahidrofolato sintetasa
FR α	Receptor de folatos alpha (De la terminología inglesa "Folate Receptor Alpha")
FR β	Receptor de folatos beta (De la terminología inglesa "Folate Receptor Beta")
GAR	Glicinamida ribonucleótido
GCS	Sistema de rotura de glicina (De la terminología inglesa "Glycine Cleavage System")
GCSH	Proteína H del sistema de rotura de glicina
GLDC	Glicina deshidrogenasa
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HPPK	2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropterin difosfoquinasa
IMP	Inosina-5'-monofosfato
dTMP	Timidilato-5'-monofosfato

dUMP	Uridilato-5'-monofosfato
Mb	Megabases
MTHFC	5,10-metilen-tetrahidrofolato ciclohidrolasa
MTHFD	5,10-metilen-tetrahidrofolato deshidrogenasa
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MS	Metionina sintasa
NTDs	De la erminología inglesa "Neural Tube Defects"
ORF	Fase de lectura abierta (De la terminología inglesa "Open Reading Frame")
pABA	Ácido p-aminobenzóico
pb	Pares de bases
PCFT	Transportador de folato acoplado a protones (De la terminología inglesa "Proton-Coupled Folate Transporter")
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (De la terminología inglesa "Polymerase Chain Reaction")
PteGlu	Pteroil glutamato
RFC	Transportador de folato reducido (De la terminología inglesa "Reduced Folate Carrier")
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (De la terminología inglesa "Real Time Polymerase Chain Reaction")
SAH	S-adenosil homocisteína
SAICAR	Succinilaminoimidazolcarboxamida ribonucleótido
SAM	S-adenosil metionina
SARDH	Sarcosina deshidrogenasa
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SHMT	Serina hidroximetil transferasa
THF	Tetrahidrofolato
TS	Timidilato sintasa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I.VITAMINA B ₉ : ÁCIDO FÓLICO	3
I.1.ESTRUCTURA	3
I.2.FUNCIÓN	4
I.2.1.Síntesis de purinas y pirimidinas	4
I.2.2.Síntesis de metionina	6
I.2.3.Interconversión de serina y glicina	7
I.2.4.Catabolismo de la glicina	7
I.3.TRANSPORTE DE FOLATOS AL INTERIOR CELULAR	9
I.4.COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LOS FOLATOS	9
I.5.DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO: CONSECUENCIAS	11
I.5.1.Anemia megaloblástica	11
I.5.2.Cáncer	11
I.5.3.Enfermedades cardiovasculares	12
I.5.4.Defectos en el tubo neural	12
I.5.5.Alzheimer	13
II.ÁCIDO FÓLICO SINTÉTICO	13
II.1.PRODUCCIÓN INDUSTRIAL	13
II.2.VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA FORTIFICACIÓN CON ÁCIDO FÓLICO SINTÉTICO	14
III. <i>Ashbya gossypii</i>	16
III.1.BIOLOGÍA	16
III.2.INTERÉS INDUSTRIAL	17
III.3.RUTA BIOSINTÉTICA DEL ÁCIDO FÓLICO	18

OBJETIVOS

OBJETIVOS	23
-----------	----

RESULTADOS

I.	27
II.	32
II.1.	32
II.1.1.	43

II.1.2.	44
II.2.	45
II.3.	51
II.4.	58
II.5.	61
DISCUSIÓN	
I.	67
II.	68
II.1.	69
III.	71
IV.	71
V.	74
VI.	75
VII.	77
CONCLUSIONES	
CONCLUSIONES	83
MATERIALES Y MÉTODOS	
I.MATERIAL BIOLÓGICO	87
I.1.CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	87
I.2.CEPA <i>Lactobacillus casei sp. rhamnosus</i>	87
I.3.CEPAS DE <i>Ashbya gossypii</i>	87
II.MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS	90
II.1. <i>E. coli</i>	90
II.2. <i>L. rhamnosus</i> ATTC® 7469™	90
II.3. <i>A. gossypii</i>	90
III.VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS	91
III.1.VECTORES	91
III.2.OLIGONUCLEÓTIDOS	92
IV.PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	95
IV.1.OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i>	95
IV.2.OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>A. gossypii</i>	95
IV.3.OBTENCIÓN DE ARN DE <i>A. gossypii</i>	96
V.MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	96
V.1.TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i>	96

V.2.OBTENCIÓN DE ESPORAS DE <i>A. gossypii</i>	96
V.3.TRANSFORMACIÓN DE ESPORAS DE <i>A. gossypii</i>	96
V.4.OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES DE <i>A. gossypii</i>	97
VI.MANIPULACIÓN DEL ADN	97
VI.1.DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y LIGACIÓN	97
VI.2.ELECTROFORESIS DE ADN	97
VI.3.PURIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE ADN DE UN GEL DE AGAROSA	98
VI.4.AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR LA REACCIÓN EN CADE- NA DE LA POLIMERASA (PCR)	98
VI.5.SECUENCIACIÓN DE ADN	98
VI.6.SISTEMA DE CLONACIÓN INFUSION® (CLONTECH LABORATORIES, INC.)	98
VI.7.SISTEMA DE CLONACIÓN GOLDEN GATE	99
VI.8.CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	99
VI.8.1.	99
VI.8.2.	101
VI.8.3.	101
VI.8.4.	101
VI.8.5.	102
VII.MANIPULACIÓN DEL ARN	103
VII.1.SÍNTESIS DE ADN COPIA (ADN _c)	103
VII.2.PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR)	103
VIII.DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO	104
VIII.1.ENSAYO BIOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO	104
VIII.1.1.Obtención y tratamiento de extractos celulares y sobrenadantes	104
VIII.1.2.Análisis de las muestras	105
VIII.2.HPLC	106
VIII.2.1.Obtención y tratamiento de extractos celulares	106
VIII.2.2.Calibración de los estándares	106
VIII.2.3.Análisis de las muestras	107
IX.SOPORTE INFORMÁTICO	107
BIBLIOGRAFÍA	111

I. VITAMINA B₉: ÁCIDO FÓLICO

La vitamina B₉, también conocida como ácido fólico, se trata en realidad de una serie de compuestos químicamente similares solubles en agua denominados folatos. El nombre de ácido fólico hace referencia a la forma sintética y estable de la vitamina, también llamada ácido pteroil glutamato (PteGlu). Sin embargo, a lo largo de la memoria se hará referencia indistintamente a “folatos” o “ácido fólico” para hablar de las formas naturales de esta vitamina, especificando aquellos casos en los que se haga alusión a su forma sintética.

En 1931 Lucy Wills evidenció una mejora de la anemia macrocítica tropical tras la administración en la dieta de extracto de levadura [1], aunque se desconocía el compuesto responsable de esta mejora. Esta anemia se caracteriza por un aumento en el tamaño de los glóbulos rojos y suele verse asociada con el embarazo, empeorándose los síntomas en aquellas personas afectadas por la malaria. No fue hasta los años 40 cuando se purificó el ácido fólico a partir de hojas de espinaca [2] y se determinó su estructura [3], asignándole de ahí su nombre (del latín *folium* = hoja).

I.1. ESTRUCTURA

La estructura básica de los folatos consta de un anillo aromático de pteridina al que se une un ácido p-aminobenzóico mediante un puente metileno, unido este último a su vez por un enlace peptídico a un residuo de ácido glutámico (Fig.1). Los distintos folatos se distinguen entre sí en: el grupo carbono que se une a las posiciones N5 y N10 del anillo de pteridina pudiendo ser un grupo metil, formil, metenil o metilen; el grado de oxidación del anillo de pteridina; y el número de ácidos glutámicos que se unen entre sí mediante enlaces γ -glutamil.

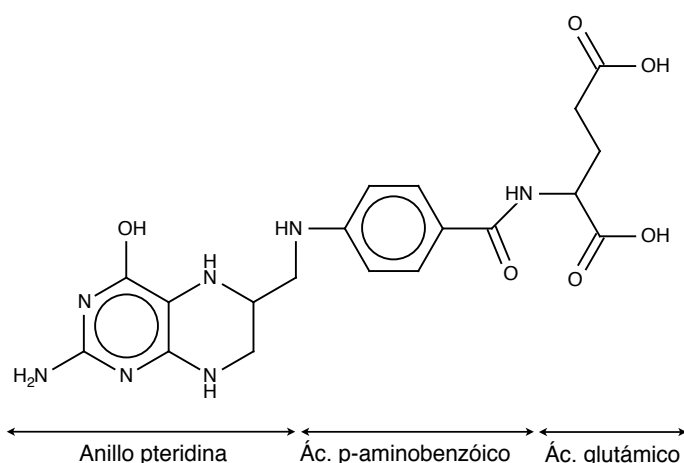


Figura 1: Estructura química del tetrahidrofolato (THF).

Las distintas formas de folatos con actividad biológica presentes en la naturaleza son: 7,8-dihidrofolato (DHF), tetrahidrofolato (THF), 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF), 5,10-metilen-tetrahidrofolato (5,10-metilen-THF), 5,10-metenil-tetrahidrofolato (5,10-metenil-THF) y 10-formil-tetrahidrofo-

lato (10-formil-THF). A partir del DHF se sintetiza el resto de folatos mediante distintas reacciones de interconversión (Fig. 2).

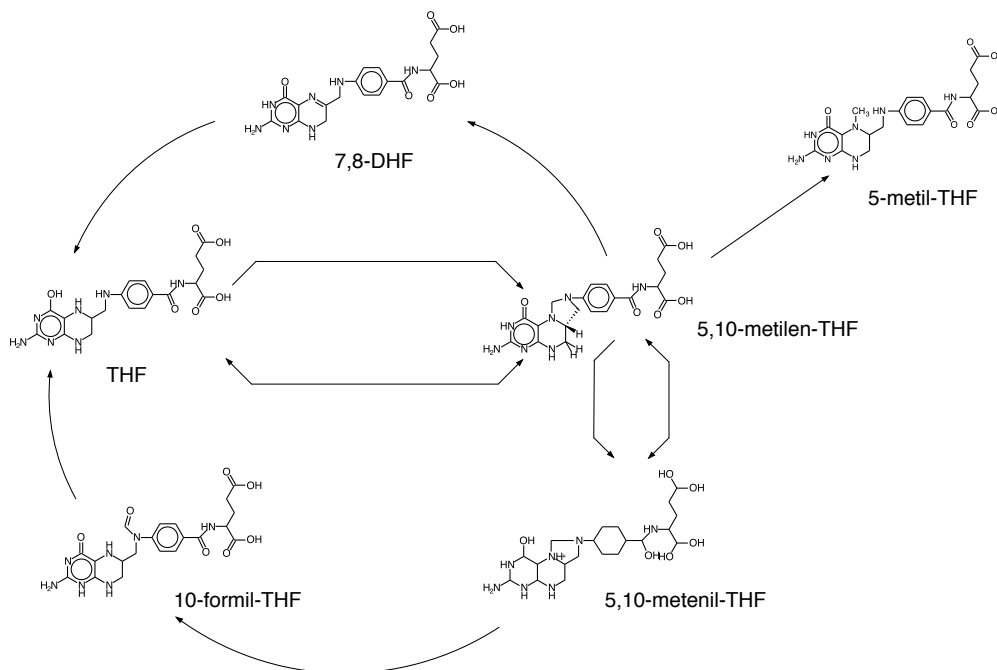


Figura 2: Interconversión de folatos.

1.2.FUNCIÓN

Los folatos funcionan como coenzimas en reacciones de transferencia de grupos monocarbono necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo de algunos aminoácidos como se detalla a continuación.

1.2.1.Síntesis de purinas y pirimidinas

El 10-formiltetrahidrofolato (10-formil-THF) está implicado en la formación del anillo de purinas mientras que el 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-metilen-THF) participa en la metilación de deoxyuridilato monofosfato (dUMP) para formar timidilato monofosfato (dTMP).

La síntesis *de novo* de purinas se lleva a cabo mediante la adición de átomos, que constituirán el anillo de purinas, a la ribosa-5-fosfato para dar lugar al IMP, a partir del cual se formarán el AMP y el GMP. Los átomos que constituyen el anillo de purinas provienen del ácido aspártico, la glutamina, la glicina y el 10-formil-THF. En concreto, los grupos metilo donados por el 10-formil-THF constituyen las posiciones 2 y 8 del anillo (Fig. 3).

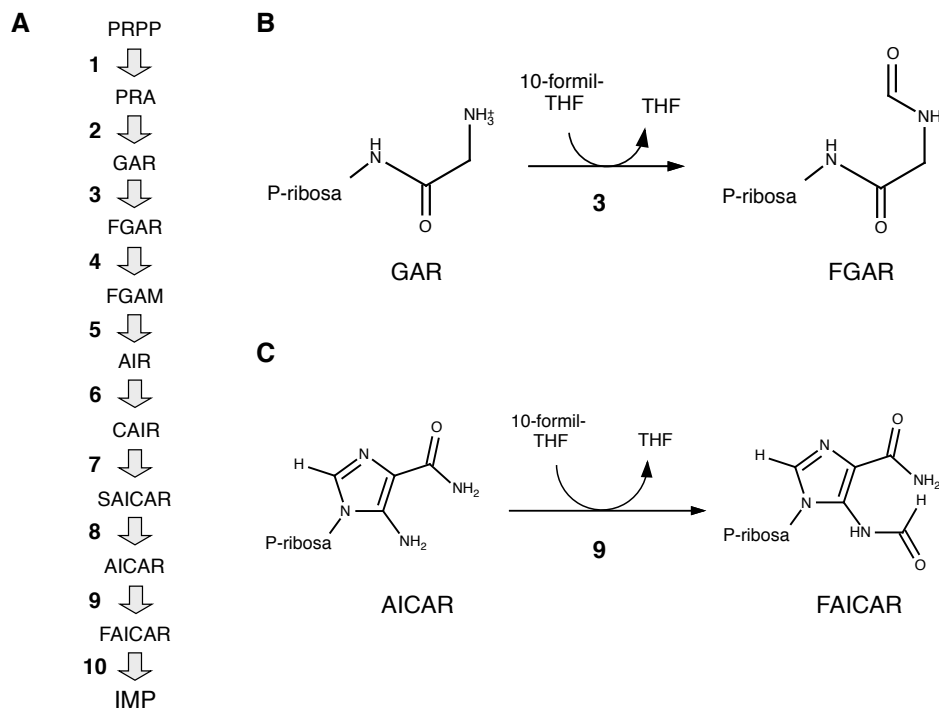


Figura 3: A) Ruta de síntesis *de novo* de purinas. PRPP: fosforribosil pirofosfato; PRA: fosforribosilamina; GAR: glicinamida ribonucleótido; FGAR: formilglicinamida ribonucleótido; FGAM: formilglicinamidina ribonucleótido; AIR: aminoimidazol ribonucleótido; CAIR: carboxiaminoimidazol ribonucleótido; SAICAR: succinilaminoimidazolcarboxamida ribonucleótido; AICAR: aminoimidazol carboxamida ribonucleótido; FAICAR: formaminoimidazolcarboxamida ribonucleótido; IMP: inosina monofosfato. B) Reacción catalizada por la fosforribosilglicinamida transformilasa en la que el 10-formil-THF cede un grupo metilo al GAR para dar THF y FGAR. C) Reacción catalizada por la aminocarboxamida ribotida transformilasa en la que el 10-formil-THF cede un grupo metilo al AICAR para dar THF y FAICAR.

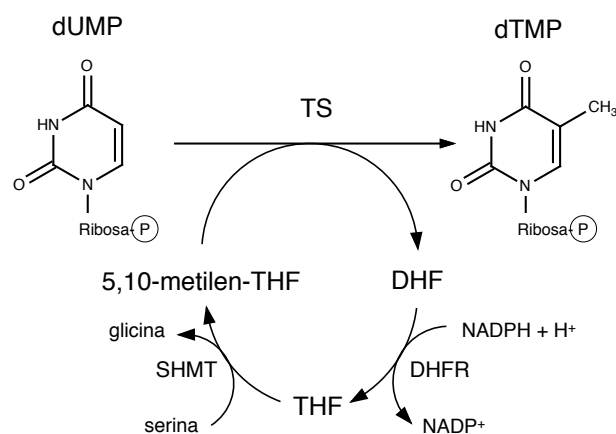


Figura 4: Reacción enzimática de síntesis de dTMP a partir de dUMP mediada por la timidilato sintasa (TS). DHFR: dihidrofolato reductasa; SHMT: serina hidroximetil transferasa.

En la síntesis *de novo* de pirimidinas, el ácido fólico interviene en la conversión de dUMP en dTMP en una reacción catalizada por la timidilato sintasa. El 5,10-metilen-THF dona un grupo metilo al dUMP dando lugar a dTMP y dihidrofolato (DHF). Esta es la única reacción enzimática que se da en la célula en la que se sintetiza DHF a partir de THF. El DHF es convertido en THF por la dihidrofolato reductasa (DHFR) y, a continuación, nuevamente en 5,10-metilen-THF por acción de la serina hidroximetil transferasa (SHMT), de manera que puede ser reutilizado para la síntesis de dTMP (Fig. 4).

1.2.2. Síntesis de metionina

La metionina sintasa es la enzima que cataliza la reacción de transferencia de un grupo metilo del 5-metil-THF a la homocisteína dando lugar a THF y metionina. En animales, esta enzima es dependiente de la vitamina B₁₂ (cobalamina) la cual funciona como intermediario catalítico en la reacción aceptando y donando un grupo metilo. La metionina sintasa requiere de S-adenosilmetionina (SAM) para activarse, la cual dona un grupo metilo a la cobalamina. La metionina sintasa unida a la metilcobalamina puede entonces unirse al 5-metil-THF y a la homocisteína cediendo un grupo metilo a esta última para generar metionina. A continuación el 5-metil-THF dona otro grupo metilo a la cobalamina metilándola de nuevo y generando a su vez THF (Fig. 5) [4, 5].

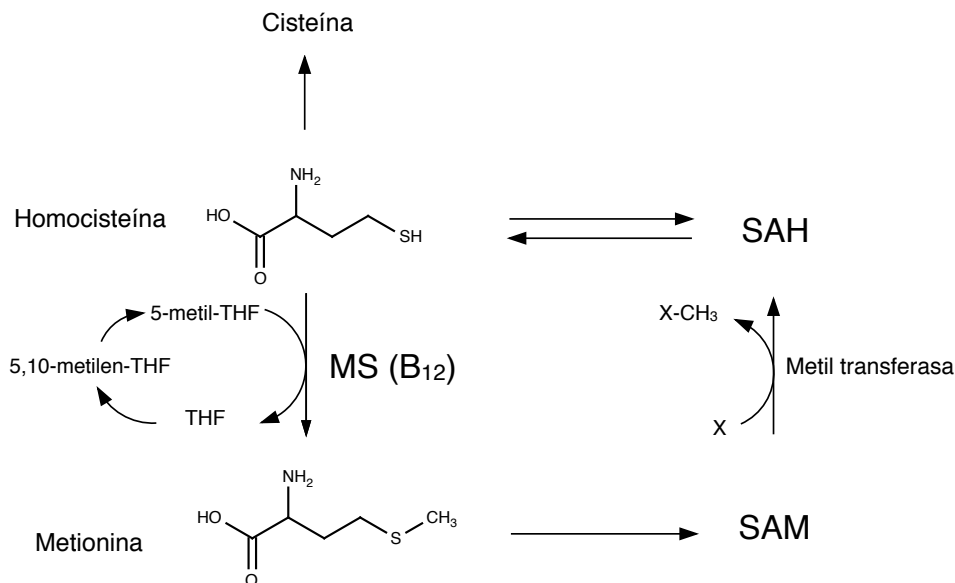


Figura 5: Esquema de la reacción de síntesis de metionina a partir de homocisteína catalizada por la metionina sintasa (MS) dependiente de la vitamina B₁₂. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; X: aceptor de grupos metilo.

Esta reacción forma parte del denominado ciclo de SAM en el que se produce, consume y recicla S-adenosilmetionina, compuesto implicado en la metilación de histonas, ADN, ARN, proteínas, fosfolípidos y neurotransmisores [6]. La S-adenosilmetionina se forma a partir de metionina y ATP, en una reacción catalizada por la metionina adenosil transferasa. Mediante enzimas metiltransferasas el grupo metilo de SAM es empleado en reacciones de metilación, generándose S-adenosilhomocisteí-

na. Este compuesto es hidrolizado a homocisteína y adenosina por la S-adenosil homocisteína hidrolasa. Esta reacción es reversible, aunque en condiciones normales predomina la reacción de hidrólisis. La homocisteína sintetizada puede dar lugar de nuevo a metionina o ser utilizada para la síntesis de cisteína mediante la ruta de transulfuración.

I.2.3. Interconversión de serina y glicina

La serina es la mayor fuente de grupos monocarbono en la célula. La serina hidroximetil transferasa (SHMT) es la enzima que cataliza la reacción reversible de transferencia de un grupo metilo de la serina al THF generando glicina, fuente también de grupos monocarbono en la célula, y 5,10-metilen-THF (Fig. 6) [7].

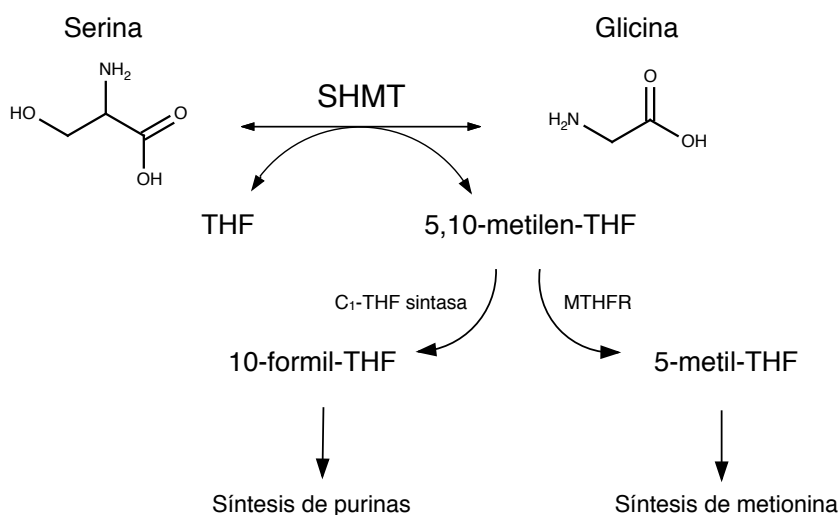


Figura 6: Esquema de la reacción de interconversión de serina y glicina catalizada por la serina hidroximetil transferasa (SHMT). MTHFR: metil-tetrahidrofolato reductasa.

A continuación, el 5,10-metilen-THF puede ser reducido a 5-metil-THF por la metil-THF reductasa e intervenir en la síntesis de metionina; o bien puede ser oxidado a 10-formil-THF por la C₁-THF sintasa e intervenir en la biosíntesis de purinas.

I.2.4. Catabolismo de la glicina

La glicina es transportada a la mitocondria donde es catabolizada mediante el sistema de ruptura de glicina (Glycine Cleavage System, GCS), donando un grupo monocarbono al THF y dando lugar a 5,10-metilen-THF y amonio. Este sistema está formado por cuatro proteínas de las cuales tres tienen actividad enzimática y la cuarta es una proteína portadora. Las enzimas se denominan: proteína P o glicina deshidrogenasa (GLDC); proteína T o aminometil transferasa (AMT); y proteína L o dihidroliipoamida deshidrogenasa (DLA). La proteína portadora se denomina proteína H (GCSH) y a ésta se une covalentemente una molécula de ácido lipoico. En la primera reacción catalizada por la

proteína P la glicina es descarboxilada liberándose CO_2 . Se requiere de la proteína H a la que quedará unida el resto de la glicina. En la siguiente reacción, catalizada por la proteína T, a partir de THF y de glicina descarboxilada se genera 5,10-metilen-THF, amonio y la proteína H unida a lipoato. En la última reacción, la proteína L oxida el lipoato unido a la proteína H [8] (Fig. 7).

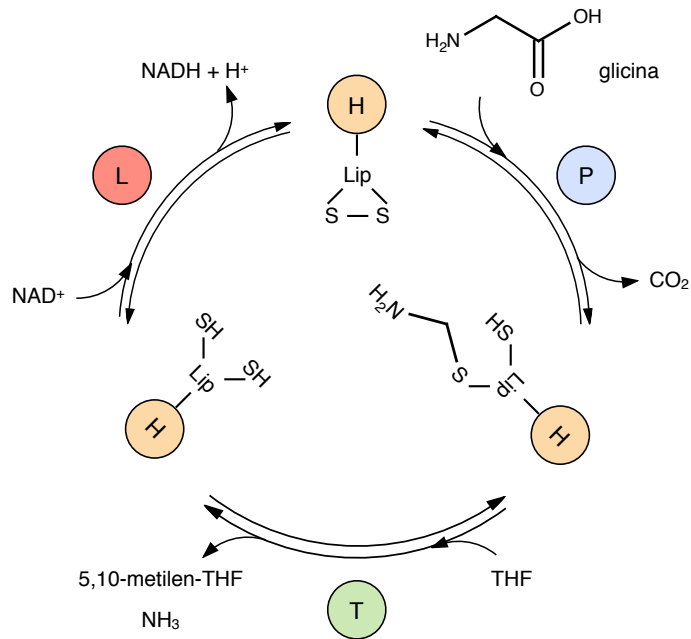


Figura 7: Representación esquemática de la reacción de ruptura de glicina (GCS). En círculos se representan las cuatro proteínas que forman parte del GCS: H, P, T y L. Lip: grupo lipoil.

El 5,10-metilen-THF generado por el sistema de ruptura de glicina puede ser degradado hasta formiato por la C_1 -tetrahidrofolato sintasa, para después ser transportado al citoplasma donde intervendrá en la síntesis de purinas [9]. La C_1 -THF sintasa es una proteína multienzimática que se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria y que posee tres actividades: 5,10-metilen-THF deshidrogenasa, 5,10-metilen-THF ciclohidrolasa y 10-formil-THF sintetasa [10] (Fig. 8). El 10-formil-THF producido es utilizado en la formilación del metionil-ARNt (Met-ARNt) necesario para el inicio de la síntesis de proteínas en la mitocondria [11].

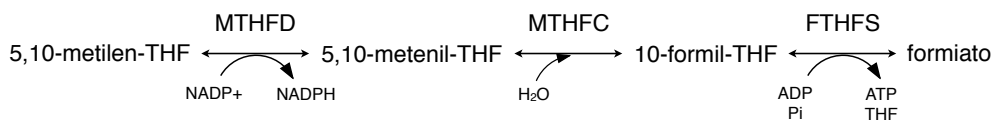


Figura 8: Representación esquemática de las reacciones enzimáticas llevadas a cabo por la C_1 -THF-sintasa. MTHFD: 5,10-metilen-THF deshidrogenasa; MTHFC: 5,10-metilen-THF ciclohidrolasa; FTHFS: 5-formil-THF sintetasa.

I.3. TRANSPORTE DE FOLATOS AL INTERIOR CELULAR

Las enzimas dependientes de folatos tienen mayor afinidad por éstos en su forma poliglutámica. Sin embargo los folatos sólo pueden atravesar la membrana celular en su forma monoglutámica. Así, para que tenga lugar la absorción intestinal de los folatos se tiene que hidrolizar previamente la cola de glutamatos mediante la acción de la pteroil- γ -glutamihidrolasa, quedando un grupo glutamato unido al p-aminobenzoato [12].

En mamíferos existen tres receptores y dos transportadores de folatos. Dos de los receptores de folatos, FR α y FR β (Folate Receptor), son proteínas unidas a la membrana celular por medio de la molécula de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estos receptores unen folatos con una alta afinidad y el transporte al interior celular tiene lugar por un proceso endocítico [13]. El tercer receptor, FR δ , es una proteína secretada. La localización tisular es específica para cada uno de los receptores. Los dos transportadores de folatos son: el transportador de folato reducido RFC (Reduced Folate Carrier) [14]; y el transportador de folato acoplado a protones PCFT (Proton-Coupled Folate Transporter) [15], ambos pertenecientes a la superfamilia de transportadores solubles. La actividad del RFC es máxima a un pH neutro y el transporte de folatos se realiza utilizando el gradiente de grupos fosfato mediante un sistema antiporte. Por otra parte, el pH óptimo del PCFT es ácido y el transporte de folatos al interior celular tiene lugar aprovechando el gradiente de protones mediante un sistema simporte [16]. Ambos tipos de transportadores están presentes en todos los tejidos.

Una vez absorbidos los folatos monoglutámicos desde el intestino pasan al torrente sanguíneo donde se encuentran principalmente en la forma 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-THF). En el interior celular, la cola de glutamatos es nuevamente añadida mediante la enzima folilpoli- γ -glutamato sintetasa, lo cual permite la retención de los folatos en el interior celular así como una mayor afinidad por estos cofactores de las enzimas implicadas en las reacciones de transferencia de grupos monocarbono.

En bacterias del *phylum* Firmicutes, que incluye a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*, se ha descrito un transportador de folatos [17] codificado por el gen *folT* [18]. Este transportador está asociado a un factor de acoplamiento a energía (ECF, de sus siglas en inglés) [19], siendo el transporte de folatos dependiente de ATP. Recientemente se ha dilucidado en *Lactobacillus brevis* la estructura cristalina de estos dos componentes [20].

I.4. COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LOS FOLATOS

En las células eucariotas existe una compartimentalización tanto de los folatos como de las enzimas dependientes de éstos. Se encuentran principalmente presentes en el citoplasma y la mitocondria y su distribución depende de las distintas funciones que se llevan a cabo en cada uno de estos compartimentos. Las reacciones dependientes de folatos que se llevan a cabo en el citoplasma son la síntesis de purinas, de pirimidinas y la biogénesis de grupos metilo; mientras que en la mitocondria se lleva a cabo la formilación del Met-ARNt y el catabolismo de la glicina. En ambos compar-

timentos se lleva a cabo la interconversión de serina y glicina, y es a través de estos dos aminoácidos el mecanismo por el que tiene lugar la comunicación entre la mitocondria y el citoplasma [21].

El metabolismo de los folatos está regulado por un mecanismo en el que están implicados los niveles de serina y glicina en la célula. El 5,10-metilen-THF, que es el componente principal del metabolismo de grupos monocarbono, se origina en el citoplasma a partir de la serina mediante la acción de la SHMT; mientras que en la mitocondria se forma a través del sistema de rotura de glicina y puede ser catabolizado posteriormente hasta 10-formil-THF, para participar en la formilación del Met-ARnt, o hasta formiato. En el citoplasma el 5,10-metilen-THF participa principalmente en la síntesis de metionina, en la formación de otras formas de folatos más oxidadas y en la síntesis de purinas y pirimidinas. Por otra parte, el formiato originado en la mitocondria suplementa el aporte de grupos monocarbono necesarios en la síntesis de purinas. Así, un descenso en los niveles citoplasmáticos de 5,10-metilen-THF provoca un aumento en la transcripción de los genes implicados en el catabolismo de la glicina en la mitocondria como forma de cubrir la necesidad de grupos monocarbono en el citoplasma [22].

A continuación se representa de manera esquemática la interrelación de todas las reacciones enzimáticas en las que intervienen las distintas formas de folatos y su localización intracelular (Fig. 9).

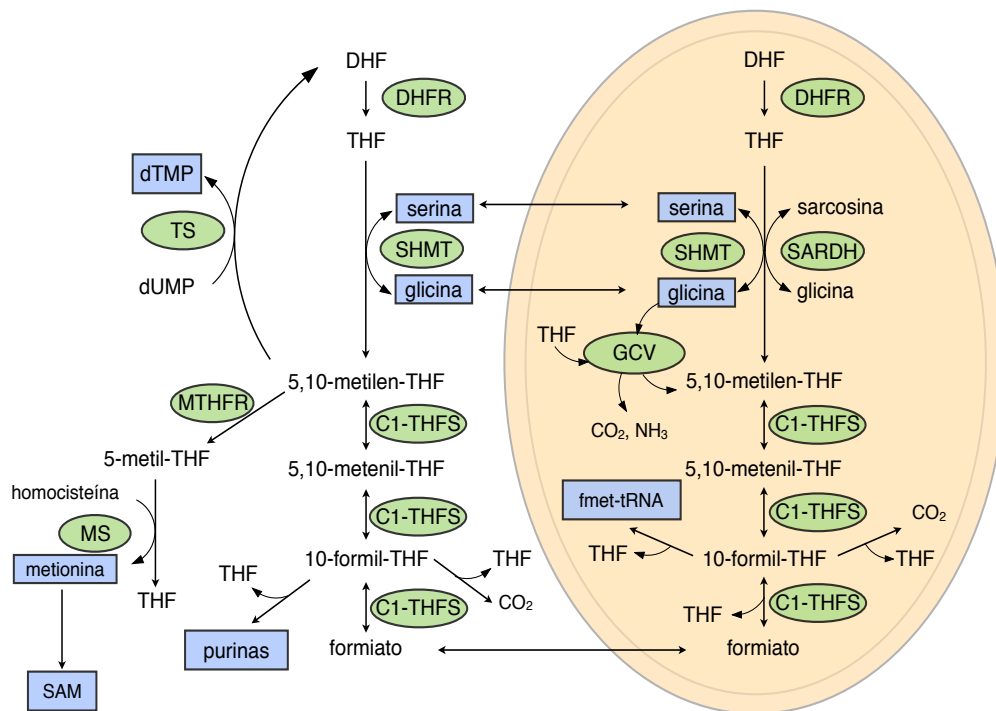


Figura 9: Representación esquemática de las distintas reacciones en las que están implicados los folatos, su interrelación y su compartimentalización.

I.5.DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO: CONSECUENCIAS

El ácido fólico es un componente esencial en la dieta ya que el ser humano carece de la capacidad para sintetizarlo. Esta vitamina está presente principalmente en vegetales de hoja verde oscuro, cítricos, legumbres, cereales y vísceras de animales. La cantidad diaria recomendada es de 200 µg, aunque en mujeres embarazadas se aconseja un consumo de entre 400 y 800 µg.

Su deficiencia se ha relacionado con diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, anemia, defectos en el tubo neural, siendo el más conocido de estos últimos la espina bífida, y enfermedades neurodegenerativas [23]. Las causas por las que una deficiencia en ácido fólico puede desencadenar en estos trastornos están en relación con la implicación de los folatos en la síntesis de nucleótidos y aminoácidos, aunque en algunos casos el mecanismo no está claro todavía.

I.5.1.Anemia megaloblástica

La anemia megaloblástica es un tipo de anemia macrocítica que se caracteriza por un mayor tamaño de los glóbulos rojos (determinado por el volumen corpuscular medio) debido a un defecto en la síntesis de ADN. Sus causas pueden ser una deficiencia de ácido fólico, de vitamina B₁₂ o de ambas. El ácido fólico es necesario en el proceso de la eritropoyesis por su implicación en la síntesis de ADN. En su ausencia, durante la formación de los glóbulos rojos se prolonga la fase de división celular dando como resultado eritroblastos de mayor tamaño [24].

Las mujeres embarazadas tienen un mayor riesgo de sufrir deficiencia de ácido fólico y anemia megaloblástica, riesgo que se ve aumentado en aquellas regiones, principalmente en África, donde la malaria es endémica. Esta enfermedad, transmitida por parásitos del género *Plasmodium*, provoca hemolisis aumentando la necesidad de ácido fólico para la producción de glóbulos rojos [25].

Existe también una relación entre niveles elevados de homocisteína en sangre y anemia megaloblástica cuando existe una deficiencia en ácido fólico o vitamina B₁₂. Esto es debido a la disfunción en el metabolismo de la homocisteína al faltar alguno de los cofactores de la metionina sintasa. La presencia de altas concentraciones de homocisteína en sangre podría ser una causa de la hemolisis observada en pacientes con anemia megaloblástica, ya que este compuesto es un tiol muy reactivo que puede formar enlaces con los grupos sulfhidrilo (SH) de las proteínas afectando a la membrana plasmática de los glóbulos rojos [26].

I.5.2.Cáncer

Algunos tipos de cáncer que se han relacionado con una deficiencia de ácido fólico son el de colon [27], el de mama [28] y el de cérvix [29].

Una deficiencia en ácido fólico puede provocar un aumento de la relación dUMP/dTMP debido a la incapacidad de la timidilato sintasa de realizar su acción ante la escasez de su cofactor 5,10-metilen-THF, resultando en una incorporación masiva de uracilo en el ADN. La acción de la maquinaria de reparación celular puede entonces ser insuficiente y provocar roturas de doble cadena en el

ADN. Ambos fenómenos se han relacionado con un aumento de riesgo de cáncer y daños neuronales [30, 31].

Otro fenómeno relacionado con el desarrollo de diversos tipos de cáncer es la alteración en el grado de metilación del ADN, bien por hipermetilación de ciertos genes, y por tanto la reducción de su expresión, o por hipometilación de oncogenes, causando su sobreexpresión [32]. La S-adenosilmetionina (SAM) es un donador de grupos metilo implicado en la metilación del ADN, acción necesaria tanto para la regulación de la expresión génica como para el mantenimiento de la conformación cromosómica. Una deficiencia en ácido fólico resulta en una reducción de los niveles de metionina, y por tanto de SAM, por la incapacidad de la metionina sintasa de realizar su acción en ausencia de 5-metil-THF, lo que, a su vez, provoca una disminución del grado de metilación del ADN [30].

1.5.3. Enfermedades cardiovasculares

Como consecuencia de una deficiencia en ácido fólico se puede dar un aumento en los niveles de homocisteína en sangre por la incapacidad de la metionina sintasa para ejercer su acción. Este hecho se ha relacionado con diversas enfermedades cardiovasculares, como la cardiopatía isquémica [33], enfermedades cerebrovasculares [34], la enfermedad vascular periférica y la enfermedad de la arteria coronaria [35].

El daño vascular que se observa en las cardiopatías es debido a un estrés oxidativo inducido por niveles elevados de homocisteína, aunque el mecanismo por el cual se produce no está claro todavía. La homocisteína es un tiol que puede reaccionar consigo mismo o con otros tioles, como la cisteína y el glutatión, formándose enlaces disulfuro. En la oxidación de la homocisteína se producen especies reactivas de oxígeno que disminuyen la disponibilidad del óxido nítrico, el cual induce la vasodilatación. Esto puede deberse a la oxidación del óxido nítrico para dar peroxinitrito o a la inactivación de la óxido nítrico sintasa endotelial. También se ha observado que la homocisteína afecta a la función de dos enzimas antioxidantes presentes en el endotelio: la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa. Este estrés oxidativo también puede dar lugar a una peroxidación lipídica y a un proceso inflamatorio que da como resultado lesiones ateroscleróticas [36].

El aumento de homocisteína en sangre, y por tanto de un aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, puede ser debido a una deficiencia en ácido fólico o a la presencia de una mutación en la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), concretamente en la citosina en la posición 677 que es sustituida por una timina (677 C→T-MTHFR). Esta enzima cataliza la reacción de síntesis de 5-metil-THF y metionina a partir de 5,10-metilen-THF y homocisteína. La presencia de este polimorfismo se ha relacionado, por ejemplo, con la enfermedad de la arteria coronaria [37].

1.5.4. Defectos en el tubo neural

Uno de los defectos más conocidos en el desarrollo del tubo neural es la espina bífida. Esta malformación se caracteriza por el incorrecto cierre de los pliegues neurales espinales durante la formación del tubo neural haciendo que posteriormente no se dé el correcto cierre de la columna verte-

bral en esta zona, de manera que parte de la médula espinal queda sin protección [38]. La gravedad de esta malformación depende del grado en que queda expuesta la medula espinal. Otra malformación del tubo neural de mayor gravedad es la anencefalia que se caracteriza por un incorrecto cierre de los pliegues neurales craneales [38].

El mecanismo por el cual se dan defectos en el tubo neural (NTDs, de sus siglas en inglés) durante el desarrollo embrionario no está claro. Un aporte insuficiente de ácido fólico durante el embarazo se ha relacionado con un aumento en el riesgo de desarrollo de NTDs en el feto; y diversos estudios han demostrado que la suplementación con ácido fólico en mujeres embarazadas previene su desarrollo [39, 40]. El desarrollo del tubo neural tiene lugar entre la tercera y cuarta semana de gestación por lo que se recomienda en los embarazos planificados la suplementación con ácido fólico en los meses previos a la concepción. También se ha relacionado la hiperhomocisteinemia con un aumento en la incidencia de NTDs [41].

Sin embargo, se ha observado que su desarrollo tiene también un componente genético. La mutación 677 C→T-MTHFR es la más estudiada y se ha visto que ésta aumenta el riesgo de desarrollo de NTDs [42] y este riesgo disminuye mediante la administración de ácido fólico. Recientemente también se han asociado mutaciones en los genes pertenecientes al sistema de rotura de glicina (GCS) *AMT* y *GLDC*, que codifican la proteína T y la proteína P respectivamente, con un aumento en el riesgo de desarrollo de estas malformaciones [43]. La relación entre una disminución de la actividad del sistema de rotura de glicina con los defectos en el tubo neural podría ser: la disminución de formiato disponible para la síntesis de purinas y pirimidinas necesarias para la rápida división celular que se da en el cierre de la columna [43]; y la reducción en la disponibilidad de metionina necesaria para la metilación del ADN [43, 44].

I.5.5. Alzheimer

Existe una relación entre el desarrollo de daños vasculares y el desarrollo de Alzheimer, encontrándose en ambos casos elevados niveles de homocisteína en sangre. Este aumento de homocisteína en sangre en enfermos de Alzheimer puede venir determinado por una deficiencia de vitamina B₁₂ o de ácido fólico, o bien por variaciones genéticas en la MTHFR [45]. También se ha asociado la deficiencia de estas dos vitaminas con una deficiente metilación necesaria para la síntesis de fosfolípidos, mielina y neurotransmisores [46].

II. ÁCIDO FÓLICO SINTÉTICO

II.1. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL

Existe un gran interés en la producción industrial de ácido fólico como suplemento por la dificultad de alcanzar los niveles adecuados a través de la dieta y evitar así las consecuencias de su deficiencia. En el año 1998 la FDA en Estados Unidos instó a la fortificación con ácido fólico sintético de los alimentos con contenido en cereales como una forma de prevenir defectos en el tubo neural du-

rante el desarrollo embrionario [47]. La cantidad establecida fue de 140 µg por cada 100 g de cereales, lo que supondría para la población un aporte extra de 100 µg de folatos al día. Actualmente ascienden a 58 los países que se han sumado a la fortificación obligatoria de alimentos con contenido en cereales para la prevención de NTDs [48].

También es necesaria la producción de ácido fólico, en concreto el 5-formiltetrahidrofolato clínicamente conocido como leucovorin, como suplemento para aquellas personas que reciben un tratamiento contra el cáncer con metotrexato. Esta forma de folato, descubierta en los años 40, es la forma más estable de la vitamina aunque no tiene una función conocida como donador de grupos monocarbono [49]. Existe controversia acerca de la formación de esta forma de folato. Por un lado se ha demostrado que se sintetiza a partir de 5,10-meteniltetrahidrofolato en una reacción de hidrólisis llevada a cabo por la SHMT en presencia de glicina [50], sin embargo otros estudios sugieren que se genera por hidrólisis química [51]. El 5-formil-THF puede ser convertido de nuevo en 5,10-metenil-THF en una reacción irreversible catalizada por la meteniltetrahidrofolato sintetasa (MTHFS) [52] y a partir de éste dar lugar a la formación del resto de folatos. Por este motivo, el 5-formil-THF se usa como agente rescatador de la toxicidad provocada por el metotrexato que es un inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa (DHFR).

Actualmente no existen procesos fermentativos para la producción de ácido fólico en la industria, el cual se produce exclusivamente por síntesis química. Un primer método de producción química, descrito por primera vez en los años 40, consiste en la condensación de tres compuestos: 2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidina, ácido p-aminobenzoilglutámico y 2,3-dibromopropanal [53]. Posteriores modificaciones de este método han permitido mejorar su rendimiento. La sustitución de 2,3-dibromopropanal, un dihalopropionaldehído, por trihaloacetonas, y el uso de sodio bisulfito como agente reductor aumenta el rendimiento y la pureza del producto [54].

II.2.VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA FORTIFICACIÓN CON ÁCIDO FÓLICO SINTÉTICO

La forma sintética del ácido fólico es la forma oxidada de esta vitamina y por tanto más estable, pero no se sintetiza de manera biológica. De los folatos presentes en la naturaleza, los más estables son el 5-formil-THF y el 10-formil-THF; y el más abundante en los alimentos es el 5-metil-THF. La biodisponibilidad del ácido fólico en el tracto intestinal es superior a la de los folatos, aunque existe cierta controversia a la hora de determinar en qué proporción esto es así. Existen diversas causas que afectan a la disponibilidad de los folatos para su absorción intestinal, entre los que cabe citar: la necesidad de hidrolizar la cola de glutamatos y la presencia de ciertos alimentos que pueden afectar negativamente a la actividad de la pteroil-γ-glutamilhidrolasa [55]; la matriz alimentaria [56]; la estabilidad de los folatos durante el proceso de elaboración de los alimentos y la digestión; y la presencia de determinados compuestos como el ácido ascórbico que aumentan su estabilidad [57].

A pesar de que el ser humano es capaz de metabolizar el ácido fólico sintético a las formas biológicamente activas mediante la DHFR, existe una gran controversia sobre si puede tener un efecto perjudicial para la salud. Se ha demostrado la importancia de un correcto aporte de esta vitamina y

cómo la fortificación de alimentos con la forma sintética puede prevenir el desarrollo de NTDs, enfermedades cardiovasculares o cáncer aunque se sabe poco sobre los posibles efectos adversos de la exposición continuada a la forma sintética de esta vitamina [58].

Por un lado, diversos estudios han demostrado la reducción en el riesgo de padecer ciertas patologías asociadas a la deficiencia de folatos mediante la fortificación de alimentos con ácido fólico sintético. Desde que en 1991 se demostrara la relación entre el aporte de ácido fólico y la disminución del riesgo de desarrollo de defectos en el tubo neural [59], y la obligación a partir de 1998 en Estados Unidos de fortificar con ácido fólico aquellos alimentos con contenido en cereales [47], han sido muchos los estudios que se han realizado en diversos países demostrando este beneficio. Este efecto es aún mayor cuando el consumo de estos suplementos se inicia antes de la concepción, ya que el desarrollo del tubo neural ocurre en las primeras semanas de gestación. También se ha asociado la fortificación de alimentos con ácido fólico con la disminución del riesgo de padecer cáncer colorrectal [60].

Por otro lado, a pesar de que muchos estudios han demostrado la reducción en el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer mediante la fortificación de alimentos o la ingesta de suplementos, el efecto contrario se observa ante la existencia previa de un tumor, potenciando en este caso su desarrollo [61, 62]. Esto se puede deber a que, dado el rápido crecimiento de las células tumorales, un aumento de ácido fólico representa un beneficio para la síntesis de ADN y por tanto para la división celular [62]; aunque también se han observado alteraciones en la metilación de histonas que afectan a las células precancerosas [61].

Se ha observado que cuando se expone de manera continuada a esta forma sintética de la vitamina, existe un nivel de saturación a partir del cual se deja de metabolizar el ácido fólico sintético acumulándose en sangre [63, 64]. La DHFR es la enzima encargada de la reducción del ácido fólico a DHF y después a THF, para a continuación sintetizarse el resto de folatos. Esta enzima se expresa a niveles bajos en el hígado por lo que a concentraciones elevadas de ácido fólico sintético su actividad se ve saturada [65]. El umbral a partir del cual sucede esto ha sido estimado alrededor de los 200 μg de ácido fólico sintético [64, 66]. Teóricamente existiría una competencia entre el ácido fólico sintético y el DHF, procedente de los alimentos ingeridos, por la DHFR [58]. Ante una alta concentración de ácido fólico, la reducción de éste a DHF predominaría sobre la reducción de DHF a THF, causando una deficiencia en la célula de las formas de folatos biológicamente activas.

Otro efecto negativo de la fortificación de alimentos con altas concentraciones de ácido fólico sintético sería el enmascaramiento de una deficiencia de vitamina B₁₂ y el empeoramiento de los síntomas de ésta, al ser confundida muchas veces con una deficiencia de ácido fólico. La vitamina B₁₂ está estrechamente relacionada con el ácido fólico, ya que ambas son cofactores de la metionina sintetasa, por lo que la deficiencia de cualquiera de estas dos vitaminas impediría la actividad de esta enzima. Este efecto es más acusado en aquellas personas de edad avanzada [46]. Algunos estudios han demostrado que en personas con un bajo aporte de vitamina B₁₂, el aumento del consumo de ácido fólico resulta en anemia y en un impedimento cognitivo; mientras que en personas con un aporte adecuado de vitamina B₁₂, el aumento en la ingesta de ácido fólico protege frente a este impedimento cognitivo [67].

Por tanto, la suplementación con ácido fólico resulta beneficiosa para la prevención de ciertas patologías, aunque es necesario un correcto aporte de ácido fólico y vitamina B₁₂ dada la interconexión entre ambas vitaminas. Sin embargo, la forma sintética del ácido fólico también presenta ciertos inconvenientes que podrían ser solventados mediante la sustitución de éste por las formas naturales de esta vitamina. Por ejemplo, así se evitaría el enmascaramiento de una deficiencia de vitamina B₁₂, ya que con la administración de todas las formas de folatos, principalmente el 5-metil-THF, no existiría un umbral de saturación [68].

III. *Ashbya gossypii*

III.1. BIOLOGÍA

Ashbya gossypii fue descrito por primera vez en 1926 por Ashby y Nowell como el patógeno causante de la estigmatomicosis en la planta de algodón (*Gossypium hirsutum*) y también en cítricos en regiones subtropicales [69]. La propagación de las esporas se realiza a través de insectos hemípteros. Posteriormente, en los años 40 fue descrita la capacidad de este organismo para producir grandes cantidades de riboflavina (vitamina B₂) [70], la cual confiere una coloración amarillenta característica en este organismo.

A. gossypii es un hongo hemiascomiceto incluido dentro la familia Saccharomycetaceae por la proximidad filogenética con *Saccharomyces cerevisiae* [71]. Posee el genoma más pequeño descrito en células eucariotas, con tan solo 9,2 Mb distribuido en siete cromosomas, y el 90% de los genes de *A. gossypii* tiene su ortólogo en *S. cerevisiae* [72].

La reproducción sexual en *A. gossypii* es hasta el momento desconocida. El ciclo asexual de este organismo comienza con la germinación de una espora, la cual es uninucleada y haploide; tiene forma lanceolada y posee un filamento filiforme que permite la adhesión de las esporas entre sí dentro del saco esporífero. La espora germina mediante un crecimiento isotrópico para a continuación formarse una hifa lateral. Seguidamente comienza el crecimiento de una hifa lateral opuesta y una vez establecida la polaridad, las hifas comienzan a ramificarse formando el micelio juvenil. La fase de micelio maduro se caracteriza por una ramificación en forma dicótoma de las hifas en el extremo de éstas. Cuando hay escasez de nutrientes en el medio, en las zonas más viejas del micelio las hifas se separan por los septos formándose los sacos esporíferos que contendrán las esporas en un número variable entre 8 y 16. Finalmente, se da la autólisis de los sacos esporíferos liberando las esporas, comenzando de nuevo el ciclo. La síntesis de riboflavina se da a lo largo de todo el crecimiento del organismo para suplir las necesidades celulares de esta vitamina; sin embargo su producción va en aumento acumulándose en las vacuolas [73], pudiéndose observar una coloración amarillenta a partir de los 3-4 días de cultivo. La producción máxima se alcanza cuando se llega a la fase estacionaria del crecimiento, momento en el que la masa micelial es máxima, coincidiendo con el inicio de la esporulación. La producción de riboflavina se ha descrito como un mecanismo para proteger las esporas de la luz ultravioleta [74].

La ausencia de un ciclo sexual conocido, la inexistencia de plásmidos propios de este organismo y la ineficacia en la transformación con plásmidos de otros organismos, debido a su inestabilidad, impidió en un primer momento la utilización de técnicas moleculares para la manipulación genética de este hongo. Actualmente existen métodos eficaces para la manipulación genética de *A. gossypii* mediante integración en el genoma de ADN transformante por un mecanismo de recombinación homóloga [75]. La eficacia de la transformación depende de la longitud de las regiones homólogas a la región del genoma donde se quiere realizar la integración. Se ha demostrado que secuencias homólogas de 45 pares de bases en los extremos del fragmento de ADN que se quiere integrar es suficiente para que se dé la recombinación homóloga [76].

III.2.INTERÉS INDUSTRIAL

La riboflavina (vitamina B₂) es una vitamina hidrosoluble de color amarillo-anaranjado, precursor de los cofactores FMN (flavín mononucleótido) y FAD (flavín-adenín dinucleótido) implicados en reacciones redox. Esta vitamina se sintetiza a partir de GTP y ribulosa-5-fosfato a través de seis pasos enzimáticos controlados por los genes *RIB* (*RIB1-RIB5* y *RIB7*) [77]. El GTP se sintetiza bien por la ruta de síntesis *de novo* de purinas a partir de PRPP, o bien por la ruta de recuperación de purinas consumiendo PRPP.

Debido a la capacidad de sobreproducir riboflavina, *A. gossypii* tiene un gran interés industrial, donde esta vitamina se emplea como aditivo y colorante para el consumo humano, y como suplemento en la alimentación animal. Aunque en un primer momento se utilizó el ascomicete *Eremothecium ashbyii* para la producción de esta vitamina, pronto fue sustituido por *A. gossypii* que mostraba una mayor estabilidad genética [78]. La mejora de cepas en este microorganismo ha permitido alcanzar niveles de producción de riboflavina de hasta 10-15 g/L [79]. Se ha observado que tanto la composición del medio como las condiciones de cultivo afectan a la producción de esta vitamina. La adición de determinados compuestos precursores de la riboflavina al medio, como ribitol o purinas [80], o el uso de aceites vegetales como fuente de carbono [81] provocan un aumento en la síntesis de riboflavina. Posteriormente, el desarrollo de técnicas para la manipulación genética en *A. gossypii* [75, 76] ha permitido la obtención de cepas con mayor producción de esta vitamina, principalmente mediante la alteración de la ruta de síntesis de purinas [82-84], aunque también se han realizado modificaciones para la obtención de cepas capaces de excretar la riboflavina sintetizada al medio de cultivo [85].

En la actualidad *A. gossypii* es explotado en la industria por la empresa BASF. Junto a *A. gossypii*, otros microorganismos empleados en la industria para la producción de riboflavina son *Bacillus subtilis* y *Candida famata*. Actualmente se ha sustituido completamente la síntesis química por procesos fermentativos [86]. La producción anual de riboflavina por las empresas BASF, DSM y ADM es de unas 6000 toneladas [87].

III.3.RUTA BIOSINTÉTICA DEL ÁCIDO FÓLICO

La ruta de síntesis de ácido fólico, muy conservada a lo largo de la evolución, está presente en microorganismos y plantas. Sin embargo, los animales no tienen esa capacidad, aunque sí poseen las enzimas encargadas de la interconversión de los folatos partiendo de dihidrofolato.

Su síntesis tiene como precursor común con la ruta de biosíntesis de riboflavina el GTP. En *A. gossypii* esta ruta consta de ocho reacciones en las que a partir de GTP se sintetiza tetrahidrofolato. El GTP dará lugar al anillo de pteridina, al cual se añadirá un p-aminobenzoato, que proviene de la ruta de biosíntesis del corismato, y un glutamato mediante sendas reacciones de condensación (Fig. 10).

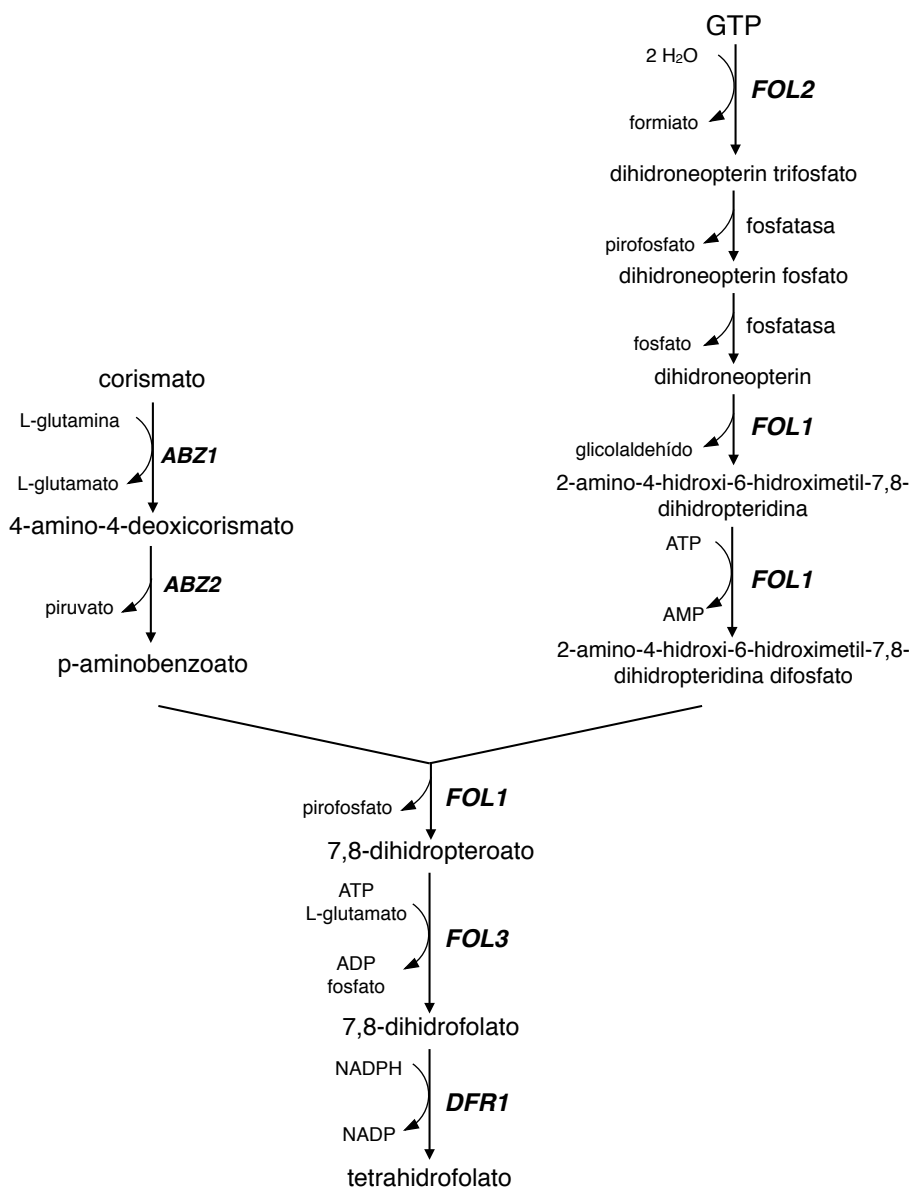


Figura 10: Esquema de la ruta de biosíntesis de ácido fólico desde GTP hasta tetrahidrofolato.

En la primera etapa de la ruta, el GTP es convertido a dihidroneopterin trifosfato, reacción catalizada por la enzima GTP ciclohidrolasa I codificada por el gen *FOL2*. Este gen se encuentra en el cromosoma VII de *A. gossypii* y codifica una proteína de 243 aminoácidos.

A continuación tienen lugar dos reacciones de desfosforilación por fosfatasas inespecíficas que originan la dihidroneopterin. Las siguientes tres reacciones de la ruta son catalizadas por una enzima multifuncional codificada por el gen *FOL1*, que se localiza en el cromosoma VI. Esta proteína de 820 aminoácidos tiene tres actividades enzimáticas: dihidroneopterin aldolasa (DHNA), 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropteridina pirofosfoquinasa (HPPK) y dihidropteroato sintetasa (DHPS). La primera de estas actividades, DHNA, cataliza la reacción de escisión de un glicolaldehído de la dihidroneopterin para dar lugar a 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-7,8-dihidropteridina; compuesto que a continuación es fosforilado por la actividad HPPK para formar 2-amino-4-hidro-6-hidroximetil-7,8-dihidropteridina difosfato. Por último, la actividad DHPS cataliza la reacción de condensación del compuesto generado en la anterior reacción con el p-aminobenzoato para dar 7,8-dihidropteroato.

El p-aminobenzoato es sintetizado a partir de corismato en dos reacciones. La primera reacción es catalizada por la aminodeoxicorismato sintasa, codificada por el gen *ABZ1* [88], dando 4-amino-4-deoxicorismato. A continuación, la enzima aminodeoxicorismato liasa, codificada por el gen *ABZ2* [89], libera un piruvato para dar p-aminobenzoato.

La siguiente reacción de la ruta es catalizada por la dihidrofolato sintasa (DHFS), en una reacción de condensación de un grupo glutamato con el 7,8-dihidropteroato para dar 7,8-dihidrofolato. El gen que codifica esta enzima de 406 aminoácidos es *FOL3* y está localizado en el cromosoma V.

Finalmente, el 7,8-dihidrofolato es reducido a tetrahidrofolato por acción de la dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima de 211 aminoácidos codificada por el gen *DFR1*, situado en el cromosoma III de *A. gossypii*.

OBJETIVOS

Obtención de cepas de hongos sobreproductoras de ácido fólico para su posible aplicación industrial.

Para lograr este objetivo nos propusimos las siguientes estrategias:

RESULTADOS

III.4.

DISCUSIÓN

IV.

tivo.

CONCLUSIONES

1)

2)

3)

4)

5)

6)

7)

8)

9)

MATERIALES Y MÉTODOS

I.MATERIAL BIOLÓGICO

I.1.CEPAS DE *Escherichia coli*

Las cepas empleadas se detallan a continuación:

Cepa	Genotipo	Procedencia
DH5 α	<i>supE44, λlacU169 (F80lacZλM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan,1983

I.2.CEPA *Lactobacillus casei sp. rhamnosus*

La cepa de *L. rhamnosus* utilizada para el ensayo microbiológico del ácido fólico es la cepa ATTC® 7469™ [90].

I.3.CEPAS DE *Ashbya gossypii*

En la siguiente tabla se recogen las distintas cepas utilizadas en este trabajo, su genotipo y procedencia:

II.MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS

Todas las cepas empleadas de *E. coli*, *L. rhamnosus* y *A. gossypii* se mantienen en los medios adecuados en 25% glicerol a -80°C.

II.1.*E. coli*

Las cepas de *E.coli* se cultivaron habitualmente a 37°C. Para los cultivos líquidos la agitación era a 250-300 r.p.m. La composición del medio de cultivo utilizado se detalla a continuación:

LB: 0.5% extracto de levadura, 1% bacto triptona, 1% NaCl. Cuando se empleó como medio de selección se añadió ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), higromicina-B (100 µg/ml) o espectinomicina (100 µg/ml). El medio sólido contenía agar al 1.5%.

II.2.*L. rhamnosus* ATTC® 7469™

La cepa de *L. rhamnosus* utilizada se cultivó habitualmente a 37°C. Los medios comerciales empleados para su crecimiento y mantenimiento fueron los siguientes:

Lactobacilli Agar AOAC (Difco™): este medio se empleó para el mantenimiento de la cepa a 4°C.

Folic Acid Casei Medium (Difco™): este medio carece de ácido fólico y se utilizó para la determinación de ácido fólico. A este medio se le añadió ácido ascórbico al 0.05%.

II.3.*A. gossypii*

Las cepas de *A. gossypii* se cultivaron habitualmente a 28°C. Todos los medios que se detallan a continuación se ajustaron a pH 6.8.

MA2: 2% bacto peptona, 0.2% extracto de levadura, 0.06% mioinositol, 2% glucosa. Este medio se utilizó como medio rico.

SPA: 0.3% soytona (soybean meal), 0.3% extracto de levadura, 0.3% extracto de malta, 2% cornstepliquor y 1% glucosa. Este medio se utilizó como medio de esporulación.

SMM: 1% glucosa, 0.03% mioinositol, 0.05% L-asparagina. Tras autoclavar se añadió 0.36 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.85 mM NaCl, 0.18 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de una solución esterilizada por filtración. Este medio se empleó como medio mínimo sintético.

Todos los medios sólidos contenían agar al 2% excepto el medio de esporulación que contenía agar al 4%.

III. VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS

III.1. VECTORES

Los vectores a partir de los cuales se construyeron los distintos plásmidos de este trabajo se detallan a continuación:

pBluescript SK⁺ (Stratagene): plásmido autoreplicativo de 2.9 kb funcional en bacteria, que contiene el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación *ColE1*, y un fragmento del operón *lac* de *E. coli*, que codifica la enzima β -galactosidasa. Contiene una secuencia de clonación múltiple, con 21 sitios de restricción, que permite la selección de clones recombinantes por α -complementación de cepas de *E. coli* portadoras de la delección *lacZ M15*.

pGEM-Teasy (Promega): Es un vector de 3 kb empleado para la clonación de fragmentos de ADN que han sido amplificados por PCR con polimerasas que añaden un deoxinucleótido de adenina a los extremos 5'. Este vector contiene un deoxinucleótido de timina en los extremos 3' de cada cadena. Contiene el origen de replicación del fago filamentoso *f1*, el gen de resistencia a ampicilina, los promotores de la ARN polimerasa de los fagos *T7* y *SP6* flanqueando a una región de clonación múltiple que se encuentra en la secuencia codificante de la enzima β -galactosidasa.

KanMX [91]: formado por la secuencia codificante del gen de resistencia a kanamicina del transposón bacteriano Tn903, bajo el control del promotor y terminador del gen *TEF1* de *A. gossypii*. Este marcador confiere resistencia a G418 en *A. gossypii* y a kanamicina en bacterias, útil para la construcción de plásmidos en *E. coli*.

Otros plásmidos que se han construido en el laboratorio y que se han empleado en este trabajo son:

pJR1742: Deriva del vector Bluescript SK⁺ y lleva el marcador Hyg^R que confiere resistencia a higromicina. La secuencia codificante del gen de resistencia a higromicina de *Streptomyces hygrosopicus* [92] se encuentra bajo el control del promotor y terminador del gen *LEU2* de *A. gossypii*.

pJR2824: Contiene el marcador *KanMX* flanqueado por la secuencia *loxP* (*loxP-KanMX-loxP*). El marcador *KanMX* está compuesto por la secuencia codificante del gen que confiere resistencia a kanamicina del transposón bacteriano Tn903, bajo el control del promotor y terminador del gen *TEF1* de *A. gossypii*. Las secuencias *loxP* están constituidas por dos secuencias repetidas e invertidas de 8 pares de bases (ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT). Estas secuencias son reconocidas por la recombinasa Cre.

pJR3014: deriva del plásmido pJR1742. Contiene el marcador *Hyg^R* y el gen que codifica para la recombinasa Cre.

pJR3298: deriva del plásmido pJR2824. Contiene el marcador *KanMX* flanqueado por los sitios *loxP* y el promotor *GPDp* de *A. gossypii*.

pJR3388: contiene el módulo *loxP-KanMX-loxP* obtenido a partir del plásmido pJR2824 por amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos oli-loxPK-F1 y oli-loxPKan-short-5.

III.2.OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por biomers.net (Ulm, Alemania) y sus secuencias se detallan en la siguiente tabla:

Las secuencias de nucleótidos subrayadas corresponden a las dianas de restricción que se han introducido en los oligonucleótidos para su introducción en el fragmento de ADN a amplificar mediante PCR. Las secuencias marcadas en negrita corresponden a los cuatro nucleótidos específicos introducidos en los oligonucleótidos que contienen una diana de restricción para *Bsal* y que es donde corta esta enzima.

IV.PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

IV.1.OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*

El método empleado para la obtención de ADN plasmídico de *E. coli* fue el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor.

IV.2.OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *A. gossypii*

El micelio, recogido por filtración a partir de 100 ml de cultivo, se lavó con H₂O destilada y se resuspendió en 15 ml de una solución 1 M sorbitol, 20 mM EDTA y 20 mg Zymoliase (Zymoliase-20T Seikagaku Kogyo). Se incubó a 37°C hasta la formación de protoplastos a partir del micelio (30-60 minutos). A continuación se añadieron 5 ml de una solución, hasta obtener una concentración final de: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA y 0,5% SDS, y se incubó 20 minutos a 65°C. La muestra se extrajo dos veces con fenol-cloroformo y los ácidos nucleicos se precipitaron por la adición de 2,5 volúmenes de etanol 100%. El precipitado se resuspendió en 150 µl de H₂O destilada y tratado con RNasa (50 mg) a 37°C para la eliminación del ARN de la muestra. Por último, el ADN se

precipitó añadiendo un volumen de 0.3 M AcONa pH 7 y 0,6 volúmenes de isopropanol, se desecó y se resuspendió en 50-100 µl de H₂O destilada.

IV.3.OBTENCIÓN DE ARN DE *A. gossypii*

El micelio recogido por filtración de 50 ml de cultivo fue congelado con N₂ líquido y pulverizado con un mortero. El polvo obtenido fue resuspendido en 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen) y tratado según las especificaciones dadas por el proveedor. Cuando fue necesario, el ARN fue tratado con 20u de DNasa I libre de RNasas (Roche) y posteriormente vuelto a precipitar. El ARN se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 nm.

V.MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

V.1.TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli*

Para la transformación de células competentes se mezclaron 100 µl de células con el ADN transformante (10 pg-25 ng) y se incubó en hielo 20 minutos. La mezcla de transformación se sometió a choque térmico a 42°C durante 2 minutos seguido de 2 minutos en hielo. Se añadieron 500 µl de LB a la mezcla y se incubó entre 45-60 minutos a 37°C. Finalmente, se recogió la mezcla de transformación por centrifugación a 8000 g durante 3 minutos y se sembró en el medio de selección adecuado.

V.2.OBTENCIÓN DE ESPORAS DE *A. gossypii*

Micelio fresco se sembraba en varias placas del medio de esporulación (SPA) y se incubaba a 28°C durante 3-6 días. Con una espátula estéril se recogía el micelio y se pasaba a un matraz al que se añadían 4 ml por placa de una solución acuosa que contenía 1 mg/ml de Zymoliase (Zymoliase-20T Seikagazu Kogyo) para lisar el micelio y liberar las esporas contenidas en las hifas. La muestra se incubaba en agitación (250 r.p.m.) durante 30 minutos a 37°C. Las esporas se recogieron por centrifugación a 2000 g y se lavaron dos veces con Triton X-100 al 0.03%. Por último se resuspendían en medio rico (MA2) y se guardaban a 4°C para su posterior uso.

V.3.TRANSFORMACIÓN DE ESPORAS DE *A. gossypii*

Medio rico líquido (100 ml) era inoculado con 10⁶ esporas e incubado durante 12-13 horas a 28°C en agitación (250 r.p.m.). Las esporas germinadas eran recogidas por filtración, lavadas con H₂O destilada y resuspendidas en 20 ml de una solución 50 mM tampón fosfato potásico pH 7.5, 25 mM DTT. A continuación se incubaban a 28°C en agitación (200 r.p.m.) durante 30 minutos y se recogían por centrifugación a 8000 g. Se lavaban dos veces con tampón frío STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂) y se resuspendían en 1 ml del mismo tampón. Para el proceso de transformación se transferían 200 µl de la suspensión de esporas a una cubeta de electroporación 0.4 cm³ (Bio-Rad) enfriada previamente en hielo. Tras añadir el ADN (5-10 µg), la muestra se sometía a

un campo eléctrico (1500 V, 200 W, 25 mF) en un electroporador Gene-Pulser (Bio-Rad). Inmediatamente la mezcla se recogía con 1 ml de medio rico (MA2), se transfería a un tubo de 1,5 ml y se centrifugaba a 8000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminaba y las esporas se resuspendían en 200 µl de medio rico. Finalmente, se sembraba en placas de medio sólido (MA2). Las placas se incubaban a 28°C durante 5-6 horas para permitir la regeneración de las esporas. Transcurrido ese tiempo, se añadía la cobertera (5 ml) que consistía en una solución acuosa de agarosa 0.4% fundida que contenía el antibiótico de selección a la concentración adecuada.

V.4.OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES DE *A. gossypii*

Los transformantes primarios, debido a su naturaleza heterocariótica, deben ser esporulados para la posterior selección de los transformantes homocarióticos portadores de la integración estable. Dichos transformantes se verificaron mediante la técnica de PCR.

VI.MANIPULACIÓN DEL ADN

VI.1.DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y LIGACIÓN

Las diferentes enzimas de restricción que se emplearon en este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales Fermentas, Promega y New England Biolabs y se utilizaron de acuerdo a las especificaciones dadas por los diferentes proveedores.

La ligación entre fragmentos de ADN con extremos compatibles se realizó con la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las moléculas de interés se seleccionaron por transformación de células competentes de *E. coli* DH5α con la mezcla de ligación y su posterior selección en medio sólido con el antibiótico correspondiente.

VI.2.ELECTROFORESIS DE ADN

La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa 0,8% (p/v) con bromuro de etidio. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante (100 V) en tampón TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM ácido bórico, 2mM EDTA). Las bandas se observaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un sistema de fotografía digital Gel Doc 2000 Bio-Rad.

VI.3.PURIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE ADN EN GEL DE AGAROSA

El fragmento de ADN de interés, visualizado bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm) con un transiluminador, era recortado de un gel de agarosa con un bisturí. A continuación el fragmento de ADN era purificado con el kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences) siguiendo las especificaciones dadas por el proveedor.

VI.4.AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de ADN se emplearon diferentes polimerasas dependiendo de las necesidades de cada caso. Para la amplificación de fragmentos con una alta fidelidad se emplearon las polimerasas High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas), Expand High Fidelity (Roche) o Phusion® (Thermo Scientific). Para el resto de amplificaciones se utilizó la polimerasa GoTaq (Fermentas). En todos los casos las reacciones se prepararon según las especificaciones dadas por el proveedor.

El proceso de amplificación constaba de una primera etapa de desnaturalización (5 min a 94°C), seguida de una etapa de amplificación (30 ciclos) y finalmente de una etapa de extensión (10 min a 72°C). Cada ciclo de la etapa de amplificación incluía 1 min de desnaturalización a 94°C, 40 s de anillamiento a la temperatura adecuada dependiendo de la temperatura media de fusión de los oligonucleótidos (T_m) y por último un tiempo de extensión a 72°C durante 1 min/kb de ADN a amplificar. Cuando se utilizó la polimerasa Phusion® (Thermo Scientific) estas condiciones variaron. En este caso el proceso de amplificación constaba de una etapa de desnaturalización a 98°C durante 1 min, seguida de una etapa de amplificación (35 ciclos), y una etapa de extensión a 72°C durante 10 min. La etapa de amplificación incluía 10 s de desnaturalización a 98°C, 30 s a una temperatura dependiente de la T_m de los oligonucleótidos y un tiempo de extensión a 72°C durante 15 s/kb de ADN a amplificar. Cuando el tamaño de los oligonucleótidos excedía las 20 pb, la temperatura de anillamiento era 3°C superior a la T_m del oligonucleótido con menor temperatura de fusión.

VI.5.SECUENCIACIÓN DE ADN

Todas las muestras fueron secuenciadas en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Laboratorio 314, Edificio Departamental. Salamanca, España. E-mail: serv.sadn@usal.es) mediante el método de Sanger en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) y el kit “ABI PRISM® BigDye™ Primer v.30 Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaq® DNA Polymerase, FS” (Applied Biosystems).

VI.6.SISTEMA DE CLONACIÓN INFUSION® (CLONTECH LABORATORIES, INC.)

El sistema InFusion® consiste en la clonación de uno o más fragmentos en un vector, poseyendo todos ellos al menos 15 pb solapantes entre sí en sus extremos. La introducción de esas 15 pb en los extremos se puede realizar mediante amplificación por PCR de todos los fragmentos emplean-

do oligonucleótidos que incluyan esas secuencias en sus extremos 5'. La clonación se llevaba a cabo siguiendo las especificaciones del proveedor.

VI.7.SISTEMA DE CLONACIÓN GOLDEN GATE

El sistema Golden Gate [93] consiste en la unión de dos o más fragmentos, procedentes cada uno de ellos de un plásmido, y su clonación en un vector de destino. Cada fragmento de ADN tiene en cada uno de sus extremos una diana de restricción para *Bsal*. Esta enzima de restricción es de tipo II: corta fuera de la secuencia de reconocimiento GGTCTC dejando tras la digestión extremos cohesivos de cuatro nucleótidos. Esto permite en el diseño de los oligonucleótidos la introducción de dianas de restricción para *Bsal* junto a una secuencia determinada de cuatro nucleótidos, que será donde corte la enzima. Esa secuencia será complementaria a aquella secuencia de cuatro nucleótidos del fragmento al que se quiere unir, perdiéndose la diana de restricción tras la ligación.

Cada fragmento de ADN se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos específicos incluyendo una diana de restricción para *Bsal* en los extremos. Los oligonucleótidos se diseñaron incluyendo secuencias de 4 nucleótidos específicos para cada uno de los fragmentos donde cortará la enzima dejando extremos cohesivos. Cada fragmento de ADN obtenido se clonó en un vector pGEM Teasy (Promega). El vector de destino utilizado era el pJR3652 que contiene dianas de restricción para *SapI*. Este plásmido se obtuvo mediante la amplificación por PCR del fragmento lacZ empleando los oligos C12B-fw y C12B-rv, que contienen en los extremos 5' dianas de restricción para *SapI*, y su ligación al vector pDGBVC12B mediante el sistema de clonación In-Fusion® (Clontech Laboratories, Inc.). Este vector contiene el gen que confiere resistencia a espectinomicina como marcador de selección.

En un tubo de 0,2 ml se añadían: 100 ng del vector de destino digerido previamente con *SapI*; cantidades equimolares de cada uno de los plásmidos que contienen los fragmentos de ADN a clonar; 1X buffer NEB T4; 1X BSA, 1 μ l *Bsal* (New England Biolabs® Inc.), 1 μ l ligasa NEB T4 2.000.000 u/ml (New England Biolabs® Inc.); y H₂O hasta un volumen final de 15 μ l.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: 35 ciclos (37°C durante 3 min y 16°C durante 4 min) seguido de un ciclo (50°C durante 5 min y 80°C durante 5 min) [94].

Células DH5 α se transformaban con 10 μ l de la reacción y los transformantes se seleccionaban en medio sólido LB suplementado con espectinomicina (Sigma-Aldrich®) y kanamicina (ForMedium™).

VI.8.CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

VI.8.1.

VI.8.2.

VI.8.3.

VI.8.4.

VI.8.5.

VII.MANIPULACIÓN DEL ARN

VII.1.SÍNTESIS DE ADN COPIA (ADNc)

El ADN copia (ADNc) fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total libre de ADN en una reacción de transcripción reversa empleando el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche). La reacción se realizó utilizando el cebador oligo-dT (18 mer) contenido en el kit y siguiendo las especificaciones del proveedor.

VII.2.PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR)

Para la PCR cuantitativa a tiempo real se empleó 1 µl de ADNc sintetizado de cada una de las muestras a analizar y se amplificó en un termociclador LightCycler® 480 System (Roche) usando oligonucleótidos específicos de los genes diana a una concentración final 0.5 µM cada uno. Para la amplificación se utilizó el kit “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” (Roche) de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor. La reacción se realizó en placas de PCR de 96 pocillos (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (Roche)).

Las condiciones empleadas para la amplificación fueron las siguientes: activación de la ADN polimerasa durante 10 min a 95°C, 45 ciclos (95°C durante 10 s, T_m de los oligos durante 20 s, 72°C durante 30 s), un ciclo (95°C durante 5 s, T_m+10°C durante 1 min, 97°C) y por último una incubación a 40°C durante 10 s.

La cuantificación de cada transcrito se determinó de acuerdo al ciclo (Ct) en el que la señal de fluorescencia comienza a incrementar de manera exponencial, por encima de la señal de fluorescencia de fondo. Los niveles de ARNm de cada gen fueron normalizados frente al gen *AgACT1* de la misma muestra mediante el método del incremento $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct_{gen\ diana} - Ct_{AgACT1}$. Para realizar la cuantificación relativa de cada muestra frente a la muestra control, después de la normalización de

cada muestra, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$ [95]. A partir de estos valores, se calculó la media y la desviación estándar.

Para la cuantificación absoluta

Se realizaron diluciones seriadas 1:10 del plásmido en el rango de 10^2 a 10^7 copias/ μl que se emplearon para la construcción de la curva estándar. Para la determinación del número de copias del plásmido se empleó la siguiente fórmula [96], en la que la concentración del plásmido en gramos se determinó mediante la medición de la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm:

$$\text{N}^\circ \text{ copias} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ copias/mol} \times \text{g ADN}}{\text{pb ADN} \times 660 \text{ g/mol/pb}}$$

El número de copias del gen diana se determinó relacionando los valores Ct de cada muestra con la recta patrón y se normalizó frente al número de copias del gen *AgACT1*.

VIII.DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

VIII.1.ENSAYO BIOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO

VIII.1.1.Obtención y tratamiento de extractos celulares y sobrenadantes

La cuantificación de ácido fólico en las diferentes cepas se realizó a partir de cultivos líquidos (100 ml) de MA2, suplementados con 20 mg/L de pABA, que fueron inoculados con 200 μl de un preinóculo (5 ml de MA2 inoculados con 200 μl de esporas) que había sido incubado durante 48 horas. A intervalos de 24 horas se tomaron muestras de 10 ml de cultivo. Estas muestras se dividieron en dos, una de ellas para la determinación del micelio presente en el medio y la otra para la determinación de ácido fólico.

Para la determinación del peso seco, el micelio presente en cada muestra fue recogido por filtración, lavado una vez con H_2O destilada y secado a 65°C , tras lo cual fue pesado.

Para la determinación de ácido fólico intracelular, la muestra de cultivo fue filtrada y lavada una vez con H_2O destilada. El micelio se resuspendió en 1 ml de una solución tampón 0.1 M fosfato potásico pH 6.1, ascorbato de sodio 2% (p/v), β -mercaptoetanol 0.1% (v/v). Se añadieron 0.1 volúmenes de bolas de vidrio 425-600 mm de diámetro (Sigma) y se sometieron a agitación en una FastPrep FP120 (BIO 101, Vista, California), 3 ciclos de 15 segundos. Se centrifugó a 8000 g y el sobrenadante se pasó a otro tubo de 1.5 ml. Se tomaron 250 μl de cada muestra, se llevaron a un volumen final de 10 ml de solución 0.1M fosfato potásico pH 6.1 y se añadieron 2.5 mg de pancreatina

de cerdo (Sigma) para hidrolizar la cola de poliglutamatos de los folatos. Las muestras se incubaron 2-4 horas a 37°C en la oscuridad. Pasado ese tiempo, las muestras se incubaron a 95°C en un baño de H₂O destilada durante 30 min para liberar los folatos que pudieran estar unidos a proteínas. Las muestras fueron entonces filtradas usando un filtro de 0.2 µm.

Para la determinación de ácido fólico extracelular, se recogieron 500 µl de sobrenadante y la muestra se diluyó 1:1 en buffer a una concentración final 0.1 M fosfato potásico pH 6.1, ascorbato de sodio 2% (p/v), β-mercaptoetanol 0.1% (v/v). A continuación, las muestras se filtraron usando un filtro de 0.2 µm.

VIII.1.2. Análisis de las muestras

Para la preparación de la curva estándar, 50 mg de ácido fólico se disolvieron en 500 ml de NaOH 0,6 mM. El pH se ajustó entre 7 y 8 con HCl. 10 ml de esta solución se llevó a un volumen de 500 ml. 1 ml de esta última solución se llevó a un volumen de 1 L, obteniendo así una concentración de 2 ng/ml de ácido fólico. Esta solución se esterilizó por filtración empleando un filtro 0.2 µm.

El ensayo para la determinación del ácido fólico se realizó en placas microtiter de 96 pocillos. Para la curva estándar, se añadieron 135 µl del medio Folic Acid Casei Medium a una concentración 1X y 15 µl del stock de ácido fólico 2 ng/ml a un pocillo, y 75 µl del medio al resto de pocillos. Se hicieron diluciones seriadas 1:2 a partir del primer pocillo. La curva se hizo por duplicado. Las concentraciones finales de ácido fólico fueron de 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 y 0,00625 ng/ml. Para las muestras, se añadieron a un pocillo 135 µl del medio a concentración 1X y 15 µl de la muestra a analizar; al resto de pocillos se añadieron 75 µl de medio. Al igual que con los estándares, se hicieron diluciones seriadas 1:2 partiendo del primero pocillo. Las diluciones finales realizadas para los extractos fueron desde , dependiendo de la muestra; y para los sobrenadantes, de , dependiendo de la muestra.

Una colonia de *L. rhamnosus*, crecida en medio sólido Lactobacilli Agar AOAC, fue resuspendida en 1 ml de Folic Acid Casei Medium 1X. De esta solución, se realizó una dilución 1:100 en el mismo medio y se añadieron 75 µl de esta solución a cada pocillo. La placa microtiter se selló, y se incubó a 37°C en la oscuridad durante 48 horas. Pasado este tiempo, el crecimiento de *L. rhamnosus* se midió por absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Varioskan Flash (Thermo Scientific)). La concentración de ácido fólico de cada muestra se determinó por extrapolación de la absorbancia a la recta patrón que se obtuvo con los estándares y la posterior corrección del factor de dilución.

Para la determinación de ácido fólico en los sobrenadantes se midió la concentración de esta vitamina presente en el medio rico MA2 (18,20 ± 6,20 µg/L) y esta cantidad se restó de las concentraciones obtenidas de cada una de las muestras.

VIII.2.HPLC

Los análisis de las distintas formas de folatos se realizaron mediante la técnica HPLC en colaboración con el laboratorio del Dr. Gaspar Ros, Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia, llevados a cabo por el Dr. Rubén López Nicolás.

VIII.2.1.Obtención y tratamiento de extractos celulares

Los cultivos se realizaron de la misma forma explicada en el punto VIII.1., filtrando en esta ocasión 20 ml de cultivo para la determinación de folatos. El micelio se resuspendió en 5 ml de buffer Ches-Hepes pH 7.85, se añadieron 0.1 volúmenes de bolas de vidrio 425-600 mm de diámetro (Sigma) y se sometieron a vortex. Se llevó a ebullición durante 10 min y a continuación se enfrió en hielo. Se ajustó el pH de las muestras a 4.9, se añadió 1 ml de conjugasa obtenida a partir de riñón de cerdo (20 mg de conjugasa/ml de ascorbato de sodio 1%, Sigma) y se incubó a 37°C en un baño durante 3 horas. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se filtró utilizando filtros de 0.45 μm de diámetro y se les añadió 10-15 μl de β -mercaptoetanol. Los folatos se purificaron empleando cartuchos de intercambio aniónico SAX. Previamente es necesario el equilibrado de los cartuchos. Para ello se lavaron con dos volúmenes de hexano, seguido de un volumen de metanol, un volumen de agua mili-Q y por último se hizo pasar un volumen de buffer fosfato 0.01 M, β -mercaptoetanol 0.1 % pH 7. A continuación se pasaron las muestras lentamente, seguido de un lavado con agua mili-Q. Por último los folatos se eluyeron en 2-2.5 ml de buffer de elución (acetato sódico 0.1 M, ácido ascórbico 1 %, NaCl 10 %, β -mercaptoetanol 0.1 %).

VIII.2.2.Calibración de los estándares

Los patrones utilizados fueron obtenidos de Dr Schirck's Laboratories y fueron: ácido dihidrofólico, ácido tetrahidrofólico, ácido 5-metiltetrahidrofólico, ácido 5-formiltetrahidrofólico y ácido fólico.

Se prepararon soluciones stock a una concentración 100 $\mu\text{g/ml}$. Para ello se disolvió 10 mg del estándar en 10 ml de una solución sodio borato 5 mM, β -mercaptoetanol 0.4 %. A continuación se hizo una dilución 1:10 en ácido ascórbico 1 % y alícuotas de 1 ml se guardaron a -80°C.

Se procedió al cálculo exacto de las concentraciones de los estándares. Un mililitro de la solución stock se diluyó en 100 ml de un buffer fosfato 0.1 M, ácido ascórbico 0.1 %, pH 7 y se midió en un espectrofotómetro a 290 nm. El cálculo de las concentraciones se realizó mediante las absorbancias y los coeficientes de extinción molar ($\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [97]: THF $\epsilon=29.1$; 5-metil-THF $\epsilon=31.7$; 5-formil-THF $\epsilon=37.2$; ácido fólico $\epsilon=27.6$.

VIII.2.3. Análisis de las muestras

Para la determinación de las distintas formas de folatos se utilizó un sistema de HPLC-MS/MS formado por un sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), equipado con una bomba capilar y autoinyector, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Ion Trap XCT Plus (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

40 μ l de cada muestra se inyectaron en una columna Supelco Discovery C18 (5 μ m, 10 x 2,1 mm) a una velocidad de flujo de 200 μ l/min. La fase móvil A utilizada fue ácido fórmico 0,1% y la fase móvil B, acetonitrilo y ácido fórmico 0,1%. El tiempo de adquisición para cada muestra fue de 45 min, seguido de un período de 15 min para reequilibrar la columna antes de la inyección de la siguiente muestra. Se usó un programa de gradiente, comenzando con 10% de fase móvil B y 90% de fase móvil A y manteniéndolo durante 5 min. A continuación, se aumentó la concentración de la fase móvil B hasta 100% en 25 min, manteniendo durante 10 min, y volviendo a bajar a una concentración de 10 % en 5 min. El detector de ultravioleta se ajustó a una longitud de onda de 290 nm y el detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 280 nm y una de emisión de 350 nm.

El espectrómetro de masas se operó en modo positivo con un voltaje de spray capilar de 3500 V y una velocidad de barrido de 22000 (m/z)/min en un rango de 100 a 600 m/z . El objetivo Smart ICC se ajustó a 200.000 cuentas, mientras que el tiempo de acumulación máxima fue de 20 mseg. La presión del gas nebulizador (He) se fijó a 30 psi, y el gas de secado se ajustó a un flujo de 8 l/min a una temperatura de 350°C. La relación masa-carga (m/z) de los iones precursores y de los iones producto, obtenidos de la fragmentación de los iones precursores seleccionados, de cada compuesto se muestra en la tabla:

Compuesto	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)
pABA	138,0	120,0
Ácido fólico	442,2	295,0
DHF	444,2	297,2
THF	446,2	299,0
5-metil-THF	460,2	313,1
5-formil-THF	474,2	327,2

IX. SOPORTE INFORMÁTICO

El análisis de las secuencias de ADN se realizó con los distintos programas: EditSeq, SeqMan II y MegAlign, suministrados por ADNstar (ADNstar Inc, Madison, WI). La búsqueda de secuencias de genes de *A. gossypii* se realizó mediante la base de datos Ashbya Genome Database.

Las imágenes de geles de agarosa con muestras de ADN se tomaron con el equipo de fotografía electrónica Gel Doc 2000 (BioRad).

El análisis de los datos de PCR cuantitativa a tiempo real se realizó con el programa LightCycler® 480 Software, versión 1.5 (Roche).

El análisis de los espectros de masas obtenidos por HPLC-MS/MS se realizó con el programa DataAnalysis para LC/MSD Trap versión 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Germany).

La medición del crecimiento de *L. rhamnosus* para la determinación de la concentración de ácido fólico se realizó con el programa SkanIt® Software for Varioskan® Flash, versión 2.4.3 (Thermo Scientific).

La redacción de esta memoria se hizo con el programa Pages '09 versión 4.1 (Apple Inc.). La configuración de las distintas gráficas se realizó con el programa Numbers '09 (Apple Inc.). El análisis de imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated) y el programa Keynote '09 (Apple Inc.). La redacción de la bibliografía se hizo mediante el programa EndNote X4 (Thomson Reuters).

BIBLIOGRAFÍA

1. Wills L, **Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia"**. *Br Med J*, 1931. 1(3676): p. 1059-1064.
2. Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ, **The concentration of "folic acid"**. *J Am Chem Soc*, 1941. 63 (8): p. 2284.
3. Angier RB, Boothe JH, Hutchings BL, Mowat JH, Semb J, Stokstad EL, Subbarow Y, Waller CW, Cosulich DB, Fahrenbach MJ, Hultquist ME, Kuh E, Northey EH, Seeger DR, Sickels JP, Smith JM, **The structure and synthesis of the liver *L. casei* factor**. *Science*, 1946. 103(2683): p. 667-669.
4. Goulding CW, Postigo D, Matthews RG, **Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine**. *Biochemistry*, 1997. 36(26): p. 8082-8091.
5. Jarrett JT, Huang S, Matthews RG, **Methionine synthase exists in two distinct conformations that differ in reactivity toward methyltetrahydrofolate, adenosylmethionine, and flavodoxin**. *Biochemistry*, 1998. 37(16): p. 5372-5382.
6. Grillo MA, Colombatto S, **S-adenosylmethionine and its products**. *Amino Acids*, 2008. 34(2): p. 187-193.
7. Schirch L, **Serine hydroxymethyltransferase**. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1982. 53: p. 83-112.
8. Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K, **Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycemia**. *Proc, Jpn. Acad., Ser. B*, 2008. 84(7): p. 246-263.
9. McNeil JB, Bogner AL, Pearlman RE, **In vivo analysis of folate coenzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae***. *Genetics*, 1996. 142(2): p. 371-381.
10. Shannon KW, Rabinowitz JC, **Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* MIS1 gene encoding mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase**. *J Biol Chem*, 1988. 263(16): p. 7717-7725.
11. Bianchette R, Lucchini G, Crosti P, Tortora P, **Dependence of mitochondrial protein synthesis initiation on formylation of the initiator methionyl-tRNA^f**. *J Biol Chem*, 1977. 252(8): p. 2519-2523.
12. Chandler CJ, Wang TT, Halsted CH, **Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders**. *J Biol Chem*, 1986. 261(2): p. 928-933.
13. Maziarz KM, Monaco HL, Shen F, Ratnam M, **Complete mapping of divergent amino acids responsible for differential ligand binding of folate receptors α and β** . *J Biol Chem*, 1999. 274(16): p. 11086-11091.
14. Balamurugan K, Said HM, **Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake**. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. 291(1): C189-C193.
15. Nakai Y, Inoue K, Abe N, Hatakeyama M, Ohta K, Otagiri M, Hayashi Y, Yuasa H, **Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1**

- heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter.** *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 322(2): p. 469-476.
16. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID, **Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia.** *Annu Rev Nutr*, 2011. 31: p. 177-201.
 17. Shane B, Stokstad EL, **Transport and metabolism of folates by bacteria.** *J Biol Chem*, 1975. 250(6): p. 2243-2253.
 18. Eudes A, Erkens GB, Slotboom DJ, Rodionov DA, Naponelli V, Hanson AD, **Identification of genes encoding the folate- and thiamine-binding membrane proteins in Firmicutes.** *J Bacteriol*, 2008. 190(22): p. 7591-7594.
 19. Henderson GB, Zevely EM, Huennekens FM, **Mechanism of folate transport in *Lactobacillus casei*: evidence for a component shared with the thiamine and biotin transport systems.** *J Bacteriol*, 1979. 137(3): p. 1308-1314.
 20. Xu K, Zhang M, Zhao Q, Yu F, Guo H, Wang C, He F, Ding J, Zhang P, **Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*.** *Nature*, 2013. 497(7448): p. 268-272.
 21. Appling DR, **Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes.** *FASEB J*, 1991. 5(12): p. 2645-2651.
 22. Piper MD, Hong SP, Ball GE, Dawes IW, **Regulation of the balance of one-carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem*, 2000. 275(40): p. 30987-30995.
 23. Lucock M, **Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes.** *Mol Genet Metab*, 2000. 71(1-2): p. 121-138.
 24. Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH, **Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis.** *Clin Med Res*, 2006. 4(3): p. 236-241.
 25. Fishman SM, Christian P., West KP, **The role of vitamins in the prevention and control of anaemia.** *Public Health Nutr*, 2000. 3(2): p. 125-150.
 26. Ventura P, Panini R, Tremosini S, Salvioli G, **A role for homocysteine increase in haemolysis of megaloblastic anaemias due to vitamin B₁₂ and folate deficiency: results from an in vitro experience.** *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1739(1): p. 33-42.
 27. Kim YI, **Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility.** *J Nutr*, 2005. 135(11): p. 2703-2709.
 28. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, **A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer.** *JAMA*, 1999. 281(17): p. 1632-1637.
 29. Flatley JE, McNeir K, Balasubramani L, Tidy J, Stuart EL, Young TA, Powers HJ, **Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. 18(10): p. 2782-2789.
 30. Knock E, Deng L, Krupenko N, Mohan RD, Wu Q, Leclerc D, Gupta S, Elmore CL, Kruger W, Tini M, Rozen R, **Susceptibility to intestinal tumorigenesis in folate-deficient mice may**

- be influenced by variation in one-carbon metabolism and DNA repair. *J Nutr Biochem*, 2011. 22(11): p. 1022-1029.
31. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN, **Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. 94(7): p. 3290-3295.
 32. Zingg JM, Jones PA, **Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis.** *Carcinogenesis*, 1997. 18(5): p. 869-882.
 33. Remacha AF, Souto JC, Rámila E, Perea G, Sarda MP, Fontcuberta J, **Enhanced risk of thrombotic disease in patients with acquired vitamin B12 and/or folate deficiency: role of hyperhomocysteinemia.** *Ann Hematol*, 2002. 81(11): p. 616-621.
 34. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PWF, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH, **Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis.** *N Engl J Med*, 1995. 332(5): p. 286-291.
 35. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meadeley R, Daly L, Witteman J, Graham I, **Low circulating folate and vitamin B₆ concentrations: Risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease.** *Circulation*, 1998. 97(5): p. 437-443.
 36. Weiss N, **Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function.** *Curr Drug Metab*, 2005. 6(1): p. 27-36.
 37. Alam MA, Husain SA, Narang R, Chauhan SS, Kabra M, Vasisht S, **Association of polymorphism in the thermolabile 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia with coronary artery disease.** *Mol Cell Biochem*, 2008. 310(1-2): p. 111-117.
 38. Greene ND, Copp AJ, **Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube.** *Prenat Diagn*, 2009. 29(4): p. 303-311.
 39. Mosley BS, Cleves MA, Siega-Riz AM, Shaw GM, Canfield MA, Waller DK, Werler MM, Hobbs CA, **Neural tube defects and maternal folate intake among pregnancies conceived after folic acid fortification in the United States.** *Am J Epidemiol*, 2008. 169(1): p. 9-17.
 40. Chen G, Song X, Ji Y, Zhang L, Pei L, Chen J, Liu J, Li C, Zheng X, **Prevention of NTDs with periconceptional multivitamin supplementation containing folic acid in China.** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2008. 82(8): p. 592-596.
 41. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Nijhuis JG, Thomas CM, Borm GF, Eskes TK, **Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid.** *Am J Obstet Gynecol*, 1995. 172(5): p. 1436-1441.
 42. Bailey LB, Gregory JF 3rd, **Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement.** *J Nutr*, 1999. 129(5): p. 919-922.

43. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung K, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S, **Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans.** *Hum Mol Genet*, 2012. 21(7): p. 1496-1503.
44. Wang L, Wang F, Guan J, Le J, Wu L, Zou J, Zhao H, Pei L, Zheng X, Zhang T, **Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects.** *Am J Clin Nutr*, 2010. 91(5): p. 1359-1367.
45. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM, **Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease.** *Arch Neurol*, 1998. 55(11): p. 1449-1455.
46. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH, **B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly.** *Am J Clin Nutr*, 2000. 71(2): p. 614-620.
47. US FDA, **Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid.** *Fed Reg*, 1996. 61: p. 8781-8797.
48. Youngblood ME, Williamson R, Bell KN, Johnson Q, Kancherla V, Oakley GP, **2012 Update on global prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly.** *Birth Defects Res A*, 2013. 97(10): p. 658-663.
49. Stover P, Schirch V, **The metabolic role of leucovorin.** *TIBS*, 1993. 18(3): p. 102-106.
50. Stover P, Schirch V., **Serine hydroxymethyltransferase catalyzes the hydrolysis of 5,10-methenyltetrahydrofolate to 5-formyltetrahydrofolate.** *J Biol Chem*, 1990. 265(24): p. 14227-14233.
51. Baggott JE, **Hydrolysis of 5,10-methenyltetrahydrofolate to 5-formyltetrahydrofolate at pH 2.5 to 4.5.** *Biochemistry*, 2000. 39(47): p. 14647-14653.
52. Holmes WB, Appling DR, **Cloning and characterization of methenyltetrahydrofolate synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem*, 2002. 277(23): p. 20205-20213.
53. Waller CW, Hutchings BL, Mowat JH, Stokstad EL, Boothe JH, Angier RB, Semb J, Subbarow Y, Cosulich DB, Fahrenbach MJ, Hultquist ME, Kuh E, Northey EH, Seeger DR, Sickels JP, Smith JM, **Synthesis of pteroylglutamic acid (liver *L. casei* factor) and pteronic acid.** *J Am Chem Soc*, 1948. 70(1): p. 19-22.
54. Uyeo S, Mizukami S, Kubota T, Takagi S, **Modified synthesis of pteroylglutamic acid.** *J Am Chem Soc*, 1950. 72: p. 5339-5340.
55. Wei MM, Gregory J 3rd, **Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border pteroylpolyglutamate hydrolase in vitro: potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamyl folate.** *J Agric Food Chem*, 1998. 46(1): p. 211-219.
56. van het Hof KH, Tijburg LB, Pietrzik K, Weststrate JA, **Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix.** *Br J Nutr*, 1999. 82(3): p. 203-212.

57. Verlinde PH, Oey I, Hendrickx ME, Van Loey AM, Temme EH, **L-ascorbic acid improves the serum folate response to an oral dose of [6S]-5-methyltetrahydrofolic acid in healthy men.** *Eur J Clin Nutr*, 2008. 62(10): p. 1224-1230.
58. Lucock M, **Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention?** *BMJ*, 2004. 328(7433): p. 211-214.
59. MRC Vitamin Study Research Group, **Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study.** *Lancet*, 1991. 338(8760): p. 131-137.
60. Gibson TM, Weinstein SJ, Pfeiffer RM, Hollenbeck AR, Subar AF, Schatzkin A, Mayne ST, Stolzenberg-Solomon R, **Pre- and postfortification intake of folate and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study in the United States.** *Am J Clin Nutr*, 2011. 94(4): p. 1053-1062.
61. Piyathilake CJ, Macaluso M, Celedonio JE, Badiga S, Bell WC, Grizzle WE, **Mandatory fortification with folic acid in the United States appears to have adverse effects on histone methylation in women with pre-cancer but not in women free of pre-cancer.** *Int J Womens Health*, 2009. 1: p. 131-137.
62. Ulrich CM, Potter JD, **Folate supplementation: too much of a good thing?** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. 15(2): p. 189-193.
63. Kelly P, McPartlin J, Goggins M, Weir DG, Scott JM, **Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements.** *Am J Clin Nutr*, 1997. 65(6): p. 1790-1795.
64. Sweeney McPartlin J, Scott J, **Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum.** *BMC Public Health*, 2007. 7:41.
65. Bailey SW, Ayling JE, **The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake.** *PNAS*, 2009. 106(36): p. 15424-15429.
66. Sweeney MR, McPartlin J, Weir DG, Scott JM, **Measurements of sub-nanomolar concentrations of unmetabolised folic acid in serum.** *J Chromatogr B*, 2003. 788(1): p. 187-191.
67. Morris MS, Jacques P, Rosenberg IH, Selhub J, **Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification.** *Am J Clin Nutr*, 2007. 85(1): p. 193-200.
68. Obeid R, Holzgreve W, Pietrzik K, **Is 5-methyltetrahydrofolate an alternative to folic acid for the prevention of neural tube defects?** *J Perinat Med*, 2013. 41(5): p. 469-483.
69. Ashby SF, Nowell W, **The fungi of stigmatomycosis.** *Ann Bot*, 1926. 40: p. 69-84.
70. Wickerham LJ, Flickinger MH, Johnston RM, **The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*.** *Arch Biochem*, 1946. 9: p. 95-98.
71. Prillinger H, Schweigkofler W, Breitenbach M, Briza P, Staudacher E, Lopandic K, Molnár O, Weigang F, Ibl M, Ellinger A, **Phytopathogenic filamentous (*Ashbya*, *Eremothecium*) and**

- dimorphic fungi (*Holleya*, *Nematospora*) with needle-shaped ascospores as new members within the *Saccharomycetaceae*. *Yeast*, 1997. 13(10): p. 945-960.
72. Dietrich FS, Voegeli S, Brachat S, Lerch A, Gates K, Steiner S, Mohr C, Pöhlmann R, Luedi P, Choi S, Wing RA, Flavier A, Gaffney TD, Philippsen P, **The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome**. *Science*, 2004. 304(5668): p. 304-307.
73. Förster C, Santos MA, Ruffert S, Krämer R, Revuelta JL, **Physiological consequence of disruption of the *VMA1* gene in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii***. *J Biol Chem*, 1999. 274(14): p. 9442-9448.
74. Stahmann KP, Arst HJ, Althöfer H, Revuelta JL, Monschau N, Schlüpen C, Gätgens C, Wiesenburg A, Schlösser T, **Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light**. *Environ Microbiol*, 2001. 3(9): p. 545-550.
75. Steiner S, Wendland J, Wright MC, Philippsen P, **Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii***. *Genetics*, 1995. 140(3): p. 973-987.
76. Wendland J, Ayad-Durieux Y, Knechtle P, Rebischung C, Philippsen P, **PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii***. *Gene*, 2000. 242(1-2): p. 381-391.
77. Revuelta JL, Buitrago MJ, Santos MA, **Riboflavin-biosynthesis in fungi**. Patent nr. WO9526406, 1998.
78. Demain AL, **Riboflavin oversynthesis**. *Annu Rev Microbiol*, 1972. 26: p. 369-388.
79. Demain AL, **Microbial production of primary metabolites**. *Naturwissenschaften*, 1980. 67(12): p. 582-587.
80. Mehta SU, Mattoo AK, Modi VV, **Ribitol and flavinogenesis in *Eremothecium ashbyii***. *Biochem J*, 1972. 130(1): p. 159-166.
81. Özbas T, Kutsal T, **Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyii* and *Ashbya gossypii***. *Enzyme Microb Technol*, 1986. 8: p. 593-596.
82. Jiménez A, Santos MA, Pompejus M, Revuelta JL, **Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii***. *Appl Environ Microbiol*, 2005. 71(10): p. 5743-5751.
83. Mateos L, Jiménez A, Revuelta JL, Santos MA, **Purine biosynthesis, riboflavin production, and trophic-phase span are controlled by a myb-related transcription factor in the fungus *Ashbya gossypii***. *Appl Environ Microbiol*, 2006. 72(7): p. 5052-5060.
84. Monschau N, Sahm H, Stahmann KP, **Threonine aldolase overexpression plus threonine supplementation enhanced riboflavin production in *Ashbya gossypii***. *Appl Environ Microbiol*, 1998. 64(11): p. 4283-4290.
85. Förster C, Revuelta JL, Krämer R, **Carrier-mediated transport of riboflavin in *Ashbya gossypii***. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001. 55(1): p. 85-89.

86. Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H, **Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000. 53(5): p. 509-516.
87. Tajima S, Itoh Y, Sugimoto T, Kato T, Park EY, **Increased riboflavin production from activated bleaching earth by a mutant strain of *Ashbya gossypii*.** *J Biosci Bioeng*, 2009. 108(4): p. 325-329.
88. Edman JC, Goldstein AL, Erbe JG, **Para-aminobenzoate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a bifunctional enzyme.** *Yeast*, 1993. 9(6): p. 669-675.
89. Botet J, Mateos L, Revuelta JL, Santos MA, **A chemogenomic screening of sulfanilamide-hypersensitive *Saccharomyces cerevisiae* mutants uncovers *ABZ2*, the gene encoding a fungal aminodeoxychorismate lyase.** *Eukaryot Cell*, 2007. 6(11): p. 2102-2111.
90. Jiménez A, Santos MA, Revuelta JL, **Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase activity affects growth and riboflavin production in *Ashbya gossypii*.** *BMC Biotechnol*, 2008. 8(67): p. doi: 10.1186/1472-6750-8-67.
91. De Antoni A, Gallwitz D, **A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Gene*, 2000. 246(1-2): p. 179-185.
92. Richey DP, Brown GM, **The biosynthesis of folic acid. IX. Purification and properties of the enzymes required for the formation of dihydropteroic acid.** *J Biol Chem*, 1969. 244(6): p. 1582-1592.
93. Prabhu V, Lui H, King J, ***Arabidopsis* dihydropteroate synthase: general properties and inhibition by reaction product and sulfonamides.** *Phytochemistry*, 1997. 45(1): p. 23-27.
94. Rébeillé F, Macherel D, Mouillon JM, Garin J, Douce R, **Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria.** *EMBO J*, 1997. 16 (5): p. 947-957.
95. Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S, **Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes.** *PLoS ONE*, 2009. 4(5): e5553.
96. **Methods in Enzymology. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology**, ed. Guthrie C, Fink GR, Vol. 194. 1991.
97. Lowe KE, Osborne CB, Lin B, Kim J, Hsu J, Shane B, **Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. II. Effect of folylpoly- γ -glutamate synthetase substrate specificity and level on folate metabolism and folylpoly- γ -glutamate specificity of metabolic cycles of one-carbon metabolism.** *J Biol Chem*, 1993. 268(29): p. 21665-21673.
98. DeSouza L, Shen Y, Bognar AL, **Disruption of cytoplasmic and mitochondrial folylpolyglutamate synthase activity in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Arch Biochem Biophys*, 2000. 376(2): p. 299-312.
99. McGuire JJ, Bertino JR, **Enzymatic synthesis and function of folylpolyglutamates.** *Mol Cell Biol*, 1981. 38: p. 19-48.

100. Chotani GK, Dodge TC, Gaertner AL, Arbige MV, **Industrial biotechnology: discovery to delivery.** *Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, 2007. p. 1311-1374.
101. Hausmann C, Rohdich F, Schmidt E, Bacher A, Richter G, **Biosynthesis of Pteridines in *Escherichia coli*. Structural and mechanistic similarity of dihydroneopterin-triphosphate epimerase and dihydroneopterin aldolase.** *J Biol Chem*, 1998. 273(28): p. 17418-17424.
102. Güldener U, Koehler GJ, Hausmann C, Bacher A, Kricke J, Becher D, Hegemann JH, **Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Fol1 protein: starvation for C1 carrier induces pseudohyphal growth.** *Mol Biol Cell*, 2004. 15(8): p. 3811-3828.
103. Djapa LY, Zelikson R, Delahodde A, Bolotin-Fukuhara M, Mazabraud A, ***Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase as a target of sulpha drugs.** *FEMS Microbiol Lett*, 2006. 256(1): p. 105-111.
104. Neradil J, Pavlasova G, Veselska R, **New mechanisms for an old drug; DHFR- and non-DHFR-mediated effects of methotrexate in cancer cells.** *Klin Onkol*, 2012. 25: p. 87-92.
105. Witter K, Cahill DJ., Werner T, Ziegler I, Rödl W, Bacher A, Gütlich M, **Molecular cloning of a cDNA coding for GTP cyclohydrolase I from *Dictyostelium discoideum*.** *Biochem J*, 1996. 319: p. 27-32.
106. Hjortmo S, Patring J, Andlid T, **Growth rate and medium composition strongly affect folate content in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Int J Food Microbiol*, 2008. 123(1-2): p. 93-100.
107. Thien KR, Blair JA, Leeming RJ, Cooke WT, Melikian V, **Serum folates in man.** *J Clin Pathol*, 1977. 30(5): p. 438-448.
108. Hossain T, Rosenberg I, Selhub J, Kishore G, Beachy R, Schubert K, **Enhancement of folates in plants through metabolic engineering.** *PNAS*, 2004. 101(14): p. 5158-5163.
109. Mancini R, Saracino F, Buscemi G, Fischer M, Schramek N, Bracher A, Bacher A, Gütlich M, Carbone MLA, **Complementation of the *fol2* deletion in *Saccharomyces cerevisiae* by human and *Escherichia coli* genes encoding GTP cyclohydrolase I.** *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 255(2): p. 521-527.
110. Li A, Liu Z, Li Q, Yu L, Wang D, Deng X, **Construction and characterization of bidirectional expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Yeast Res*, 2008. 8(1): p. 6-9.
111. Scheich C, Kümmel D, Soumailakakis D, Heinemann U, Büssow K, **Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins.** *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(6): e43.
112. Chuang LT, Chen DC, Nicaud JM, Madzak C, Chen YH, Huang YS, **Co-expression of heterologous desaturase genes in *Yarrowia lipolytica*.** *N Biotechnol*, 2010. 27(4): p. 277-282.
113. Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH, **A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast.** *Nucleic Acids Res*, 1996. 24(13): p. 2519-2524.
114. Adhya S, Gottesman M, **Promoter Occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity.** *Cell*, 1982. 29(3): p. 939-944.

115. Proudfoot NJ, **Transcriptional interference and termination between duplicated alpha-globin gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation.** *Nature*, 1986. 322(6079): p. 562-565.
116. Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Roman I, Haegeman G, **Orientation-dependent gene expression with Epstein-Barr virus-derived vectors.** *FEBS Lett*, 2003. 555(3): p. 489-494.
117. Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CK, McIntosh EM, Reidy JA, **International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability.** *Mutat Res*, 1994. 318(1): p. 1-64.
118. Reichard P, **Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis.** *Ann Rev Biochem*, 1988. 57: p. 349-374.
119. Gazzola C, Ferraro P, Moras M, Reichard P, Bianchi V, **Cytosolic high K(m) 5'-nucleotidase and 5'(3')-deoxyribonucleotidase in substrate cycles involved in nucleotide metabolism.** *J Biol Chem*, 2001. 276: p. 6185-6190.
120. Sybesma W, Starrenburg M, Kleerebezem M, Mierau I, de Vos WM, Hugenholtz J, **Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*.** *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(6): p. 3069-3076.
121. Sybesma W, van den Born E, Starrenburg M, Mierau I, Kleerebezem M, de Vos WM, Hugenholtz J, **Controlled modulation of folate polyglutamyl tail length by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*.** *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(12): p. 7101-7107.
122. Whitfield CD, Steers EJ, Weissbach H, **Purification and properties of 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine transmethylase.** *J Biol Chem*, 1970. 245(2): p. 390-401.
123. Tzagoloff A, Shtanko A, **Mitochondrial and cytoplasmic isoleucyl-, glutamyl-, and arginyl-tRNA synthetases of yeast are encoded by separate genes.** *Eur J Biochem*, 1995. 230(2): p. 582-586.
124. Cherest H, Thomas D, Surdin-Kerjan Y, **Polyglutamylation of folate coenzymes is necessary for methionine biosynthesis and maintenance of intact mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem*, 2000. 275: p. 14056-14063.
125. Schlüpen C, Santos MA, Weber U, de Graaf A, Revuelta JL, Stahmann KP, **Disruption of the *SHM2* gene, encoding one of two serine hydroxymethyltransferase isoenzymes, reduces the flux from glycine to serine in *Ashbya gossypii*.** *Biochem J*, 2003. 369: p. 263-273.
126. Popescu L, Yona G, **Automation of gene assignments to metabolic pathways using high-throughput expression data.** *BMC Bioinformatics*, 2005. 6: p. 217.
127. Neuburger M, Rébeillé F, Jourdain A, Nakamura S, Douce R, **Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants.** *J Biol Chem*, 1996. 271(16): p. 9466-9472.

128. Schmitt HD, Zimmermann FK, **Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis.** *J Bacteriol*, 1982. 151(3): p. 1146-1152.
129. Mouillon JM, Ravanel S, Douce R, Rébeillé F, **Folate synthesis in higher-plant mitochondria: coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropterolate synthase activities.** *Biochem. J*, 2002. **363**: p. 313-319.
130. Fernley RT, Iliades P, Macreadie I, **A rapid assay for dihydropterolate synthase activity suitable for identification of inhibitors.** *Anal Biochem*, 2007. 360(2): p. 227-234.
131. Shane B, Bogner AL, Goldfarb RD, LeBowitz JH, **Regulation of folylpoly- γ -glutamate synthesis in bacteria: in vivo and in vitro synthesis of pteroylpoly- γ -glutamates by *Lactobacillus casei* and *Streptococcus faecalis*.** *J Bacteriol*, 1983. 153(1): p. 316-325.
132. De Brouwer V, Storozhenko S, Van De Steene JC, Wille SM, Stove CP, Van Der Straeten D, Lambert WE, **Optimisation and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for folates in rice.** *J Chromatogr A*, 2008. 1215(1-2): p. 125-132.
133. Herranen M, Kariluoto S, Edelmann M, Piironen V, Ahvenniemi K, Iivonen V, Salovaara H, Korhola M, **Isolation and characterization of folate-producing bacteria from oat bran and rye flakes.** *Int J Food Microbiol*, 2010. 142(3): p. 277-285.
134. Aswathy RG, Ismail B, John RP, Nampoothiri KM, **Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria.** *Appl Biochem Biotechnol*, 2008. 151(2-3): p. 244-255.
135. Santos F, Wegkamp A, de Vos WM, Smid EJ, Hugenholtz J, **High-level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112.** *Appl Environ Microbiol*, 2008. 74(10): p. 3291-3294.
136. Hjortmo SB, Hellström AM, Andlid TA, **Production of folates by yeasts in Tanzanian fermented togwa.** *FEMS Yeast Res*, 2007. 8(5): p. 781-787.
137. Hjortmo S, Patring J, Jastrebova J, Andlid T, **Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process.** *Int J Food Microbiol*, 2008. 127(1-2): p. 32-36.
138. Shohag MJ, Wei YY, Yu N, Zhang J, Wang K, Patring J, He Z, Yang X, **Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea*) germplasm.** *J Agric Food Chem*, 2011. 59(23): p. 12520-12526.
139. Sybesma W, Starrenburg M, Tijsseling L, Hoefnagel MHN, Hugenholtz J, **Effects of cultivation on folate production by lactic acid bacteria.** *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(8): p. 4542-4548.
140. Kleerebezem M, Boels IC, Groot MN, Mierau I, Sybesma W, Hugenholtz J, **Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling.** *J Biotechnol*, 2002. 98(2-3): p. 199-213.
141. Zhu T, Pan Z, Domagalski N, Koepsel R, Ataai MM, Domach MM, **Engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced total synthesis of folic acid.** *Appl Environ Microbiol*, 2005. 71(11): p. 7122-7129.

142. Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, Navarrete O, Blancquaert D, Zhang GF, Lambert W, Van Der Straeten D, **Folate fortification of rice by metabolic engineering.** *Nat Biotechnol*, 2007. 25(11): p. 1277-1279.
143. Díaz de la Garza RI, Gregory JF 3rd, Hanson AD, **Folate biofortification of tomato fruit.** *PNAS*, 2007. 104(10): p. 4218-4222.
144. Collins MD, Phillips BA, Zanoni P, **Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov.** *Int J Syst Bacteriol*, 1989. 39: p. 105-108.
145. Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P, **New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*, 1994. 10(13): p. 1793-1808.
146. Zalacain M, González A, Guerrero MC, Mattaliano RJ, Malpartida F, Jiménez A, **Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*.** *Nucleic Acids Res*, 1986. 14(4): p. 1565-1581.
147. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S, **A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability.** *PLoS ONE*, 2008. 3(11): p. e3647.
148. Engler C, Gruetzner, Kandzia R, Marillonnet S, **Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes.** *PLoS ONE*, 2009. 4(5): e5553.
149. Livak KJ, Schmittgen TD, **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method.** *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-408.
150. Lee C, K.J., Shin SG, Hwang S, **Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*.** *J Biotechnol*, 2006. 123(3): p. 273-280.
151. Blakley RL, **The biochemistry of folic acid and related pteridines.** *North-Holland Publishing Co.*, Amsterdam, 1969.

