



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.**

Síntesis de levana de bajo peso molecular utilizando una levansacarasa de *B. subtilis* aislado del *natto*.

Tesis.

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA.

Mario Raziel Romay Ramírez.

Dr. Agustín López-Munguía Canales  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

Dr. José Adelfo Escalante Lozada.  
[Instituto de Biotecnología UNAM.](#)

Dra. Rosa Maria Gutiérrez Rios.  
[Instituto de Biotecnología UNAM.](#)

Cuernavaca, Morelos. Septiembre 2023.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Agustín Lopez-Munguía Canales.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca de maestría con número 1034128 y por el apoyo económico otorgado por la DGAPA-UNAM proyecto PAPIIT IN210523.

**Dedicatoria.**

A la persona que hizo posible este proyecto, por ser mi apoyo, compañero y confidente. Pequeños pasos te llevan lejos. Gracias C.H.

## **Agradecimientos.**

Al *Dr. Agustín López-Munguía Canales*, a quien admiro no solamente por ser una mente brillante sino también una persona muy humana y cálida, gracias por su paciencia y enseñanzas tanto académicas como para la vida.

A los miembros del comité el *Dr. José Adelfo Escalante Lozada* y la *Dra. Rosa María Gutiérrez Rios* por sus valiosas aportaciones a este proyecto, sus decisiones y su valiosa experiencia en el tema.

A mis sínodos, por el tiempo y la atención minuciosa prestada a la revisión de este trabajo, sus contribuciones fueron invaluable; *Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. Ricardo Oropeza Navarro, Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, Dra. Amelia Farrés Gonzáles Sarabia* y *Dra. Romina Rodríguez Sanoja*.

A *Fernando Gonzales Muñoz* por su disposición y enseñanza en los aspectos técnicos de este proyecto.

A *M. en C. María Elena Rodríguez Alegría*, quien fue parte esencial, gracias por sus conocimientos, disposición y valiosas aportaciones a este proyecto.

A *M. en C. Fernando Astudillo Melgar*, con quien estoy profundamente agradecido, por sus conocimientos en biología molecular y a quien considero un gran ser humano.

A *Ing. Leticia Olvera Rodríguez* por su extensa experiencia en clonación, aplicada en el aislamiento y secuenciación del gen de la levansacarasa de *B. natto* Az.

A las laboratoristas *Aurelia Ocampo Vargas* y *Judith Uribe Soriano*, gracias por su apoyo con el material de laboratorio y soluciones.

A los miembros del grupo ALM con quien tuve vivencias que jamás olvidaré, Sol Castrejón, Karina Rangel, Pedro Sid y Silvia Perez.

## Índice.

<b>1. Resumen.</b>	<b>10</b>
<b>2. Introducción.</b>	<b>11</b>
<b>3. Antecedentes.</b>	<b>17</b>
3.1 Cultivos para producir levana utilizando <i>B. subtilis natto</i> .	17
3.2 Levansacarasa (SacB) de <i>B. subtilis 168</i> .	20
3.3 Particularidades de los cultivos de <i>B. subtilis natto</i> .	21
3.4 <i>B. subtilis</i> , formación de colonia, reguladores maestros y regulación transcripcional.	22
<b>4. Justificación.</b>	<b>26</b>
<b>5. Hipótesis.</b>	<b>27</b>
<b>6. Objetivo.</b>	<b>28</b>
<b>7. Objetivos particulares.</b>	<b>29</b>
<b>8. Estrategia experimental.</b>	<b>30</b>
<b>9. Metodología y materiales.</b>	<b>31</b>
9.1 Aislamiento de cepas y perfiles de producción de levanas.	31
9.2 Técnicas de biología molecular para la identificación de las cepas aisladas y selección de cepa.	34
9.3 Estandarización del cultivo para la producción de la levansacarasa y posteriormente de levanas.	36
<b>10. Resultados y Discusión.</b>	<b>40</b>
10.1 Obtención y características de nattos comerciales.	40
10.2 Aislamiento de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> del natto.	41
10.3 Levanas sintetizadas en el Natto comercial.	43
10.4 Producción y caracterización parcial de las levansacarosas en el sobrenadante de las cepas aisladas de natto comercial.	45
10.5 Levanas sintetizadas por la LS del sobrenadante de cultivos de cepas de <i>B. subtilis</i> aislados del natto.	47

10.6 Caracterización molecular de las cepas aisladas de natts comerciales.....	50
10.7 Aislamiento y análisis de la secuencia que codifica para la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> Az. .....	54
10.8 Análisis y estandarización del cultivo de <i>B. subtilis</i> natto para la producción sistemática de la levansacarasa. ....	55
10.9 Purificación e identificación de la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> natto.....	62
10.10 Síntesis de levana a partir del sobrenadante del cultivo. ....	65
<b>11 Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>12. Perspectivas. ....</b>	<b>70</b>
<b>13. Anexos.....</b>	<b>71</b>
<b>14. Bibliografía.....</b>	<b>77</b>

## Índice de figuras.

Figura 1. Morfología de una colonia de <i>B. subtilis</i> se muestran diferentes estadios celulares.....	<b>23</b>
Figura 2. Diferenciación celular de <i>B. subtilis</i> , reguladores maestros y señalizadores transcripcionales.....	<b>25</b>
Figura 3. Condiciones para el ensayo PCR del gen ribosomal 16s .....	<b>35</b>
Figura 4. Nattos comerciales recolectados para el aislamiento de <i>B. subtilis natto</i> . .....	<b>40</b>
Figura 5. Colonias seleccionadas de 5 productos comerciales de natto.....	<b>43</b>
Figura 6. Análisis por HPLC (GPC) de los polímeros presentes en el natto comercial, obtenidos mediante extracción acuosa del producto fermentado. ....	<b>44</b>
Figura 7. Perfil de peso molecular de los polímeros presentes en el natto Ok analizados por HPLC GPP. ....	<b>45</b>
Figura 8. Análisis por TLC en placas de Silica Gel de los productos de síntesis de polisacáridos con los sobrenadantes de los cultivos de las cepas aisladas de nattos comerciales. ....	<b>47</b>
Figura 9. Análisis de los productos de síntesis por HPLC (GPC) de los polisacáridos sintetizados por las enzimas presentes en los sobrenadantes del cultivo de cada cepa aislada de nattos comerciales.....	<b>49</b>
Figura 10. Gel de agarosa que muestra el ADN genómico extraído de las cepas aisladas de nattos comerciales.....	<b>50</b>
Figura 11. Amplicón del gen ribosomal 16s en un gel de agarosa al 1%, obtenido del ADN extraído de cada cepa aislada del natto.....	<b>51</b>
Figura 12. Patrón de digestión del gen ribosomal amplificado (ARDRA por sus siglas en ingles) observado en geles de agarosa al 2.5%.....	<b>52</b>
Figura 13. Gel de agarosa al 1% con el gen amplificado de la levansacarasa de la cepa Az de <i>B subtilis</i> .....	<b>54</b>
Figura 14. PDB de Estructura de SacB de <i>B. subtilis 168</i> visualizada en pymol.....	<b>55</b>
Figura 15. Imagen de un cultivo al microscopio de <i>B. subtilis</i> cepa Az a una DO de 5.3 ....	<b>56</b>
Figura 16. Cinética de un cultivo con la cepa AZ partiendo de un preinóculo sembrado con esporas.....	<b>57</b>
Figura 17. Evolución de los carbohidratos durante un cultivo con la cepa Az. ....	<b>57</b>
Figura 18. Evolución morfológica de los bacilos durante un cultivo de <i>B. subtilis</i> Az.....	<b>59</b>
Figura 19. Evolución de la síntesis de la levansacarasa en el sobrenadante del cultivo de la cepa <i>B. subtilis</i> Az en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15%. ....	<b>60</b>



Figura 20. Evolución de los polímeros producidos durante el cultivo de <i>B. subtilis</i> cepa Az analizados por GPC.....	<b>61</b>
Figura 21. Se muestra un gel SDS-page al 10% con las fracciones recolectadas que tuvieron actividad DNS (metodo con 3,5 ácido dinitrosalicílico) pertenecientes a la purificación de la levansacarasa de la cepa <i>B. subtilis</i> Az obtenida del sobrenadante del cultivo.....	<b>63</b>
Figura 22. Zimograma de la levansacarasa purificada de la cepa <i>B. subtilis</i> Az .....	<b>63</b>
Figura 23. Cromatograma de una reacción con la levansacarasa de la cepa Az purificada con 0.7U/mL mostrando un comportamiento bimodal. ....	<b>64</b>
Figura 24. Síntesis de levanas a diferentes concentraciones de sacarosa utilizando la enzima levansacarasa de <i>B. subtilis</i> Az directamente del sobrenadante como medio de reacción.....	<b>66</b>
Figura 25. Cromatograma de GPC-HPLC que muestra el perfil de peso molecular de levanas sintetizadas a diferentes concentraciones de sacarosa a 37°C y 350rpm con enzima producida directamente en el medio de cultivo.....	<b>67</b>
Figura 26. Alineamiento de aminoácidos de las levansacarosas pertenecientes a las cepas 168 y Az de <i>B. subtilis</i> .....	<b>74</b>
Figura 27. Relación de la actividad levansacarasa en el sobrenadante en función de la concentración de sacarosa en el cultivo .....	<b>75</b>
Figura 28. Cromatogramas en GPC que muestran la evolución de la síntesis de levana empleando la enzima levansacarasa en el sobrenadante del cultivo de <i>B. subtilis</i> cepa Az.....	<b>76</b>

Índice de tablas.

<b>Tabla 1. Medio LM. (El pH se ajusta a 7 con HCl) .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 2. Procedimiento para el análisis del tipo ARDRA.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 3. Origen de las muestras de natto empleadas en el proyecto, contenido neto y clave asignada a cada producto, así como a la cepa de B. subtilis aislada de cada uno de ellos.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 4. Características del sobrenadante de los cultivos de cinco cepas aisladas de natts comerciales .....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 5. Características de calidad del ADN genómico extraído de las cepas aisladas de natts comerciales .....</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 6. Características del ADN del gen ribosomal 16s de las cepas aisladas del natto.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabla 7. Similitud de las diversas cepas aisladas del natto comercial de B. subtilis al ser analizarlas mediante un alineamiento tipo BLAST. ....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 8. Efecto de la concentración de sacarosa en la actividad enzimática del sobrenadante para cultivos de la cepa Ok de B. subtilis natto a las 6h.....</b>	<b>75</b>

# 1 Resumen.

El presente trabajo se desarrolló con cepas aisladas de natto adquirido comercialmente, dichas cepas, pertenecientes a la especie *B. subtilis* fueron identificadas mediante análisis de secuenciación del gen 16s. Así mismo, se produjeron 5 levansacarosas, una de cada cepa aislada y se sintetizó levana directamente en el sobrenadante del cultivo sin células, observándose el mismo perfil de productos con todas las enzimas. Con base en criterios de manejo de la cepa, reproducibilidad de los datos de producción y actividad en el sobrenadante, se seleccionó la cepa Az para estudios de producción de la levansacarasa y síntesis de levana. Se logró aislar el gen que codifica para la levansacarasa de la cepa Az y se encontró que dicha secuencia, solo difiere en el aminoácido 70 con respecto a la levansacarasa SacB proveniente de la cepa *B. subtilis* 168. No existen hasta ahora reportes sobre el efecto que tal variante tendría en la función de la enzima. Con la enzima purificada de la cepa Az y en buffer 50 mM de acetatos, se estudió y comparó la capacidad de síntesis de levana de diferentes pesos moleculares; con respecto a la enzima de la cepa 168 expresada heterológamente, encontrando el mismo comportamiento en ambos casos. En efecto, ambas enzimas sintetizan levana con dos distribuciones de peso molecular. Finalmente se diseñó una estrategia para producir levana de bajo peso molecular (Mw promedio de 8.3 kDa) con la enzima en el sobrenadante del cultivo, logrando una eficiencia en la reacción del 90 % cuando se usa 200 g/L de sacarosa y 65 % cuando se incrementa a 500 g/L, mostrando mayor relación de transferencia/hidrólisis (95/05) a mayor cantidad de sustrato inicial, tal como sucede con la enzima *SacB* de la cepa 168. Con esta enzima silvestre no recombinante, es posible producir levana con fines prebióticos.

## 2 Introducción.

El *natto* es un alimento fermentado tradicional de algunas regiones de oriente, particularmente de Japón, donde está integrado a su rica cultura gastronómica. Cuenta la tradición que su origen se remonta a una batalla de clanes al noroeste de Japón alrededor de 1086; un soldado japonés transportaba granos de soya, los cuales espontáneamente fermentaron (Milner & Makise, n.d.). Actualmente, el *natto* es altamente consumido en Japón, se estima que un japonés promedio consume 41 paquetes de *natto* al año, en 2016 el valor de consumo de este producto fue de 214,000 millones de yenes al año, exportándose cerca de 750 toneladas. La cultura en torno al *natto* se desarrolla paralelamente a la historia de Japón, pues fue un alimento altamente consumido durante los períodos de guerra, debido a que es fácil de conservar. Artesanalmente se produce en algunas granjas al mezclar el grano de soya con la paja del arroz permitiendo su fermentación. Este alimento es indispensable en la gastronomía nipona por lo que se puede adquirir en tiendas de autoservicio, e incluso, forma parte del desayuno escolar en escuelas primarias. (Kimura et al., 2011)

Actualmente, el *natto* se produce a gran escala. El proceso de producción industrial inicia al preparar el grano de soya lavándolo para posteriormente, dejarlo remojar por 20 h a 15°C. En seguida se esteriliza con vapor a 132°C alcanzando 1.98 atm de presión por 30 min con el propósito de cocerlo, gelatinizar los almidones y suavizarlo para facilitar la fermentación; posteriormente, se inocula por aerosol de manera homogénea con esporas de alguna cepa seleccionada de *Bacillus subtilis natto*, y se deja fermentar hasta que se alcanza un producto viscoso. Los puntos críticos para obtener un *natto* de calidad son: a) la calidad de la soya, b) el tiempo de fermentación y c) la temperatura. Al producto terminado se le pueden agregar diferentes aditivos específicos de cada región y puede consumirse: agregándolo al arroz, sushi, sopa, ensaladas e incluso a algunas bebidas (Steinkraus. 2004).

Como se señaló, la fermentación de la soya para dar lugar al *natto* es llevada a cabo por *Bacillus subtilis natto*, bacteria Gram positiva aerobia que forma esporas, cuyas células y metabolitos contribuyen al valor nutricional. Las enzimas proteolíticas de *B. subtilis* realizan la hidrólisis de la proteína haciéndola más digerible y generando péptidos bioactivos; en el humano, la nattokinasa (enzima que pertenece a las serin-endoproteasas alcalinas) al ser ingerida promueve una buena circulación al tener efecto anticoagulante (cataliza las fibrinas de la sangre); *B. subtilis* además proporciona vitamina K lo que contribuye a la riqueza nutricional de la soya, ya que promueve la salud cardiovascular al interactuar con proteínas del torrente sanguíneo (un tazón de natto tiene 40.4 mg de vitamina K). Contiene también  $\text{Ca}^{+2}$  (liberado de la soya), responsable de la densidad adecuada en los huesos y la prevención de osteoporosis (100 g de natto contiene 217 mg de  $\text{Ca}^{+2}$ ). Así mismo, el consumo de *B. subtilis natto* estimula el sistema inmune, al aumentar los porcentajes de células CD4. (Afzaal et al., 2022)

A nivel de textura, este alimento fermentado se caracteriza por ser viscoso, pegajoso, suave, húmedo y estar cubierto de una sustancia blanquecina. El sabor del fermentado es peculiar; se caracteriza por su contenido de amoníaco, lo que no es del agrado de un consumidor ajeno a la cultura japonesa. Sin embargo, por su alto contenido nutricional es un alimento altamente valorado en el mundo. La apariencia viscosa del *natto*, proviene de dos polímeros principalmente: el primero, el ácido poliglútamico (PGA), un polímero compuesto por ácido glutámico y representa el 60 % del polímero total; dicho compuesto es utilizado en la industria farmacéutica y cosmética ya que, se añade a diversos productos porque ayuda en la hidratación de la piel. (Wei et al., 2001). El segundo polímero, que constituye el 40 % del polímero total del *natto*, es la levana, un polímero de fructosa que ha sido estudiado ampliamente por diversos grupos de investigación, incluido el nuestro. La levana es un homopolisacárido constituido por moléculas de fructosa unidas mediante enlaces  $\beta$  (2-6) cuya síntesis se lleva a cabo por la enzima levansacarasa (EC 2.4.1.10), iniciándose a partir de una molécula de sacarosa que actúa también como sustrato donador de grupos fructosilo. La enzima, y por ende la levana es producida principalmente por bacterias como: *Actinomyces*,

*Bacillus*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* y *Lactobacillus*, entre otras, funcionando como exopolisacárido en la matriz de las biopelículas, y en algunas bacterias asociado a su virulencia ya que, forma parte esencial del proceso de colonización bacteriana. También se sintetiza en algunas plantas como polímero no estructural, pero a diferencia de las bacterias, las plantas requieren de un complejo enzimático para sintetizar levana.

Las levansacarinas, enzimas del tipo fructosil transferasa, pertenecen a la Familia GH 68 (glicosil-hidrolasas que catalizan hidrólisis en 2 reacciones), son proteínas extracelulares, pero también se pueden encontrar embebidas en la matriz extracelular. Estructuralmente están formadas por 5 hojas  $\beta$  propela que enrollan el sitio activo, constituido por la triada catalítica; dos ácidos aspárticos y un ácido glutámico. Al sintetizar el polímero mediante la adición de grupos fructosilo provenientes de la sacarosa, pueden elongar la cadena de manera continua, lo que se traduce en la síntesis de levana de alto o bajo peso molecular, lo que es función de diversos parámetros que van desde el origen (especificidad) de la enzima misma, hasta las condiciones de síntesis, como es la temperatura, el pH, la concentración de enzima y la de sustrato, principalmente (Ortiz-Soto et al., 2019).

Las características fisicoquímicas y nutrimentales de la levana dependen del grado de polimerización (PD), que puede alcanzar hasta 141,000 kDa, es decir >50,000 unidades de fructosa por cadena, lo que repercute directamente en sus propiedades y por ende en su aplicación. Los polímeros de levana son usados como emulsificantes en la industria cosmética y del cuidado personal, como fibra soluble o endulzante en la industria alimentaria, para formar biopelículas debido a su viscosidad, en la elaboración de detergentes al ser altamente soluble en agua y funcionar como surfactante, en la industria del cemento por su alta termoestabilidad (degradación térmica a 225 °C) puede ser utilizado como adhesivo o agente protector de superficies, e incluso en la industria farmacéutica como nano-transmisor debido a que tiene propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes (Öner et al., 2016)

En la actualidad existe gran interés dentro de la industria alimenticia por la síntesis de fructooligosacáridos (levan FOS) constituidos por entre 5 y 9 residuos de fructosa (bajo grado de polimerización), destacando la 6-nistosa (GF3), 6-kestosa (GF4), la 6-neokestosa (FGF3) la bifurcosa (GF4), entre otros. El principal atractivo y potencial de los FOS deriva del hecho de que funcionalmente actúan como prebióticos, los cuales son valorados como alimentos funcionales. La levana es fibra no digerible por el ser humano, capaz de llegar al colon y en forma de FOS es capaz de estimular el crecimiento de la microbiota benéfica (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) (Oku & Nakamura, 2017), lo que se traduce en numerosos beneficios a la salud como: mejorar la digestión y la absorción de nutrientes (además de tener bajo contenido calórico), reducir los niveles plasmáticos de lípidos y colesterol, y poseer actividad anticancerígena (Xu et al., 2006). La mayor ventaja de consumir los FOS, deriva de poder ser directamente asimilados por la microbiota benéfica intestinal, además de poder ser usados para endulzar productos, lo que resulta atractivo para consumidores diabéticos. La producción bacteriana de levana y/o de levan FOS presenta limitantes de diversa índole (no aprovechar eficientemente el sustrato, variación del tamaño de polímeros obtenidos, entre otros), por lo que a pesar de su potencial, la producción a gran escala aún enfrenta problemas para lograr una producción eficiente y viable (Bersaneti et al., 2018). Por lo anterior las levanas no existen en el mercado de los alimentos funcionales.

En contraste, la inulina vegetal, un polímero de fructosa análogo a la levana obtenido de achicoria o del agave, y los inulo FOS, sintetizados enzimáticamente a partir de sacarosa por enzimas del tipo inulosacarasas de origen fungal, son abundantes en el mercado de los nutraceuticos. La inulina, a diferencia de la levana, tiene a las fructosas unidas mediante enlaces  $\beta$  (2-1), y es producida principalmente por plantas, aunque existe igualmente diversidad de enzimas microbianas (inulosacarasas o fructosil transferasas) con capacidad de sintetizar dicho polímero eficientemente. La inulina de plantas, que como ya se señaló, requiere de un sistema complejo de enzimas para su síntesis, se obtiene mediante extracción acuosa de las raíces de la achicoria. Por otro lado, el principal proceso

de producción de inulin-FOS es a través de la hidrólisis de la inulina mediante enzimas del tipo endo-inulinasa, hasta alcanzar un grado de polimerización adecuado para su función prebiótica; o bien, a través de su separación de la inulina por tamaños mediante ultrafiltración. En México se comercializa además la inulina del agave, que de hecho está presente en el aguamiel y el pulque. Finalmente, los inulo-FOS se pueden obtener directamente a partir de sacarosa, empleando una enzima del tipo fructosil transferasa de *Aspergillus niger* que es capaz de sintetizar cadenas de 4-5 unidades de fructosa (Turner et al., 2013).

La situación actual del conocimiento en materia de diversidad microbiana del intestino hace pensar que, deben diversificarse las fuentes de fibra y de probióticos, por lo que un proceso eficiente y seguro de síntesis de levan-FOS puede resultar atractivo, en términos no solo económicos (rendimiento, productividad y costo), sino también de impacto en la salud. Además del *natto*, diversos alimentos fermentados contienen levana, particularmente algunos asociados a la dieta rural en México, como el pulque, el pozol, el aguamiel, entre otros; particularmente se ha estudiado el agave que contiene una cantidad importante de fructanas de donde se obtienen bebidas importantes; como el tequila, el aguamiel y el pulque (Ávila-Fernández et al., 2007). Particularmente el pulque contiene una cantidad importante de microorganismos involucrados en su fermentación, donde estudios realizados han demostrado la presencia de fructanas (levanas o inulinas) en su composición (Escalante et al., 2008). Esto hace pensar que se trata de un polímero que no es ajeno a nuestra dieta, y aunque el consumo actual sea limitado, se trata de productos con propiedades sumamente atractivas, como para integrarlas a la dieta con el propósito de mejorar la salud del consumidor.

*B. subtilis* es un modelo interesante para producir levana, ya que se trata de una bacteria terrestre que puede encontrarse en el suelo y en las raíces de las plantas (formando una relación simbiótica, donde es capaz de sintetizar levana haciéndola parte de su biopelícula) e incluso en el tracto intestinal de algunos animales donde funciona como probiótico. Así mismo, *B. subtilis* es capaz de



crecer en diversos entornos, debido a la flexibilidad que le confiere la complejidad de su genoma, ya que es capaz de contender a varias condiciones de estrés debido a las respuestas metabólicas que ha desarrollado. Un ejemplo de esto son las endoesporas capaces de sobrevivir a situaciones adversas y germinar, cuando las condiciones propicias lo permiten, por lo que no es de extrañar tanto la compleja morfología de sus colonias crecidas en placa, como la estricta regulación genómica a la que está sujeta (Bottaro, 2008).

### 3 Antecedentes.

En el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, dentro del grupo de Investigación del Dr. Agustín López-Munguía Canales, se han estudiado diversos bioprocesos con el fin de obtener un alto rendimiento en la producción de leván FOS. En particular, destaca un proceso muy eficiente basado en una enzima bifuncional con amplias posibilidades de aplicación industrial. Sin embargo, las enzimas producidas empleando microorganismos genéticamente modificados, enfrentan diversos problemas de aceptación por parte de la opinión pública, además de estar sujetas a una estricta regulación, lo que dificulta su comercialización y/o la de sus productos. Tal es el caso de los procesos de síntesis de levana o FOS desarrollados hasta la fecha en el IBt, a pesar de las ventajas en cuanto a rendimiento-producción (Ávila-Fernández et al., 2023), disponibilidad de patentes y al efecto benéfico demostrado de los leván-FOS producidos en la microbiota intestinal (Porrás-Domínguez et al., 2017). Aunque existen numerosos ejemplos de enzimas recombinantes usadas en la industria alimentaria, un amplio sector de la sociedad exige el uso de microorganismos que la FDA clasifica como *GRAS*, es decir, Generalmente Reconocidos como Seguros. Por lo anterior, se ha propuesto trabajar directamente con una cepa de *B. subtilis natto*, microorganismo considerado como *GRAS*, aislado directamente del *natto*, aprovechando todo el conocimiento generado en el grupo, con el fin de analizar y dirigir la síntesis hacia una eficiente producción de levana y/o leván-FOS, estudiando a la par un sistema de cultivo adecuado de *B. subtilis* para la producción de la enzima.

#### 3.1 Cultivos para producir levana utilizando *B. subtilis natto*.

En diversos trabajos publicados se ha reportado ya la producción de levana a partir de cepas aisladas del *natto*. Es el caso particular de *B. subtilis natto takahashi*, que se demostró puede producir levana de alto y bajo peso molecular, siendo un factor importante para el peso molecular la concentración de sacarosa

en el medio de cultivo, obteniendo una concentración de levana de 49 g/L a partir de 200 g/L de sacarosa (Shih et al., 2005). Este grupo intentó también inmovilizar las células completas de la misma cepa en alginato para aplicarlas en un cultivo lote, observando que, a una alta concentración de sacarosa, se obtiene una distribución bimodal de levana de alto y bajo peso molecular, tal como sucede cuando se emplea la levansacarasa (SacB) de *B. subtilis* 168 expresada recombinantemente en *E. coli* después de purificarla y utilizando condiciones estándar de reacción (100 g/L de sacarosa, 1 U/ml, pH 6 y 37°C en 24 h). Los autores reportan que la presencia de determinados iones ( $Ba^{+2}$   $Ca^{+2}$   $Mg^{+2}$ ) en el medio de reacción no afecta el peso molecular de levana, pero si la cantidad que se produce de ésta. Por otro lado, el pH (que debe ser cercano a la neutralidad para un proceso eficiente) y la disponibilidad de nitrógeno en el medio (extracto de carne 3 g/L y peptona 5 g/L) son determinantes para producir levana de alto peso molecular. Al inmovilizar las células se reporta una producción de hasta 86.3 g/L de levana a partir de 200 g/L de sacarosa en 72 h. Las células inmovilizadas se pudieron usar hasta por 5 ciclos, sin perder actividad catalítica resultando favorables para la alta productividad del proceso (Shih et al., 2010).

Por otro lado, en la literatura se reportan las características de la cepa *B. subtilis natto* CCT77, crecida por 24h a 37°C para producir la levansacarasa. Al usar el sobrenadante como fuente de la enzima se logra producir 69.7 g/L de nistosa, y 44.2 g/L de levana (observándose una síntesis bimodal) usando 350 g/L de sacarosa a 35°C durante 36h en reacciones llevadas a cabo en tubo de ensayo. No obstante, al hacer la reacción en biorreactor con agitación utilizando el sobrenadante, el producto principal fue levana de alto peso molecular y FOS, pero en una menor concentración (Bersaneti et al., 2018). En otro estudio enfocado a la producción de FOS directamente en un cultivo de *B. subtilis*, se lograron producir 154.8 g/L de nistosa en 28h (condiciones de Erlenmeyer en 2L con pH 7.7) a partir de 400 g/L de sacarosa. Con respecto a la aireación, 0.2 vvm (volumen de aire/volumen de medio por minuto) resultaron mejores para producir levansacarasa y FOS en comparación con 1.0 vvm, que dio lugar a levana de mayor peso molecular con una menor concentración de levansacarasa. Cuando

no se controla el pH aireando el medio a razón de 0.2 vvm, se obtuvo la mayor cantidad de FOS (173.60 g/L a partir de 400 g/L de sacarosa en 42 h, equivalente a 0.07 g/L\*min); mientras que, al controlar el pH se obtuvo una menor productividad. Se especula que un pH cercano al neutro promueve la actividad transferasa de la levansacarasa (Magri et al., 2019).

Otro ejemplo de este tipo de procesos es el trabajo reportado por el grupo de Dos Santos en la Universidad Estatal de Londrina de Brasil, quienes reportan un análisis de variables con el fin de producir levana con una cepa de *B. subtilis natto* aislada de un *natto* comercial. En este caso se demuestra que a mayor concentración de sacarosa inicial se produce mayor cantidad de levana durante la fermentación, también observan un comportamiento bimodal predominando la levana de bajo peso molecular y FOS. Finalmente, partiendo de 400 g/L de sacarosa y después de 16 h de fermentación, este grupo reporta un total de 112 g/L de levana (Dos Santos et al., 2013). Otro ejemplo es con la cepa *takahashi* donde Wu et al. en 2013 produjeron levana en un biorreactor lote a un pH de 6, observando de nuevo el comportamiento bimodal en la levana sintetizada pero esta vez en función de la agitación: a una agitación baja predominaba la levana de bajo peso molecular; mientras que, a una agitación alta la levana de alto peso molecular, se lograron producir 61.5 g/L de levana partiendo de 250 g/L de sacarosa. Así mismo, la cantidad de sacarosa inicial en el cultivo fue clave para desplazar el tamaño del peso molecular de la levana, ya que utilizando 20 g/L de sacarosa solo se observó levana de alto peso molecular; por otro lado, al usar 400 g/L solo se observó levana de bajo peso molecular (Wu et al., 2013).

Sabemos, como resultado de trabajo del grupo (Ortiz-Soto et al., 2019), que el peso molecular de la levana depende de diversos factores y, como se puede inferir en los estudios mencionados anteriormente, si bien los bioprocesos propuestos hasta ahora no han sido factibles debido a que no se aprovecha el sistema totalmente, se ha generado amplia información sobre el tipo de levana que se produce cuando se realiza su síntesis, ya sea paralelamente al proceso fermentativo o por acción enzimática a partir del mismo. Por lo general, los autores

que reportan los estudios de producción de la levana en cultivo de *B. subtilis*, analizan el proceso en función de las condiciones de cultivo, siendo éste simultáneo al crecimiento de *B. subtilis*, dejando de lado las condiciones de actividad de la enzima.

### **3.2 Levansacarasa (SacB) de *B. subtilis* 168.**

*Bacillus subtilis* 168, la cepa estudiada en nuestro grupo produce una levansacarasa denominada SacB, que como toda levansacarasa presenta dos especificidades frente a la sacarosa: la hidrólisis en glucosa y fructosa y la transferencia del grupo fructosilo a un aceptor. Para iniciar la síntesis de levana, el aceptor inicial es una molécula de sacarosa que es fructosilada. Se ha estudiado con sumo detalle el efecto que diversos parámetros tienen sobre el peso molecular de la levana, parámetros tales como la temperatura, la fuerza iónica y los solventes orgánicos, así como la concentración de la enzima y de sustrato. En particular, altas concentraciones de enzima (10 U/mL) dan lugar a la distribución de levanas de bajo peso molecular (7.2 kDa) mientras que bajas concentraciones (1 U/mL) resultan en la síntesis de levana de alto peso molecular (2300 kDa) (Porrás-Domínguez et al., 2015). Dado el enorme impacto que tiene no solo el origen de la enzima al ser un solo dominio por provenir de una bacteria, sino las condiciones de reacción durante la síntesis sobre el peso molecular de la levana, resulta sorprendente el gran número de reportes en los que se ignoran las propiedades intrínsecas de la enzima y se relaciona; el peso molecular de la levana con las condiciones de cultivo del microorganismo productor de la enzima y las condiciones de fermentación.

Es evidente que los parámetros de fermentación reportados se modifican con la dinámica de crecimiento del microorganismo, por lo que, en este trabajo, se plantea el estudio de la enzima de *Bacillus subtilis natto* y la síntesis de levana o levan FOS por la enzima silvestre, pero al margen del cultivo. De esta forma se pretende evitar, o al menos tener en cuenta la intervención de los diferentes

factores del cultivo, tales como la cambiante concentración de enzima o la influencia de los componentes del medio en la síntesis de levana, con el fin de aplicar el conocimiento que existe sobre el comportamiento de la levansacarasa de *B. subtilis natto*. En una primera exploración realizamos un alineamiento en la base de datos NCBI con *Bacillus subtilis natto* CGMCC 2108 demostrando que, las secuencias de la levansacarasa de dicho microorganismo y la proveniente de *B. subtilis 168* (SacB) difieren únicamente en un aminoácido. Lo anterior, aunado a los antecedentes descritos, nos hace pensar que es posible definir condiciones de síntesis basados en SacB para sintetizar levana de bajo peso molecular, con una enzima proveniente de cepas presentes en el *natto*. Lo que permitiría desarrollar un bioproceso con microorganismos totalmente GRAS, así como conocer las diferencias entre SacB de la cepa *168* y la proveniente de la cepa *natto*.

### **3.3 Particularidades de los cultivos de *B. subtilis natto*.**

Los bioprocesos utilizando como microorganismo *B. subtilis* tienen peculiaridades que deben analizarse cuidadosamente para un aprovechamiento óptimo de este sistema. En la introducción se mencionó que *B. subtilis natto* es una bacteria Gram positiva que esporula y que, libera proteasas al medio siendo ésta, una parte esencial dentro de las características intrínsecas de su metabolismo; entre estas proteasas se encuentra *la subtilisina* que es la proteasa más importante de este microorganismo (Villarreal-Delgado et al., 2018), producida a nivel comercial.

El ciclo de vida de *B. subtilis* se inicia por las endoesporas que al encontrar un ambiente propicio germinan, dando lugar a células vegetativas. Cuando la densidad celular es adecuada, se inicia la diferenciación celular, con la consecuente aparición de las células madre, que son células maduras que podrán eventualmente generar endoesporas al completar su ciclo de vida y lisarse. El proceso de esporulación se lleva a cabo aproximadamente en 8 h siendo irreversible y costoso energéticamente, y este se activa principalmente por dos

causas: 1) la falta de nutrientes en el entorno, 2) una alta densidad celular (Abel-Santos, 2014).

Paralelo a su crecimiento, *B. subtilis natto* es capaz de producir una biopelícula formada de dos polímeros, que como se señaló, están constituidos de levana, nuestro objeto de estudio, y por el ácido  $\gamma$ -poliglutámico (PGA por sus siglas en inglés). Se ha reportado que en las fermentaciones de *B. subtilis*, algunas cepas dependen de la presencia de glutamato en el cultivo para poder sintetizar el PGA, aunque la gran mayoría son glutamato-independientes, es decir lo producen sin necesidad de la presencia de este aminoácido en el medio de cultivo (Kambourova et al., 2001). El PGA se caracteriza por ser soluble en agua y por la alta viscosidad que confiere al medio. Es sintetizado por complejos proteicos de la membrana fungiendo como biopelícula y reserva energética, que rodea a la célula protegiéndola de ataques de bacteriófagos. A pesar de su estructura proteica, no puede ser digerido por proteasas debido a su configuración estequiométrica donde, un grupo  $\gamma$ -carbonil está unido a un grupo  $\alpha$ -amida y puede contener tanto D como L glutámico. El PGA se empieza a sintetizar en la fase estacionaria temprana, hidrolizándose al final del cultivo, y dando lugar a ácido glutámico que *B. subtilis* utiliza posteriormente como reserva energética (Nabi & Das, 2015).

### **3.4 *B. subtilis*, formación de colonia, reguladores maestros y regulación transcripcional.**

Particularmente *B. subtilis* es capaz de crecer en una colonia no solo compleja, sino interesante desde el punto de vista ecológico. En la naturaleza *B. subtilis* se encuentra en el suelo o en simbiosis con las raíces de las plantas, por lo que ha evolucionado teniendo la facultad de adaptarse a diversos entornos (Bottaro, Larsen, 2008). En la figura 1 se observa la estructura propia de una colonia. Destaca el hecho de que existen diferentes estadios celulares observables y que, la formación de la colonia es un proceso altamente regulado. Así mismo, la configuración espacial de las células es importante debido a que, la comunicación intercelular se lleva a cabo mediante señales extracelulares

(quorum sensing), que definen tanto la respuesta celular, como los metabolitos que deben producir para la formación estructurada y espacial de la colonia (Cairns et al., 2014).

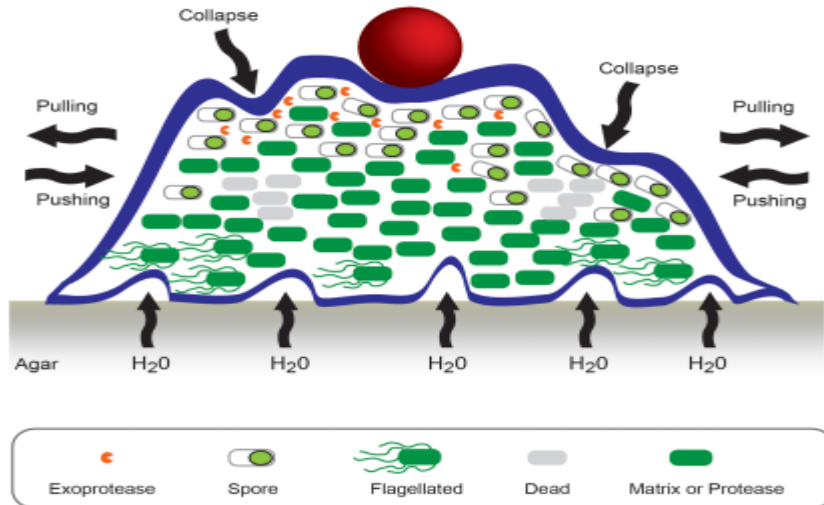


Figura 1. Morfología de una colonia de *B. subtilis*, se muestran diferentes estados celulares. Tomado de 'Biofilm formation by *B. subtilis*. S. Cairns et al. (2014)

Las respuestas celulares de *B. subtilis* se explican; vía la asignación de tareas y la diferenciación celular para realizarlas, proceso mediante el cual la bacteria expresa solo una fracción de genes con el fin de tener un ahorro energético, lo que permite al microorganismo crecer en ambientes muy diversos. De manera específica, a nivel transcripcional *B. subtilis* tiene una compleja red de regulación, dentro de la que destacan los 3 reguladores maestros; DegU, ComA y Spo0A, los cuales funcionan como componentes de dos sistemas que al fosforilarse dan lugar a señales metabólicas específicas (Hoch & Silhavy, 1995).

Para entender mejor este proceso es imperativo describirlo paso por paso. Las endoesporas, estructuras de resistencia al ambiente son sumamente volátiles. Cuando encuentran un lugar propicio para germinar, dan lugar a células con flagelo, el primer estado celular de *B. subtilis*. Las células con flagelo están facultadas para desplazarse y buscar lugares propicios para la instalación y desarrollo de una colonia. Para este fin se adhieren a una superficie y emiten una primera señal. Los principales factores que inician la cascada de regulación para



la producción de una biopelícula son Spo0A y DegU fosforilados: el primero regula operones que son cruciales para la formación de la matriz extracelular y, la represión de células motiles cuando las condiciones son propicias (Amati et al., 2004). Dado que los reguladores maestros son activados mediante fosforilaciones, su función dependerá completamente del estado energético en el que se encuentren las células. El segundo regulador es DegU, que se activa por la fosforilación de DegS, una histidina cinasa capaz de autofosforilarse y fosforilar a DegU. Este proceso lleva a cabo diferentes respuestas transcripcionales entre las que destacan la inhibición de la motilidad, la formación de biopelícula, la producción de enzimas extracelulares (entre las que encontramos a las proteasas y la levansacarasa), la producción de ácido  $\gamma$ -poliglutámico y el inicio del proceso de esporulación (López & Kolter, 2010).

Una vez iniciada la formación de la biopelícula e inhibido el mecanismo de motilidad, ocurren cambios en el proceso de diferenciación celular, como se muestra en la figura 2 empezando por el regulador ComA, que es el encargado de inducir a las células a producir surfactinas (molécula anfifílica producida por bacterias que puede funcionar como antibiótico) y posteriormente, en un proceso secundario, a hacer a las células competentes para aprovechar ADN exógeno y adquirir características nuevas para la población (López & Kolter, 2010). Por otro lado, cuando el regulador Spo0A es mantenido a niveles bajos, permite que las células productoras de matriz celular se diferencien, pero posteriormente, en un cultivo con densidad celular importante (cuando las células sobrepasan el crecimiento exponencial) y tienen pocos nutrientes, da lugar a otra subpoblación denominada caníbal. Como su nombre lo indica, estas células son capaces de excretar toxinas que afectan a las células sin diferenciar, llegando a convertirlas en nutrimentos para el resto de la población bacteriana. En última instancia, son los altos niveles de Spo0A, los que inician el proceso de esporulación (Veening et al., 2008).

DegU, el regulador de interés ya que es el responsable de la síntesis de levansacarasa; resulta contrariamente regulado con el mecanismo flagelar, ya que

propicia la formación de la biopelícula (por ende, de la levansacarasa y la levana) y posteriormente inicia la síntesis de proteasas, siendo este un paso subsecuente en la diferenciación celular (Davidson et al., 2012).

Cuando *B. subtilis* se encuentra en la rizosfera y entra en simbiosis con las raíces de las plantas, es capaz de excretar la levansacarasa y producir levana, incorporándola a la biopelícula debido a la presencia de sacarosa (inductor del operón donde se encuentra codificado el gen de la levansacarasa). Sin embargo, debido a que la organización de la colonia es altamente estructurada, las subpoblaciones quedan espacialmente organizadas permitiendo así su convivencia y asegurando su supervivencia por varias generaciones ya que, mantienen una reserva importante de metabolitos en forma de bio-polímeros; por otro lado, *B. subtilis* al delegar funciones, puede completar su ciclo de vida (en cultivo tarda de 8 a 10h) hasta llegar a endosporas que sobrevivirán cuando los nutrientes se agoten (Lopez et al., 2009).

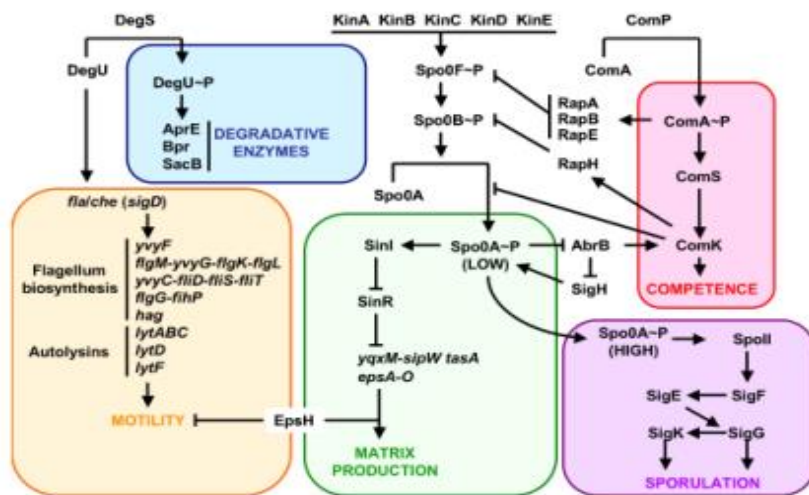


Figura 2. Diferenciación celular de *B. subtilis*, reguladores maestros y señalizadores transcripcionales. Tomado de 'Generation of multiple cell types in *B. subtilis*. López et al (2008)'

## 4 Justificación.

Los levan-FOS son de gran interés en la industria debido a su potencial uso como prebióticos en alimentos funcionales. Sin embargo, no existen procesos eficientes de síntesis de levan FOS, empleando enzimas silvestres o provenientes de microorganismos GRAS, específicamente los que existen actualmente asociados a la producción de levanas en el producto fermentado conocido como *natto*, así mismo, los procesos que hasta la fecha se han realizado, no tienen en cuenta la influencia de los factores ya conocidos para la eficiente síntesis de levana, por lo tanto, no aprovechan el sistema al máximo. Particularmente la levansacarasa de *B. subtilis* presenta ventajas frente a otras, ya que esta estructurada por un solo dominio, tiene buen rendimiento y es mucho más estable, lo que resulta en un modelo no solo interesante, sino sumamente atractivo en cuando a rendimiento de producción y sustrato/producto.

## 5 Hipótesis.

La optimización de las condiciones de reacción de la levansacarasa de *B. subtilis natto* producida por microorganismos asociados al *natto*, permitirá la síntesis de levanas de bajo peso molecular como se observa con la enzima SacB de *B. subtilis 168*.

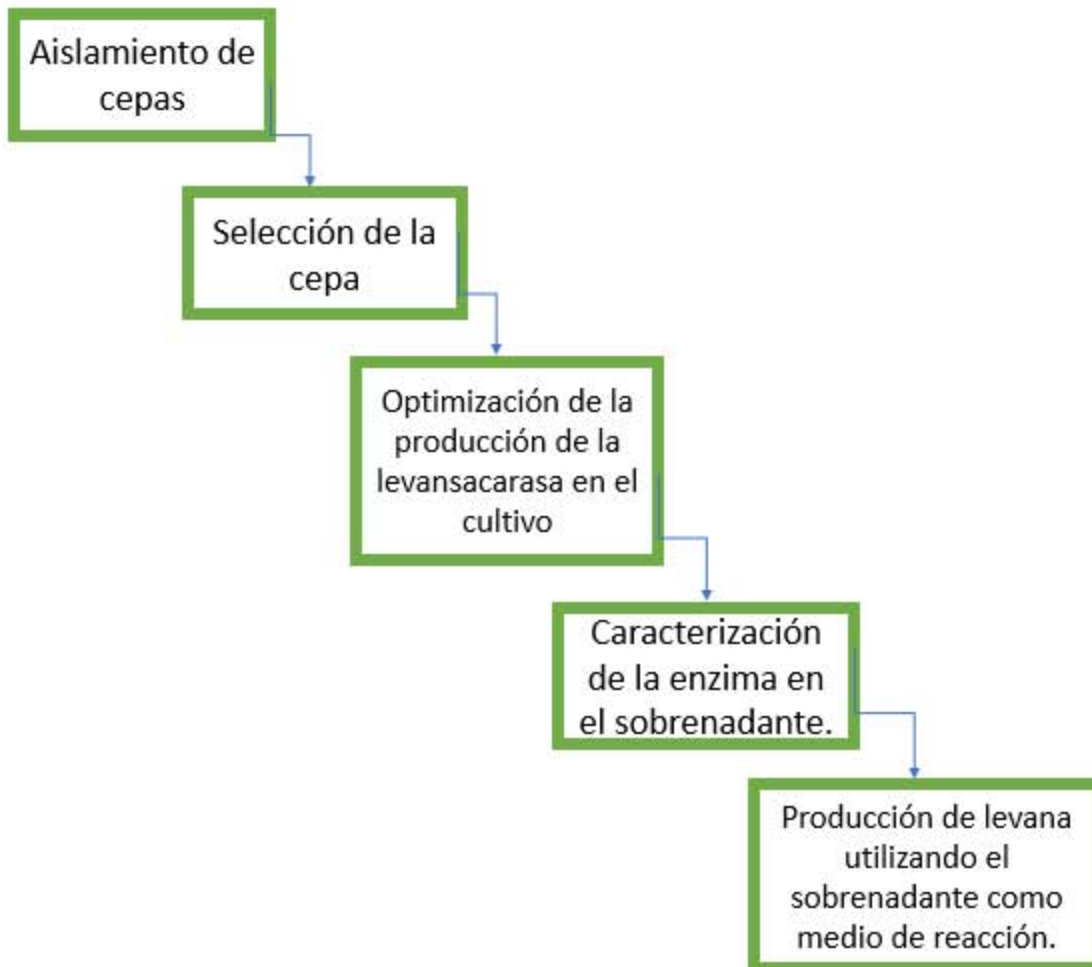
## 6 Objetivo.

Estudiar el proceso de producción de la levansacarasa de *B. subtilis natto* aislada del alimento fermentado *natto*, posteriormente estudiar las condiciones de reacción necesarias, con el fin de obtener la síntesis enzimática de levanas de bajo peso molecular (levan-FOS). Finalmente diseñar el bioproceso para obtener el mejor rendimiento posible.

## 7 Objetivos particulares.

- Aislar una cepa de *B. subtilis natto* de productos comerciales, con base en criterios generales de crecimiento/producción de levansacarasa y síntesis de levana.
- Identificar molecularmente la cepa y obtener la secuencia primaria de la levansacarasa sintetizada.
- Optimizar la producción de la levansacarasa en *B. subtilis natto* con el fin de maximizar la síntesis de enzima, minimizando la síntesis de otros productos durante el cultivo, como la propia levana o el PGA.
- Optimizar el cultivo de *B. subtilis natto* con el fin de evitar la actividad proteolítica en el sobrenadante garantizando la estabilidad de la levansacarasa.
- Optimizar las condiciones de reacción de la levansacarasa de *B. subtilis natto* para producir levana de bajo peso molecular a partir de sacarosa.
- Diseñar un bioproceso integral para la síntesis de levana de bajo peso molecular a partir de la enzima silvestre aislada de *B. subtilis natto*.

## 8 Estrategia experimental.



## 9 Metodología y materiales.

### 9.1 Aislamiento de cepas y perfiles de producción de levanas.

#### 9.1.1 Obtención y preparación de muestras.

Se adquirieron 5 nattos comerciales en tiendas de alimentos japoneses, que se conservaron siempre a temperaturas cercanas a 0°C para su conservación. Cada producto se pesó y se homogeneizó en 50 mL de solución salina al 9%. Para activar las bacterias del *natto* se utilizó el medio Lm (tabla 1) en cultivos de 50 mL a 28°C y 250 rpm inoculados con 1mL del homogeneizado. El cultivo se mantuvo en incubación hasta alcanzar una DO>3 a 600 nm, lo que usualmente tomó 13 h.

Tabla 1. Medio Lm (El pH se ajusta a 7 con HCl).

Compuesto	Concentración (g/L)
Sacarosa	10
Extracto de levadura.	20
Fosfato dipotásico.	20
Ácido clorhídrico.	Ajustar pH inicial de 7
Sulfato de magnesio.	0.2
Cloruro de calcio.	0.05
Sulfato ferroso.	0.01
Sulfato de manganeso.	0.01
Cloruro de sodio.	0.01
Agar (para medio sólido)	20

#### 9.1.2 Aislamiento de *Bacillus subtilis natto*.

Se realizaron diluciones de los cultivos líquidos descritos en el paso anterior, utilizando un factor de 10 y se plaquearon en medio Lm sólido desde la dilución 10<sup>-5</sup> hasta la 10<sup>-9</sup> con el fin de obtener colonias aisladas. Enseguida se seleccionaron las colonias aisladas que presentaron la mayor formación de



polímero a su alrededor, observada cualitativamente en la placa. Así mismo, se observó al microscopio con tinciones Gram las bacterias para verificar que tuvieran una morfología correspondiente a la de *B. subtilis*. Para cada producto comercial se aisló una cepa, por lo que de esta selección se obtuvieron las cepas designadas como Mt, Jk, Sh, Az y Ok.

### **9.1.3 Extracción y análisis del tipo de levana presente en el natto comercial.**

Con el fin de tener más información sobre el tipo de levana que producen las cepas aisladas, se analizó la levana directamente producida en el natto. Para este fin, 5 g de natto en peso seco se suspendieron en 10 mL de H<sub>2</sub>O estéril a pH 5 para posteriormente retirar la fracción sólida mediante centrifugación a 9000 rpm, dejando a la levana en la fracción soluble. A esta fracción se agregó etanol absoluto en una relación 1 v/v para posteriormente centrifugar a 9000 rpm. Una vez separado el precipitado se evaporó el etanol a 60°C por 4 h. El producto seco se resuspendió en 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril. Posteriormente a 200 µL de esta solución se añadieron 20 µL de Fructozyme® de Novozyme (mezcla de endo y exo inulinasas), entonces la reacción se mantuvo por 20 h a 60°C y 350 rpm por 16 h. Los productos de hidrólisis se analizaron por GPC (cromatografía de permeación en gel) en las condiciones descritas más adelante.

### **9.1.4 Obtención de sobrenadantes y almacenamiento de cepas.**

Una vez aislada una cepa representativa de cada producto comercial, se iniciaron nuevos cultivos partiendo de un preinóculo, inoculando 25 mL de medio Lm con una colonia proveniente del paso anterior e incubando a 28 °C por 16 h y 250 rpm. En un siguiente cultivo, 50 mL de medio Lm se inoculó con 1 mL del cultivo anterior incubándose a 28 °C por 6 h y 250 rpm. De este cultivo se elaboraron gliceroles al 50 % v/v para almacenar a -70 °C las cepas aisladas. En todos los casos se monitoreó la evolución de la biomasa por DO a 600 nm y el pH, para posteriormente cuando fuera factible cosecharlos, se centrifugaron a 7500 rpm por 20 min a 4 °C con el fin de retirar las células.

### **9.1.5 Selección de cepas.**

Para seleccionar la cepa de trabajo se realizaron cultivos por triplicado para cada una de las cepas seleccionadas de los natts comerciales. Estos cultivos se llevaron a cabo en medio LM con una concentración de 10 % de sacarosa. A los cultivos se les midió el pH final, la curva de crecimiento mediante DO, la actividad en el sobrenadante y se cuantificó la levana producida, precipitándola con un volumen 1:1 de etanol en el sobrenadante y cuantificando por DNS (método del ácido 3,5 dinitrosalicílico). Específicamente, se cuantificó el poder reductor generado después de hidrolizar la levana con Fructozyme®, en las condiciones que se describen más adelante.

### **9.1.6 Cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC.**

Se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography) con un equipo Waters y una columna aminada Prevail, utilizando una fase móvil de acetonitrilo-H<sub>2</sub>O 80:20 v/v con flujo 1.2 mL/min a 30 °C con un detector de índice de refracción. Se construyó una curva de calibración con 2, 4, 8, 10 y 12 g/L de glucosa, fructosa y sacarosa.

### **9.1.7 Medición de actividad global y perfiles de reacción.**

Con el fin de determinar la actividad enzimática en los sobrenadantes, se efectuaron reacciones a 37 °C con 10 % v/v de sacarosa en buffer de acetatos 50 mM, pH 6, conteniendo 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. En estas reacciones se midió la velocidad inicial de reacción siguiendo la liberación de azúcares reductores (AR) mediante el método del DNS. Las reacciones se prolongaron hasta 18 h en las mismas condiciones para analizar la conversión final.

### **9.1.8 Hidrólisis de la levana con Fructozyme.**

La levana producida por cultivo o en reacción se hidrolizó con la enzima comercial Fructozyme® con las condiciones antes mencionadas. La reacción de hidrólisis se realizó por 18 h a 60 °C y 350 rpm. La concentración de levana se

puede entonces expresar en términos de la concentración de fructosa liberada medida por DNS o la concentración de levana si se supone un peso molecular único.

#### **9.1.9 Cromatografía de capa fina (TLC).**

Se analizaron por TLC los azúcares presentes en los sobrenadantes al inicio y a las 18 h de reacción (del apartado 9.1.7), así como después del tratamiento de hidrólisis con Fructozyme®. Para la cromatografía se empleó como fase estacionaria una placa de sílica gel 60 (MERCK) y como fase móvil cloroformo, metanol, H<sub>2</sub>O (7.5:5:1) v/v corriéndola 3 veces y revelándola con calor y  $\alpha$ -naftol.

#### **9.1.10 Cromatografía de permeación en Gel (GPC).**

Con el fin de obtener el peso molecular (PM), el polímero sintetizado se analizó por HPLC (Waters) con un detector de índice de refracción (Shodex) en una columna Ultrahydrogel Linear (7.8 mm x 300 mm) utilizando un flujo de 0.8 mL/min a 37°C con una fase móvil de NaNO<sub>3</sub> 0.1 M. Como estándar se utilizó levana de alto (1800 – 2000 kDa) y bajo (8.5-11 kDa) peso molecular, así como FOS de Orafti® de BENEIO, glucosa, fructosa y sacarosa.

### **9.2 Técnicas de biología molecular para la identificación de las cepas aisladas y selección de cepa.**

#### **9.2.1 Extracción de ADN genómico de las cepas aisladas del natto comercial.**

Para la extracción del ADN se crecieron cultivos de las cepas durante 6 h. En seguida se centrifugan 3 mL del cultivo y se lavaron en dos ocasiones con solución salina al 0.9 % para retirar los polisacáridos solubles del cultivo. Se utilizó el kit de Zymo Research 'Quick-g DNA Miniprep kit' siguiendo el protocolo con una ligera modificación: después de agregar el buffer de lisis, se agregó lisozima (aproximadamente 1 mg) y se mantuvo la incubación a 37 °C por 1 h para, asegurar el rompimiento de la pared celular de los bacilos ya que son Gram

positivos. Al término de este protocolo se cuantificó el ADN genómico por Nanodrop de Thermo Fisher, finalmente se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1% para corroborar su integridad.

### 9.2.2 Amplificación del gen 16S de las cepas.

Con el fin de amplificar y secuenciar el gen 16S completo de cada cepa se utilizó la técnica PCR, utilizando la enzima Taq ADN polimerasa de Thermo Scientific siguiendo las especificaciones, empleando como templado el ADN genómico del paso anterior y usando los oligos; Fd1 'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG' y Rd1 'AAGGAGGTGATCCAGCC' (Siguiendo el proceso de la Figura 1). Finalmente, los productos de amplificación que, se observaron sin subproductos y aproximadamente de 1.6 K pares de bases fueron purificados con 'GeneJET PCR Purification Kit' de Thermo Scientific siguiendo las indicaciones del protocolo. El ADN se cuantificó por Nanodrop y se analizó en un gel de agarosa al 1%.

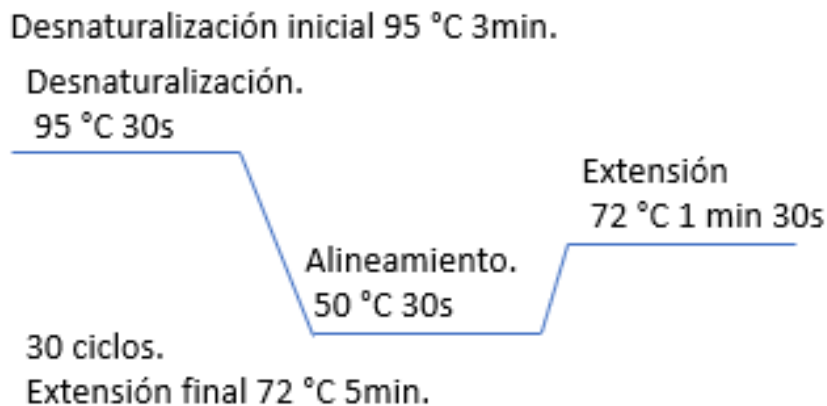


Figura 3.  
condiciones para el  
ensayo PCR del gen  
ribosomal 16s

### 9.2.3 Patrón de digestión del gen ribosomal amplificado (ARDRA por sus siglas en ingles)

Una vez obtenidos los genes ribosomales 16s de cada cepa se realizó una primera caracterización mediante la técnica conocida como ARDRA, para lo cual

los genes se digirieron con la enzima HaeIII de BioLabs® 10,000 U/mL, de acuerdo con el protocolo descrito en la tabla 2. Las digestiones se mantuvieron en incubación durante 2h a 37°C para, posteriormente analizar los productos de digestión en un gel de agarosa al 2.5%, cargando todo el volumen de la reacción (20 µL). El gel se corrió a 75 V utilizando como marcador el MPM O'Range Ruler 100 pb, y teniendo como control el templado del 16s de la cepa *B. subtilis* 168.

Tabla 2. Procedimiento para el análisis del tipo ARDRA

Cepa	Vol. DNA 200 ng (µL)	Buffer R (µL)	Enzima HaeIII (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)
Jk	6	2	1	11
Sh	5	2	1	12
Az	12	2	1	5
Ok	6	2	1	11
168	4.5	2	1	12.5

#### 9.2.4 Aislamiento y secuenciación de la levansacarasa silvestre.

Con el fin de conocer mejor a la levansacarasa que ha sido seleccionada, se decidió clonarla y secuenciarla, para realizar un análisis comparativo a nivel de nucleótidos con la enzima de referencia sacB de *B. subtilis* 168. Por lo que se hizo una PCR con los oligos: Forward (5' GGAATTCCATATGAAAGAAACGAACCAAAGCC 3') Reverse (5' GTGCTACTCGAGTTTGTAACTGTTAATTGT 3') obtenidos de la secuencia reportada de la levansacarasa de *B. subtilis natto* en la base de datos NCBI y que amplifican el gen completo. El gen se purificó como se describió anteriormente y se verificó en un gel de agarosa al 1 %, para después realizar su caracterización.

### 9.3 Estandarización del cultivo para la producción de la levansacarasa y posteriormente de levanas.

#### 9.3.1 Producción de esporas en un cultivo de la cepa AZ.

Con el fin de propiciar la esporulación en un cultivo de la cepa Az, éste se mantuvo por más de 24 h hasta agotar los nutrientes. Una vez esporulado, se hirvió a 80 °C por 10 min para desactivar células de otras subpoblaciones. Finalmente se prepararon gliceroles con las esporas en una relación 1:1 (v/v) y se almacenaron a -70 °C.

### **9.3.2 Cultivos de la cepa Az partiendo de esporas.**

Se preparó un preinóculo en medio Lm con 20 % de sacarosa y 50 µL de glicerol de esporas. El preinóculo de 25 mL de medio Lm se creció a 37 °C durante aproximadamente 14 h. Cuando el cultivo alcanzó una densidad celular a 600 nm entre 5.3 y 5.6, se empleó para inocular un nuevo cultivo de 125 mL de medio Lm con sacarosa al 10 %, se debe tener una DO inicial entre 0.05 a 0.1 de absorbancia a 600 nm. Los cultivos se observaron al microscopio durante 8 h en fresco para monitorear el estado fisiológico del bacilo.

### **9.3.3 Medición de actividad proteolítica en el sobrenadante.**

Con el fin de cuantificar la actividad proteolítica producida por *B. subtilis* se utilizó una solución de caseína al 1 % como sustrato. Entonces a 380 µL de dicha solución se agregaron 20 µL de sobrenadante recolectado a diferentes tiempos de fermentación. La reacción de proteólisis se siguió durante 6 h tomando una muestra cada hora y deteniendo la reacción agregando 600 µL de ácido tricloroacético al 5 % para completar 1 mL. Después de centrifugar a 10,000 rpm para separar la proteína no digerida, se midió la absorbancia de los péptidos solubles a 280 nm, utilizando el tiempo 0 como blanco y se calculó actividad proteolítica del sobrenadante sobre caseína. (Se utilizó como coeficiente de extinción del triptófano  $5.58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

### **9.3.4 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).**

Con el fin de analizar la síntesis de la levansacarasa en el cultivo, las proteínas de los sobrenadantes de las muestras se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 15 %, utilizando como

marcador de peso molecular PageRuler Plus 10 kDa a 250 kDa (Thermo Scientific). Las muestras (500  $\mu$ L) se mezclaron en buffer de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol calentándolas en agua en ebullición por 5 min. La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA durante 6 h en buffer de corrida. Los geles se tiñeron con Gel Blue Strain Reagent (Thermo Scientific) durante 14 h y se destiñeron con agua destilada.

### **9.3.5 Purificación de la levansacarasa de *B. subtilis* natto Az por cromatografía de intercambio catiónico.**

La levansacarasa de *B. subtilis natto* Az se purificó a partir de 1 L de sobrenadante cosechado del cultivo mediante intercambio catiónico (Sephacose Fast Flow), usando un sistema de purificación de proteínas (Äkta) con una columna de intercambio iónico de CM-sefarosa marca Cytiva, buffer de fosfatos 0.1M pH 6 como eluyente para equilibrar la columna. Después de cargar la columna con las proteínas del sobrenadante diluido 5 veces, las que fueron absorbidas se eluyeron con buffer fosfatos pH 6 haciendo un gradiente de 0.1 M a 1 M. De esta forma, se recolectaron 20 muestras de 5 mL cada una, encontrándose señal en seis de ellas. A las fracciones con picos en el cromatógrafo a 280 nm, se les midió actividad enzimática y se concentraron 10 veces por nanofiltración con el fin de observar las proteínas en un gel SDS-page al 10 %, utilizando como control SacB recombinante.

### **9.3.6 Zimograma de la levansacarasa de la cepa *B. subtilis* Az purificada.**

Con la enzima pura se realizó un zimograma, en un gel nativo de poliacrilamida al 10 % utilizando SacB recombinante de la cepa 168 como control positivo. En este experimento la mitad del gel se tiñe con azul de Coomassie y a la otra mitad, se le aplicó un tratamiento que consistió en efectuar 3 lavados con Tween 80 al 1 % por 30 min con el fin de renaturalizar la proteína, para en seguida, llevar a cabo la reacción sumergiéndolo por 18 h en una solución de sacarosa (100 g/L) a 37 °C en buffer de acetatos 50 mM, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y pH 6. Posteriormente se realizó un lavado del gel con etanol-agua (75:25) para fijar el polímero, mismo que se lava durante 1 h con una solución de ácido peryódico al

0.7 % (p/v) y ácido acético al 5 % (v/v), con el fin de formar aldehídos al oxidar los grupos hidroxilos del polímero. Finalmente, se efectúan otros 3 lavados de 20 min con metabisulfito de sodio al 0.2 % (p/v) y ácido acético al 5 % para revelarlo con reactivo de Schiff, que reacciona con los grupos aldehídos formando un color púrpura que se queda fijo al gel.

### **9.3.7 Producción de levana utilizando el sobrenadante como medio de reacción.**

Una vez sabiendo que el tiempo adecuado para recolectar el sobrenadante son 5 h, se decidió analizar la relación transferencia/hidrólisis, así como la eficiencia de conversión respecto a sacarosa, por parte de la levansacarasa presente en el sobrenadante del medio de cultivo para así, evaluar la posibilidad de usarlo como fuente de enzima y realizar las reacciones en este medio de reacción. La concentración de enzima se ajustó para tener una actividad de 0.5 U/mL, y se evaluaron reacciones a diferentes concentraciones de sacarosa (50, 100, 200 y 500 g/L).



## 10 Resultados y Discusión.

### 10.1 Obtención y características de nattos comerciales.

Se adquirieron 5 productos identificados como Natto en el establecimiento comercial 'Super Mikasa' ubicado en la colonia Roma Norte en la ciudad de México. El criterio de selección fue únicamente que fueran producidos por distintas casas comerciales y que no contuvieran aditivos (Figura 4).



Figura 4. Nattos comerciales recolectados para el aislamiento de *B. subtilis natto*.

En la tabla 3 se enlistan los productos comerciales adquiridos, el contenido neto (g) y una clave asignada tanto al natto como a la cepa de bacilo obtenida a partir de cada producto. Particularmente destaca el hecho de que los nattos denominados Az y Jk presentaban una coloración blanquecina al ponerlos en una solución salina, mientras que los 3 restantes daban lugar a soluciones de un color café oscuro.

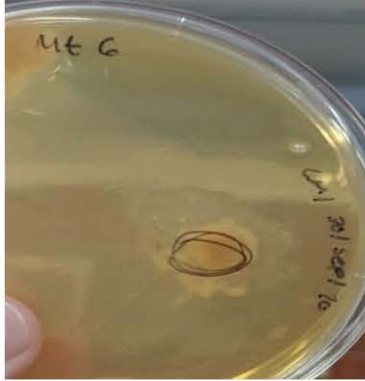






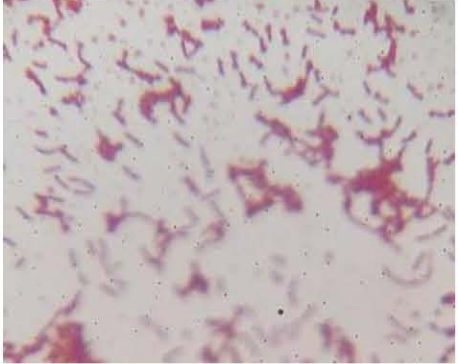
Tabla 3. Origen de las muestras de natto empleadas en el proyecto, contenido neto y clave asignada a cada producto, así como a la cepa de *B. subtilis* aislada de cada uno de ellos.

Natto	Clave.	Peso (g).
J-basket	Jk	38.2
Azuma shokchin azuma 3p	Sh	48.2
Mitokara com natto	Mt	45.2
Azuma orgánico fermentado	Az	41.7
Okame natto goku kutsi	Ok	50.6

## 10.2 Aislamiento de cepas de *Bacillus subtilis* del natto.

De acuerdo con lo descrito en la metodología, se plaquearon los cultivos inoculados con las muestras de natto comercial, obteniéndose diversas colonias con morfologías diferentes. Sin embargo, la peculiaridad de que *Bacillus subtilis natto* forma colonias que se caracterizan por sus formas irregulares, la formación de polímero blanquecino alrededor de la colonia y, el aspecto rugoso, permitieron una primera identificación con relativa facilidad. Lo anterior aunado a que, bajo el lente del microscopio, *B. subtilis* tiene la morfología de bastón y que es Gram positiva, contribuyó a la adecuada selección. En la Figura 5, se resumen las características ya descritas en las colonias seleccionadas, incluida la tinción Gram observada bajo el microscopio, pudiendo concluirse que todas las colonias aisladas cumplen con las características antes mencionadas. En esta figura se reporta también, la clave asignada en la Tabla 3.

Natto	Colonia	Tinción Gram.

Mt	 <p>A petri dish containing a yellowish agar culture. The lid is marked with "Mt 6" in black ink. On the right side of the lid, there is handwritten text: "LM 301 Sep 12". A small circular area on the agar surface is circled in black.</p>	 <p>A light micrograph showing numerous purple-stained, rod-shaped bacteria. Some of the bacteria are arranged in short chains or pairs, while others are single.</p>
Jk	 <p>A petri dish with a yellowish agar culture. The lid has handwritten red markings: a checkmark, two circles labeled "1" and "2", and a blue circle labeled "3". On the left side of the lid, there is handwritten text: "LM 301 Sep 12".</p>	 <p>A light micrograph showing purple-stained, rod-shaped bacteria, similar to those seen in the Mt culture.</p>
Sh	 <p>A petri dish with a yellowish agar culture. The lid is marked with "LM subcalza" and "365".</p>	 <p>A light micrograph showing purple-stained, rod-shaped bacteria. Some of the bacteria are arranged in chains, and there are some larger, more complex structures visible.</p>
Az	 <p>A petri dish with a yellowish agar culture. The lid has handwritten red markings: "LM 301 Sep 12" and "ABC". A blue circle is drawn on the lid.</p>	 <p>A light micrograph showing purple-stained, rod-shaped bacteria, similar to those seen in the other cultures.</p>

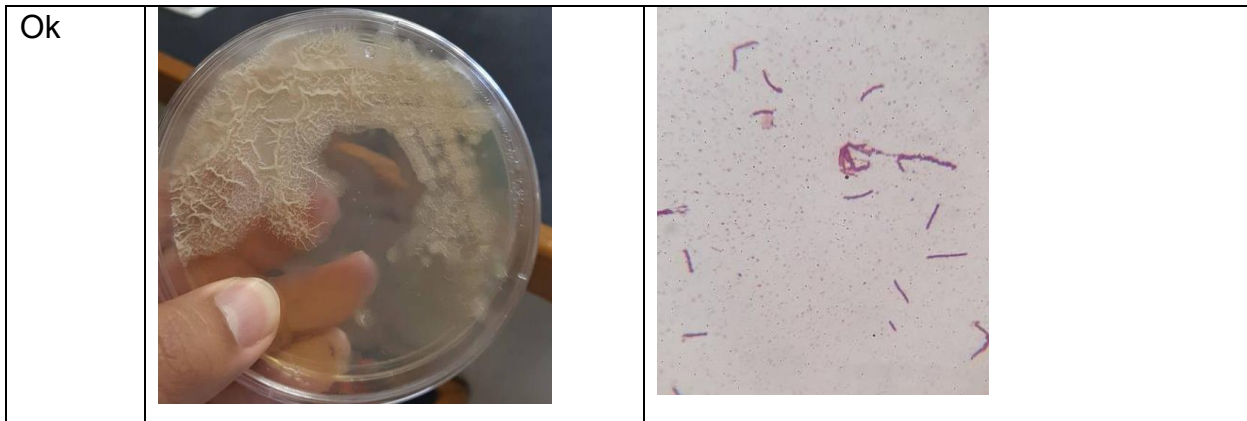


Figura 5. Colonias seleccionadas de 5 productos comerciales de natto. Las fotografías muestran la morfología y la tinción gram de las probables colonias de *B. subtilis*

Como podemos observar en la Figura 5, las colonias obtenidas presentan un biopolímero blanquecino que cubre la colonia de la probable cepa de *Bacillus subtilis*; se muestra también que las tinciones Gram y la morfología de bastón, corresponden a la especie buscada. En las cepas aisladas de los productos Mt, Sh y Jk, se puede observar con mayor claridad la presencia de pequeños halos alrededor de la bacteria, los cuales podrían corresponder también al biopolímero, ya que no fue teñido y recubre a la bacteria como lo hacen las biopelículas.

### 10.3 Levanas sintetizadas en el Natto comercial.

Se decidió estudiar la levana presente en el natto comercial, es decir, la que se sintetiza durante la fermentación en estado sólido que da lugar al natto. En la Figura 6 se muestra los cromatogramas correspondientes a las levanas extraídas de los productos comerciales, de acuerdo con la estrategia descrita en la metodología. En dicha figura se observa tanto una fracción de polímero de alto peso molecular, como una fracción de bajo peso molecular, perfil característico de la levansacarasa SacB en condiciones estándar de reacción. Es conveniente resaltar que el natto Mt contiene la menor proporción de levana de los 5 productos analizados (rasgo observable en la figura 4 cepa Mt), mientras que los productos Az y Ok, son los de mayor concentración (observable cualitativamente en la figura

6). Esto se nota después de la hidrólisis con Fructozyme en la disminución de las señales de polímero; fenómeno que es más evidente en la Figura 7 para el natto Ok. Se puede constatar también que las señales no desaparecen totalmente, probablemente, (como se mencionó en los antecedentes) es debido a la presencia del ácido poliglutámico (GPA) característico del natto. Hay que recordar que este otro producto representa el 60 % de los polímeros presentes y, puede ser extraído empleando las mismas técnicas de extracción (extracción acuosa) y de recuperación (precipitación con etanol), que se usaron para la levana (Birrer et al., 1994). Así mismo, se ha reportado que su peso molecular puede variar dependiendo de la composición del medio y, las condiciones de cultivo de *B. subtilis*, que lo produce y lo degrada. En particular, en la industria farmacéutica se han buscado estrategias para obtener GPA con un peso molecular determinado (30-50kDa) ya que, tiene propiedades encapsulantes (Bajaj & Singhal, 2011). No obstante, podría identificarse y cuantificarse mediante degradación con una enzima (poliglutamil-hidrolasa), o en su defecto, mediante hidrólisis química en condiciones ácidas o térmicas (Birrer et al., 1994).

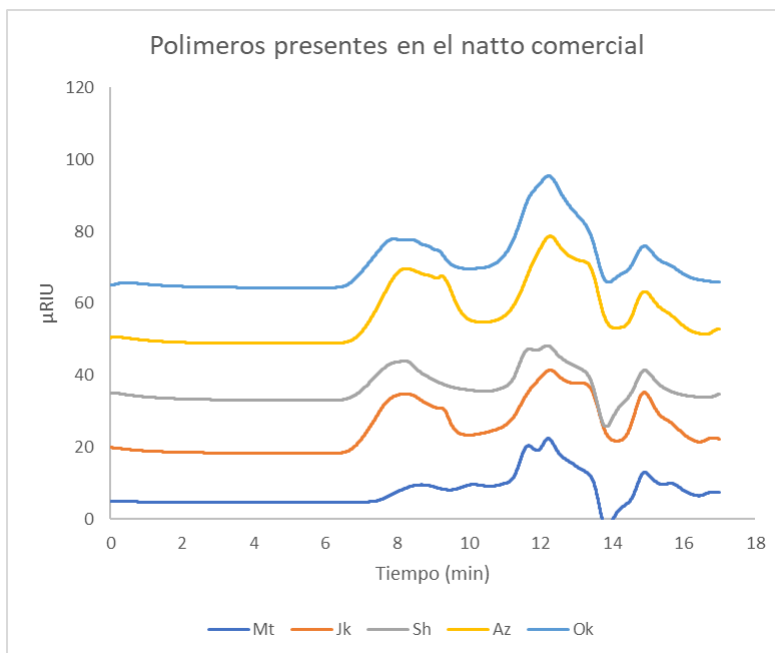


Figura 6. Análisis por HPLC (GPC) de los polímeros presentes en el natto comercial, obtenidos mediante extracción acuosa del producto fermentado. Se observa una fracción de alto y otra de bajo peso molecular.

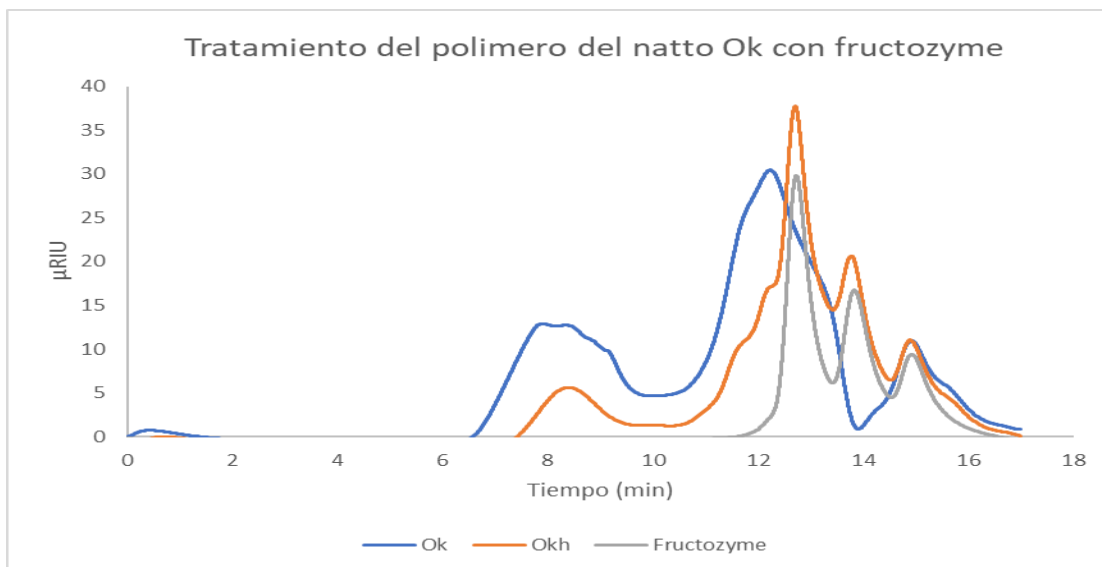


Figura 7. Perfil de peso molecular de los polímeros presentes en el natto Ok analizados por HPLC GPC. En azul se muestra el cromatograma de los polímeros solubles del natto. En naranja los polímeros después del tratamiento de hidrólisis con Fructozyme y, en gris el análisis de Fructozyme como referencia ya que, es probable que contenga aditivos en su formulación.

#### 10.4 Producción y caracterización parcial de las levansacarosas en el sobrenadante de las cepas aisladas de natto comercial.

En la Tabla 4 se presentan las características de los sobrenadantes en los cultivos producidos. Particularmente se presentaron problemas de reproducibilidad con la cepa Mt, ya que dejó de crecer en cajas Petri. Se puede observar que todos los sobrenadantes cosechados del cultivo de las cepas aisladas tienen actividad tipo levansacarasa. Por otro lado, con excepción de la cepa Jk, en los sobrenadantes no se observó un cambio significativo de pH, ya que en todos los casos se mantuvo constante a un valor de 6.0, correspondiente al pH óptimo de la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis* 168. En el caso de la cepa JK el sobrenadante se acidifica por los metabolitos secundarios que genera: se encontró que, si la fermentación se detiene para evitar que el pH baje, solo se obtiene la mitad de actividad en el sobrenadante, en comparación a la obtenida al dejar que el pH disminuya. La cepa Jk es también la cepa que más levana produce. Cabe resaltar que tanto la cepa Mt como la cepa Jk tienen las más bajas actividades en



el sobrenadante, así como el mayor crecimiento celular en el cultivo a las 6 h (2.6 g/L de concentración celular). En el caso de los cultivos de las 3 cepas restantes, no hay diferencia significativa en cuanto a crecimiento celular, actividad levansacarasa en el sobrenadante y pH, por lo que se decidió caracterizar con más detalle la actividad levansacarasa de las 5 cepas aisladas, en búsqueda de elementos que ayudaran a diferenciarlas.

Tabla 4. Características del sobrenadante de los cultivos de cinco cepas aisladas de Nattos comerciales

Cepa	Do a 600 nm	Concentración celular. g/L	pH	Actividad Ls sobrenadante U/mL	Sacarosa residual g/L	Fructosa residual g/L	Glucosa residual g/L	Levana sobrenadante g/L
Mt	7.6	2.66	6.06	0.54	-	-	-	-
Jk	7.6 (6h)	2.66	5.9	0.83	0	6.48	2.81	1.21
Jk	4.71±0.32	1.65±0.11	6.54±0.01	0.48±0.06	0	3.29±0.02	4.98±0.88	0.83±0.06
Sh	5.56±0.47	1.95±0.16	6.59±0.38	1.58±0.38	0	2.02±1.01	4.17±1.35	0.28±0.11
Az	4.85±0.31	1.69±0.04	6.53±0.14	1.56±0.21	0	1.71±0.41	4.61±0.34	0.36±0.10
Ok	5.25±0.63	2.33±0.05	6.69±0.15	1.03±0.13	0	2.35±0.75	5.26±0.52	0.38±0.09

*Los cultivos se llevaron a cabo en medio LM a 28°C y 200rpm. Los datos corresponden a muestras recolectadas a las 6h de cultivo.*

Se analizaron los perfiles del peso molecular del polímero sintetizado en el sobrenadante; tal cual se colecta de los cultivos de las 5 cepas aisladas. Se trata del polímero que sería producido por la enzima, asociado al crecimiento del microorganismo durante el cultivo. Se encontró que en los 5 sobrenadantes se sintetiza polímero con el mismo perfil de producto se observa mediante placas de TLC (Figura 8), también resalta que la concentración es baja, tanto de polímero

cómo de los oligosacáridos que migran en la placa de TLC, y que existe fructosa, glucosa y sacarosa residuales en el sobrenadante (Figura 8A). Estos sobrenadantes fueron empleados para realizar reacciones de síntesis de levana, por lo que, una vez efectuada la reacción de síntesis, podemos observar en la Figura 9B que el polímero sintetizado coincide con el control de levana, y como se intensifican las señales de los productos que corresponden a oligosacáridos, de acuerdo con una comparación con los tiempos de migración de los FOS (inulofructooligosacaridos marca Orafti) usados como control. Se observa igualmente un incremento en las concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa. Finalmente, se obtiene un primer acercamiento a que, tanto el polímero como los FOS sintetizados en los sobrenadantes de los cultivos, corresponden a levana y oligosacáridos de tipo levana, mismos que se observan resultantes en los productos de síntesis obtenidos (Figura 8B). Para corroborar lo anterior, se trataron con Fructozyme, encontrando que todos son degradados a fructosa, como se puede concluir al observar su desaparición en la Figura 8C, correspondiente a las muestras después del tratamiento. Así, podemos concluir que muy probablemente, los productos observados en la Figura 8B son levana y levana-FOS productos de síntesis correspondientes a una levansacarasa

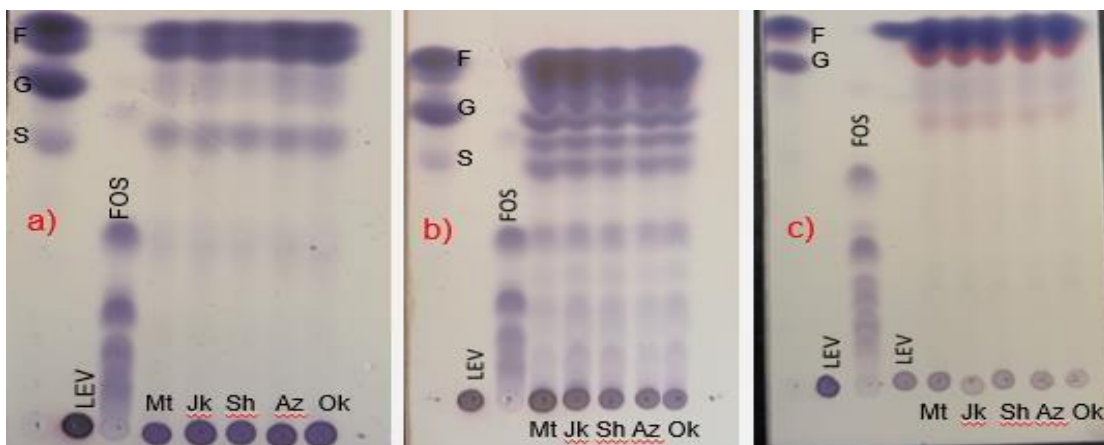
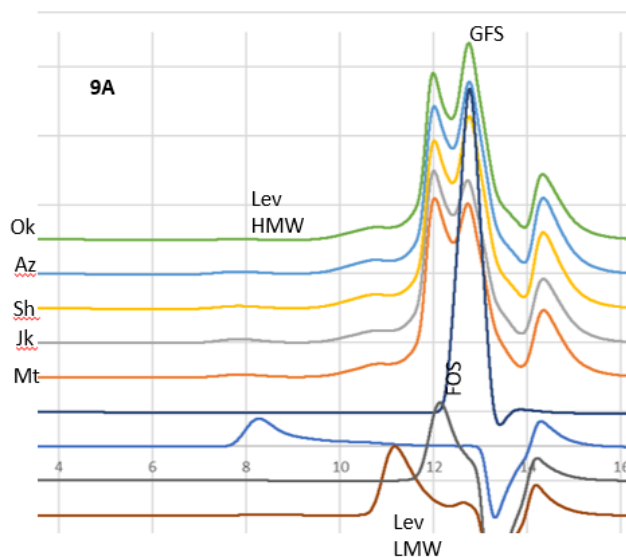


Figura 8. Análisis por TLC en placas de Silica Gel de los productos de síntesis de polisacáridos, utilizando los sobrenadantes de los cultivos de las cepas aisladas de natts comerciales. A) Muestras de sobrenadante. B) Muestras después de la reacción de síntesis con sacarosa. C) Muestras de la reacción de síntesis después de tratamiento con el producto Fructozyme. En todos los casos se muestra el control para el cual se empleó levana producida por SacB, fructosa, glucosa, sacarosa y FOS de la empresa Orafti.



## 10.5 Levanas sintetizadas por la LS del sobrenadante de cultivos de cepas de *B. subtilis* aislados del natto.

Con la evidencia de que el polímero sintetizado corresponde a levana, se buscó caracterizar el peso molecular de la misma, para lo cual las mismas muestras que se analizaron por TLC en placas de silica (Figura 8), se analizaron mediante HPLC en una columna de Cromatografía de Permeación en Gel (GPC). Los cromatogramas obtenidos para estas muestras se presentan en la Figura 7, donde puede observarse de igual manera que en el análisis por TLC, los perfiles de elución que corresponden al menos en tiempos a; levana, fructooligosacáridos, glucosa, fructosa y sacarosa pueden observarse en baja concentración en el cromatograma perteneciente al tiempo 0 de reacción, es decir, en el cromatograma resultante de analizar el sobrenadante cosechado del cultivo antes de la reacción de síntesis (Figura 9A). Por otro lado, se observa que todos los productos aumentan considerablemente después de 18 h de reacción con 10 % de sacarosa (Figura 9B). Es importante señalar con respecto al polímero que eluye sólo en los tiempos, que corresponden a levana de bajo peso molecular. Finalmente, después del tratamiento de hidrólisis con Fructozyme (Figura 9C) se observa cómo en el cromatograma desaparece la señal que corresponde a la levana de bajo peso molecular, mientras que las correspondientes a glucosa, fructosa y sacarosa aumentan, constatándose otra vez que las levanasas de dicho producto degradan el polímero sintetizado y sus oligosacáridos. Cabe resaltar que las 5 cepas dan lugar a productos con el mismo perfil de elución en el sobrenadante de los cultivos (Figura 9A).



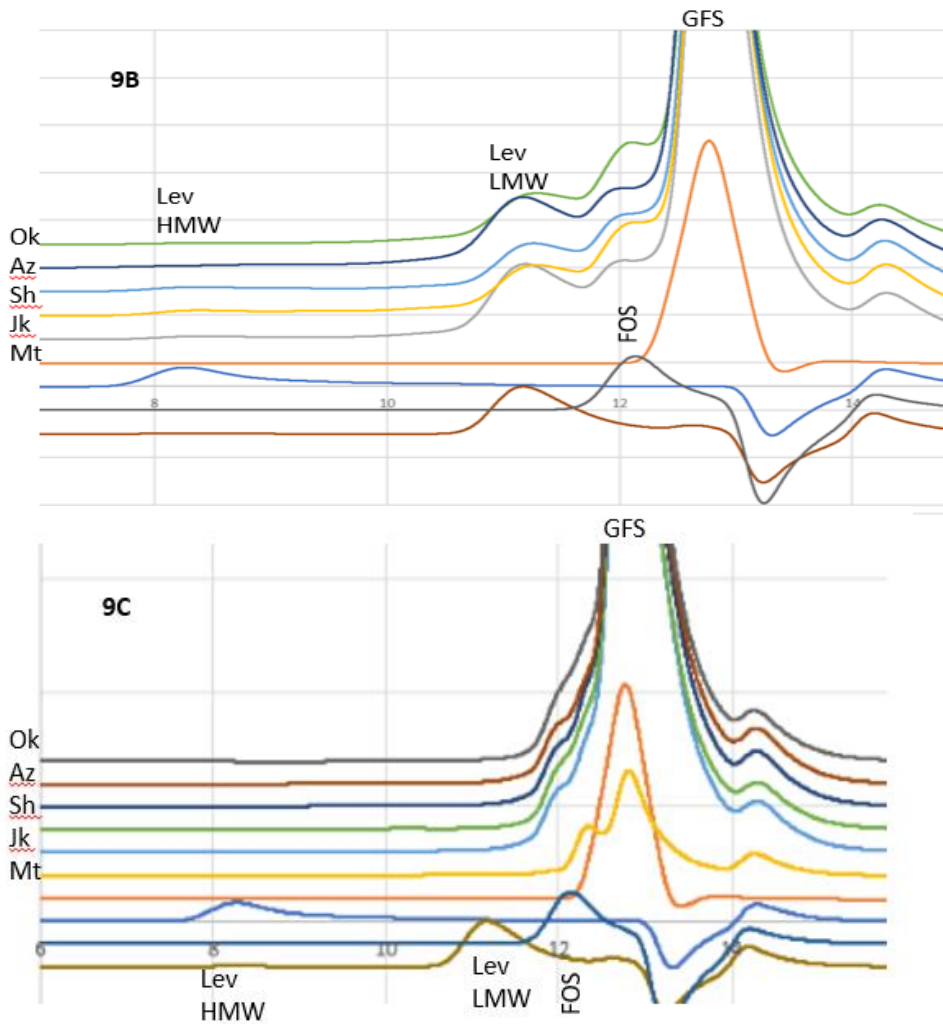


Figura 9. Análisis de los productos de síntesis por HPLC (GPC) de los polisacáridos sintetizados por las enzimas presentes en los sobrenadantes del cultivo de cada cepa aislada de nattsos comerciales. A) Sobrenadantes del cultivo antes de la reacción de síntesis. B) Productos de la reacción después de 18 h de síntesis. C) Hidrólisis de los productos del sobrenadante con fructozyme a las 18 h de reacción. Los controles corresponden a FOS (Orafti) y levana sintetizada con la enzima sacB expresada recombinantemente (se muestra una fracción de alto 'HMW' y otra de bajo 'LMW' con respecto al peso molecular).

Con todos los experimentos hasta ahora realizados, se puede concluir que, la síntesis de las levanas con la levansacarasa presente en el sobrenadante de cultivo de cada cepa de *B. subtilis*, sólo da lugar a levanas de bajo peso molecular; mientras que, en el natto la misma enzima sintetiza levana con una distribución bimodal de peso molecular. Esto permite constatar la hipótesis planteada, en el sentido de que las levansacarosas provenientes de las cepas de *B. subtilis* en los nattsos comerciales, se comportan como las levansacarasa SacB de la cepa 168

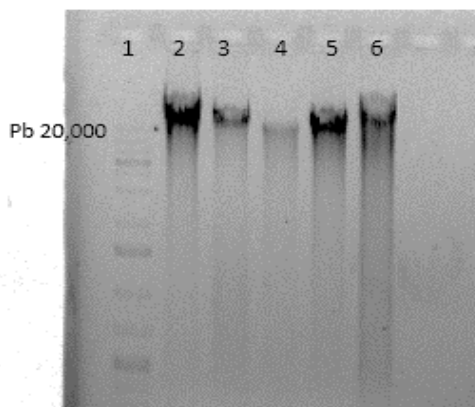
en términos de especificidad, es decir: las levansacarosas provenientes del natto tienen la capacidad de sintetizar levanas de alto o bajo peso molecular, en función de las condiciones de reacción; sin embargo, la información recopilada hasta esta etapa, no es suficiente para seleccionar alguna cepa/enzima ya que todas tienen comportamientos similares.

## 10.6 Caracterización molecular de las cepas aisladas de nattos comerciales.

Se procedió a realizar ensayos de biología molecular con el fin de identificar las cepas aisladas. En la tabla 5 se pueden observar las características de los ADN genómicos extraídos para cada cepa; mientras que, en la figura 10 se presentan datos sobre su integridad en un gel de agarosa al 1 %, incluidos datos para la cepa de *B. subtilis* 168 que se incluyó como control para esta parte del proyecto.

Tabla 5. Características de calidad del ADN genómico extraído de las cepas aisladas de nattos comerciales

Cepa	Concentración ng/ $\mu$ L	260/280	260/230
Jk	248.8	1.87	1.09
Sh	182.0	1.90	1.89
Az	51.6	1.94	0.95
Ok	121.9	1.89	1.93
168	250.2	1.82	1.87



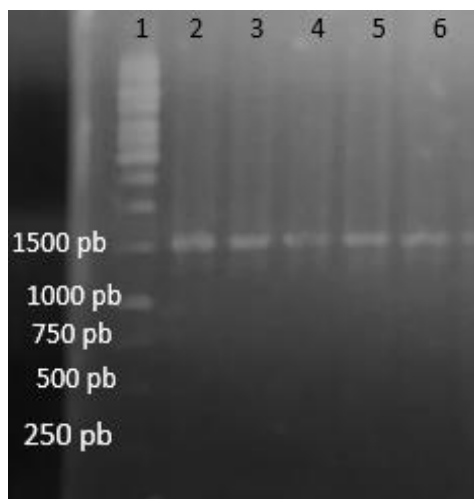
1MW: GeneRuler 1kb DNA Ladder.  
 2 ADN genómico cepa Jk  
 3 ADN genómico cepa Sh  
 4 ADN genómico cepa Az  
 5 ADN genómico cepa Ok  
 6 ADN genómico cepa 168

Figura 10. Gel de agarosa que muestra el ADN genómico extraído de las cepas aisladas de nattos comerciales.

A partir del material genético de cada cepa se amplificó el gen ribosomal 16s, con el fin de confirmar de manera definitiva la identidad de las cepas aisladas, para lo cual se siguió la metodología previamente descrita. Después de purificarse, el ADN extraído se cuantificó en un nanodrop y se verificó su integridad en un gel de agarosa, para asegurar tanto la presencia de un solo amplicón, así como su tamaño e integridad, con el fin de verificar que la calidad sea adecuada para aplicar la técnica de ARDRA. En la tabla 6 se presentan las características del ADN y en la Figura 11 el gel de agarosa correspondiente, elementos que confirman la calidad del gen ribosomal.

Tabla 6. Características del ADN del gen ribosomal 16s de las cepas aisladas del natto.

Cepa	[ADN] ng/uL	260/280	260/230
<b>Jk</b>	41.2	1.83	1.03
<b>Sh</b>	33.1	1.73	1.16
<b>Az</b>	17.1	1.85	0.75
<b>Ok</b>	34.9	1.78	1.02
<b>168</b>	44.0	1.76	0.83



- 1- Gene Ruler 1kb DNA Ladder
- 2- 16s cepa Jk
- 3- 16s cepa Sh
- 4-16s cepa Az
- 5- 16S cepa OK
- 6- 16s cepa 168

Figura 11. Gen ribosomal 16s en un gel de agarosa al 1 %, amplificado del ADN extraído de cada cepa aislada del natto

Después de haber verificado la calidad del amplicón del gen ribosomal, se procedió a analizar el ARDRA, con el fin de caracterizar la región 16s y tener un primer elemento, para la caracterización molecular de identificación de las cepas aisladas de los productos comerciales de natto. En la figura 12 se puede observar el material genético digerido en un gel de agarosa al 2.5%. Como se constata claramente en la figura, tanto las 4 cepas aisladas, como la cepa de referencia tienen el mismo patrón de digestión. Lo que implica la similitud y cercanía entre las cepas. No obstante, se requiere de ensayos más específicos para definir con exactitud la identidad de cada microorganismo aislado, a nivel de cepa.

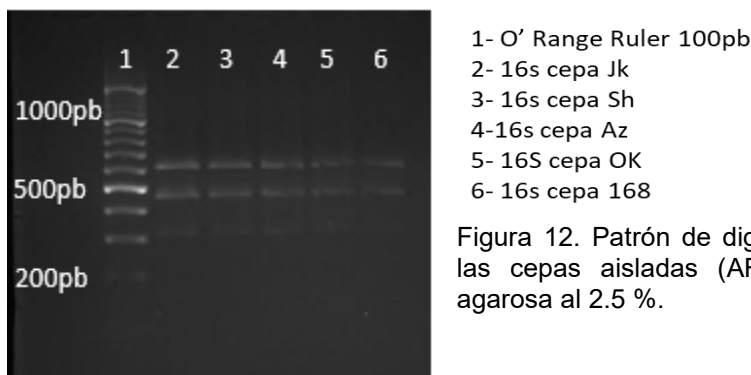


Figura 12. Patrón de digestión del gen ribosomal 16s de las cepas aisladas (ARDRA) observado en geles de agarosa al 2.5 %.

Paralelamente, se secuenciaron los genes del 16s, con su alineamiento y comparación con la base de datos BLAST, se obtuvieron las conclusiones que se muestran en la tabla 7, donde se puede constatar que las 4 cepas corresponden a *Bacillus subtilis*, confirmando el resultado preliminar obtenido por el ARDRA. Ante este panorama la elección de una de las cepas (enzimas) representa un reto dada su similitud, ya que todas las cepas aisladas del natto comercial corresponden a la especie *B. subtilis*. Por otro lado, todas demostraron ser capaces de producir levana de bajo peso molecular, cuando fueron empleadas en el sobrenadante como medio de reacción, mientras que en el natto dan lugar a levana con una distribución bimodal de pesos moleculares.

Tabla 7. Similitud de las cepas aisladas del natto comercial con diversas cepas de *B. subtilis* al ser analizarlas mediante un alineamiento tipo BLAST.

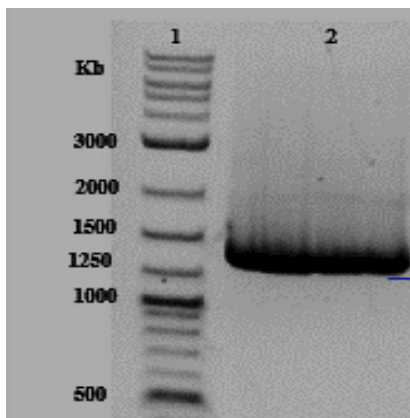
Cepa	Alineamiento	Identidad
Jk	<i>B. subtilis strain KCH</i>	99.7%
Sh	<i>B. subtilis strain GAU8-1</i>	98.07%
Az	<i>B. subtilis strain L4</i>	97.48%
Ok	<i>B. Subtilis strain CG-6</i>	99.3%

Otros elementos para considerar son los reportados en la Tabla 4, se observan las características de las cepas aisladas; también se debe tomar en cuenta que la cepa Mt dejó de crecer en la caja petri, además de dar lugar a cultivos con baja actividad levansacarasa en el sobrenadante, por lo que se eliminó como opción. Por otro lado, la cepa Jk dio lugar a una alta concentración de levana en el sobrenadante, esto a pesar de la baja actividad producida. Dado que una opción buscada es sintetizar primeramente la enzima y posteriormente controlar la síntesis de la levana, no es ideal iniciar la producción con levana en el medio. Lo anterior nos deja las cepas Sh, Az y Ok como opción a estudiar en este proyecto. De las tres, la cepa Ok es la que menos enzima produce a las 6 h en cultivo, en comparación con las cepas Sh y la Az observada mediante la actividad levansacarasa del sobrenadante. En ese mismo sentido, cuando la cepa Ok crece en placa se forman las colonias más grandes y viscosas (observable en la placa) paralelamente, cuando crece en medio líquido, da lugar a un polímero que no es degradado por Fructozyme. Lo anterior hace pensar que la cepa tiene mayor habilidad que las otras para producir ácido poliglutámico. Finalmente, las dos cepas restantes, Sh y Az, si bien dan lugar a resultados similares en cuanto a la enzima producida (actividad alcanzada a las 6h), levana sintetizada durante el cultivo en el sobrenadante, y el hecho de que ambas son de fácil manejo (los cultivos son reproducibles), en términos de crecimiento celular y de actividad alcanzada, la cepa Az tiene mejores resultados (productividad de enzima). Por todo lo

descrito, y reconociendo que se trata de cepas de comportamiento similar se decidió; continuar las etapas siguientes del proyecto con la cepa de *B. subtilis* Az.

### 10.7 Aislamiento y análisis de la secuencia que codifica para la levansacarasa de *B. subtilis* Az.

Para analizar la secuencia de la levansacarasa de la cepa Az se procedió a clonar el gen para su secuenciación, en la figura 13 se observa el producto de PCR, correspondiente a la levansacarasa con un tamaño de 1275pb en un gel de agarosa al 1 %. Consecuentemente en el anexo 2 se muestra la secuencia de nucleótidos de la levansacarasa de *B. subtilis* Az, así como el alineamiento de aminoácidos entre la levansacarasa de las cepas Az y 168 de *B. subtilis*.



- 1.- Generuler 1kb DNA ladder
- 2.- Levansacarasa cepa Az  
amplificada sin péptido señal.

Figura 13. Gel de agarosa al 1% con el gen amplificado de la levansacarasa de la cepa Az de *B. subtilis*.

Es importante resaltar que en el alineamiento de aminoácidos mostrado en el anexo 2 Figura 26, la única diferencia reside en 1 sólo aminoácido entre las levansacarosas de las cepas Az y 168 de *B. subtilis*. Paralelamente en la figura 14 se muestra la ubicación de dicho residuo, encontrándose en la posición 70, mientras que en SacB de la cepa 168 es una serina; en SacB de la cepa Az se encuentra una prolina. Dicho cambio es en la superficie de la enzima por lo que no debería afectar su especificidad de reacción, debido a que se encuentra lejos del sitio catalítico, no obstante, no hay reportes acerca del efecto que podría tener el cambio de este aminoácido, por lo que se requiere purificarla y caracterizarla

bioquímicamente para conocer si existe un cambio asociado al cambio del aminoácido. Cabe resaltar que los aminoácidos que han sido estudiados cercanos a este residuo son: el aspartato 86 que pertenece al sitio catalítico, y el aspartato 83 que al mutarse reduce drásticamente la estabilidad de la enzima, por otro lado, la mutación del residuo triptófano 61 puede propiciar una mayor actividad de transfructosilación (Ortiz-Soto et al., 2019). Adicionalmente es que este residuo no forma parte de los subsitios propuestos donde se especula que puede ocurrir una interacción proteína-proteína, fenómeno que podría ser el responsable de la síntesis de distribución bimodal de levanas, por lo que resulta imperativo caracterizar bioquímicamente la levansacarasa de *B. subtilis natto*.

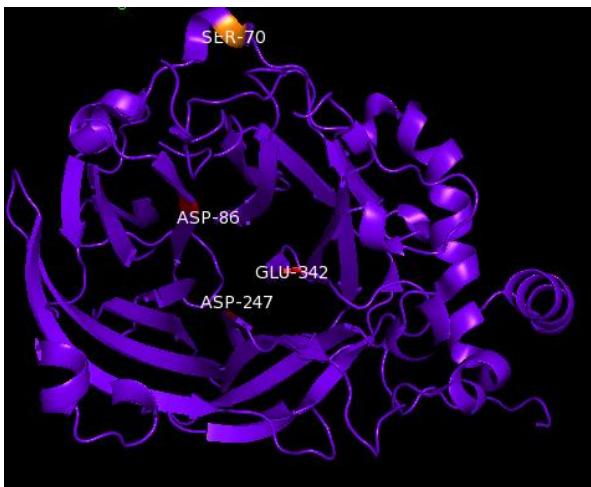


Figura 14. PDB de Estructura de SacB de *B. subtilis* 168 visualizada en pymol, se muestra el sitio catalítico en rojo y el aminoácido de la posición 70, correspondiente a una serina en la superficie de la proteína.

## 10.8 Análisis y estandarización del cultivo de *B. subtilis natto* para la producción sistemática de la levansacarasa.

Para buscar la producción sistemática y eficiente de la levansacarasa de *B. subtilis* Az, es necesario analizar el procedimiento ya utilizado de crecimiento a partir de placa, de acuerdo con el apartado 3.4, se parte de una colonia madura donde coexisten diferentes estadios celulares, por lo que se decidió sistematizar el inicio del cultivo, partiendo siempre de esporas. Para este fin, se producen esporas y se almacenan en gliceroles para posteriormente -con estas esporas- Iniciar el preinóculo. Al llevar a cabo la fermentación con esporas, cuando se compararon con cultivos que parten de colonias en la caja, los primeros tuvieron



mayor reproducibilidad y se obtuvo una mayor actividad levansacarasa en el cultivo, lo que está estrechamente relacionado con el estado fisiológico del microorganismo. Estos resultados confirman que la diferenciación celular durante el cultivo es sumamente importante; en la producción y estabilización de la levansacarasa.

Se encontró que cuando se inocula un cultivo con un inóculo de 7 h, la DO del preinóculo es crucial ya que si se encuentra por debajo de 5 (1.75 g/L células) la actividad del cultivo posterior se ve afectada. Tal es el caso de una fermentación llevada a cabo con un preinóculo cuya densidad celular era de 4.6, y que, a las 6 h de cultivo (equivalente a 2.5 g/L de células), apenas alcanzó una fracción de la actividad de interés observada anteriormente en matraz, es decir en la fase exponencial sin llegar al inicio de la fase estacionaria. Tal es el caso de otros cultivos que cuando la DO del preinóculo es superior a 6, aunque el cultivo crece la actividad alcanzada es también una fracción de la observada en condiciones óptimas. Por esta razón, se definió que el rango de densidad óptica del preinóculo no debe ser ni superior a 5.6 ni inferior de 5.3; donde se encuentra el estado fisiológico adecuado de los bacilos para producir la levansacarasa (Figura 15).

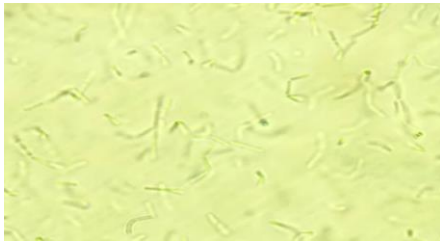


Figura 15. Imagen de un cultivo al microscopio de *B. subtilis* cepa Az a una DO de 5.3

Se realizaron cultivos con las especificaciones ya mencionadas, que presentaron un comportamiento cinético como el que se describe en la figura 16. De esta figura destaca principalmente que el pH del cultivo se mantiene constante en un valor donde la levansacarasa es estable, ya que siempre es ligeramente mayor a 6 durante las 8 h de fermentación. Se observa también un crecimiento exponencial de 4 a 7 horas, enseguida se inicia una fase de desaceleración, que es el momento en el que *B. subtilis* inicia la diferenciación celular y la producción de diferentes metabolitos. Se trata de una condición en donde, la célula detecta una densidad celular suficiente mediante la

secreción de los metabolitos y el quorum sensing para llevar a cabo la formación de la colonia (Kalamara et al., 2018). Este proceso se muestra en la figura 18, siendo importante señalar que, a las 4 h, las células de *B. subtilis* se observan al microscopio como bacilos largos, mismos que se reducen en tamaño más tarde en el cultivo.

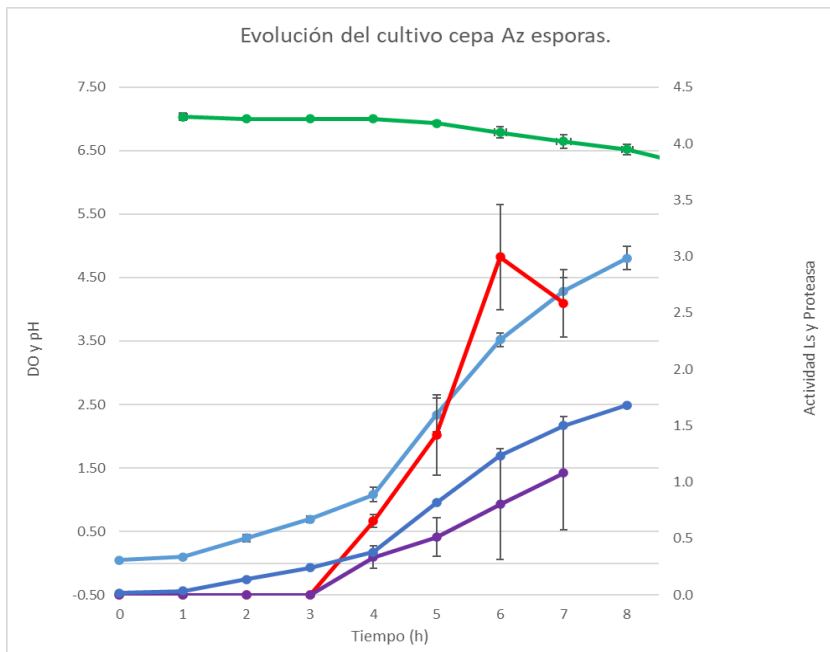
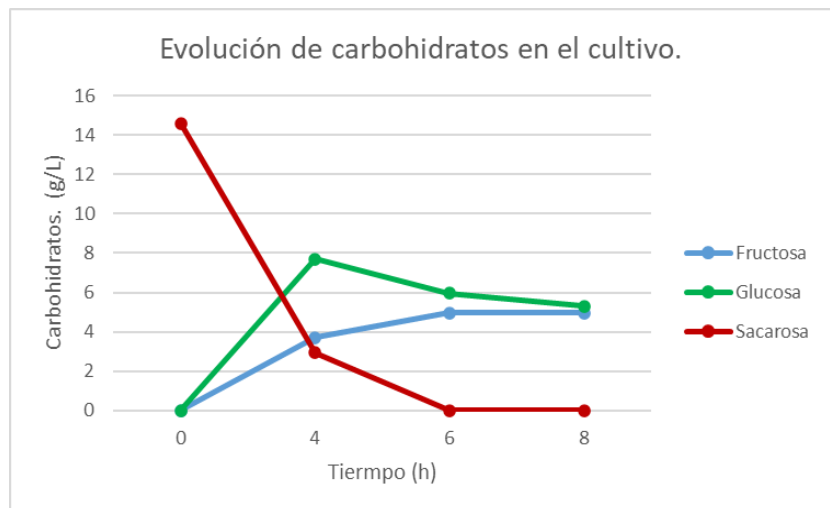


Figura 16. Cinética de un cultivo con la cepa Az partiendo de un preinóculo que fue sembrado con esporas. El cultivo se realizó en medio Lm en 100 mL a 28 °C con 200 rpm. Se muestra la evolución de la DO a 600 nm (línea azul); el pH (línea verde); la actividad en sobrenadante de la levansacarasa (línea roja) y la proteasa medida sobre caseína (línea morada) concentración celular g/L (línea azul oscuro).

Figura 17. Evolución de los carbohidratos en un cultivo de la cepa Az; se muestra sacarosa (línea roja) glucosa (línea verde) y fructosa (línea azul)



Así mismo, se siguió la actividad levansacarasa y la actividad proteasa en el cultivo: la primera se detecta a partir de las 4 h teniendo su máximo a las 6 h y

disminuyendo a partir de las 7 h, mientras que la síntesis de proteasas (cuantificación de actividad proteolítica) tiene el mismo perfil y es la principal causante de la caída de actividad levansacarasa, debido a su considerable aumento a las 7 h de cultivo. Así mismo a ese tiempo se ha consumido ya el total de la sacarosa -como se muestra en la figura 18- por lo que se detiene la síntesis tanto de levana como de levansacarasa, ya que, como se señaló, la sacarosa es el inductor de la enzima. La actividad levansacarasa depende de la concentración inicial de sacarosa en el cultivo, como se demuestra en experimentos que se presentan en el anexo 3, en los que se observa cómo a mayor concentración de sacarosa se obtiene mayor actividad. Sin embargo, como el interés se centra en la producción de la enzima, al aumentar la sacarosa se da una síntesis contaminante de levana así como el consecuente aumento de viscosidad. Estos resultados, que se ilustran también en la tabla 8, lo que nos llevaron a la decisión de fijar la concentración inicial de sacarosa en 10 %, minimizando así la presencia de levana en el sobrenadante, ya que, es indeseable para la última etapa del proceso que es la síntesis de levana de bajo peso molecular.

Finalmente, en un seguimiento del cultivo bajo el microscopio, destaca el que en un inicio se observan bacilos largos como consecuencia de una alta concentración de sales, que da lugar a un estrés osmótico. Lo anterior es un factor que induce dos situaciones; como ya se mencionó en los antecedentes, la levansacarasa se expresa cuando DegU-P alcanza determinado nivel, en presencia de sacarosa; así, la enzima en presencia de sacarosa lleva a cabo la formación del biofilm. En un estudio sobre este factor, se reporta que, a una alta concentración de sales, lo que se traduce en estrés osmótico para el bacilo, se afecta la regulación del mecanismo responsable de la formación de flagelo para *B. subtilis* y por otro lado, propicia la transcripción de los genes responsables de la síntesis de la levansacarasa, no obstante esta condición también reduce la expresión y síntesis de proteasas (tanto la levansacarasa como las proteasas son expresadas por la misma subpoblación de células de bacilos, pero en tiempos diferentes de cultivo) (Kunst & Rapoport, 1995).

Los bacilos cambian su morfología durante el cultivo (figura 18), al inicio del cultivo predomina la población vegetativa que se identifica como bacilos largos; después de 4h se observa la aparición de una población diferenciada (bacilos más cortos) (Tasaki et al., 2017). Hasta ese momento no se observan esporas, por lo que se puede tener una mayor homogeneidad en las poblaciones, es decir, al no haber esporas ni bacilos diferenciados (pequeños) al inicio, solo existe la población vegetativa, misma que comienza a desaparecer después de las 4 h de cultivo y da paso a poblaciones diferenciadas, donde comienzan a aparecer las que forman polímero y las que producen surfactinas principalmente (Oslizlo et al., 2014), lo que se traduce en un mejor control del sistema. Finalmente, al transcurrir el tiempo se observa una mayor heterogeneidad de poblaciones, encontrándose las que producen otros metabolitos como proteasas y también las que darán lugar a esporas, todo lo anterior refleja la complejidad del sistema al iniciar la diferenciación celular de *B. subtilis*.



Figura 18. Evolución morfológica de los bacilos durante un cultivo de *B. subtilis* Az en medio Lm a 28 °C y 200 rpm

Se realizó un gel SDS-page al 15 % para monitorear tanto la presencia de la levansacarasa en el sobrenadante, así como su proteólisis durante el cultivo. Se especula que la proteólisis es causa de la pérdida de actividad de LS (como se puede observar en la Figura 16). En este caso en la figura 19 se muestra que la banda que corresponde a la enzima aparece a las 4 h de cultivo y tiene una mayor intensidad entre las 5 y las 6 h. Cabe resaltar que, a partir de la 7<sup>a</sup> hora, la señal empieza a desaparecer como consecuencia de su degradación debida a la actividad proteolítica en el cultivo, como ya se comentó, inherente al metabolismo de *B. subtilis*. Se ha reportado que DegU es el regulador responsable de expresar

las “enzimas degradativas”, entre las que se encuentran la bacilopeptidasa y la subtilisina, no obstante, para que se expresen también, se ha reportado que se requiere cierto nivel del regulador Spo0A que es el responsable de la esporulación, cuando se encuentra en niveles altos de fosforilación (Veening et al., 2008). Con lo anterior se explica por qué la producción de las proteasas en el sistema es un paso diferencial en el ciclo de vida del bacilo, no obstante, en la colonia en placa las poblaciones están espacialmente separadas por la conformación de esta, pero en el cultivo líquido la agitación permite que ambos fenómenos coexistan por lo que no es de extrañar que la degradación de la levansacarasa se lleve a cabo.

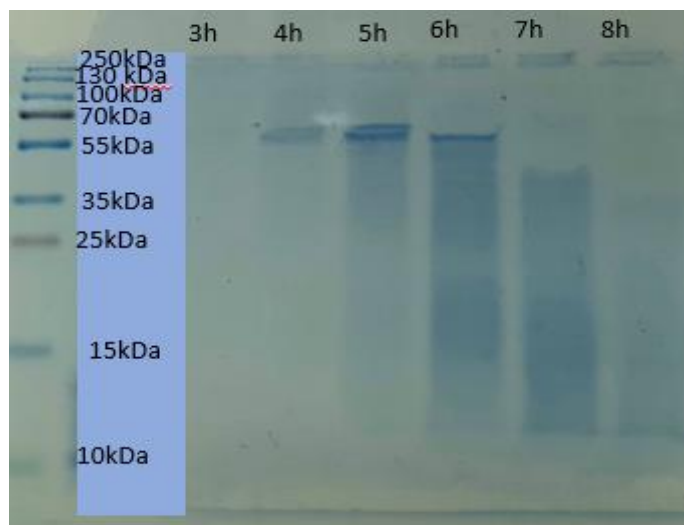


Figura 19. Detección de la síntesis de la levansacarasa en el sobrenadante del cultivo de la cepa *B. subtilis* Az en un gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. Se observa la banda (55kDa), que corresponde a la proteína de interés en las muestras a partir de las 5h presenta una degradación proteolítica.

Simultáneamente, al analizar por GPC el sobrenadante del cultivo para monitorear la formación de levana durante el mismo, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 20A, donde se observa la aparición de un polímero de alto y de bajo peso molecular. Cabe mencionar que el polímero de alto peso molecular solo aparece después de las 7 h de cultivo, y va aumentando en los tiempos subsecuentes mientras el de bajo peso molecular aparece desde las 3h de cultivo. Entonces para corroborar la naturaleza de los polímeros, se decidió tratar la muestra con Fructozyme, resultado que se muestra en el cromatograma

de la figura 20B. Se señala que la levadura del producto solo degrada los polímeros cuya señal pertenecen a la zona de bajo peso molecular, mientras que los polímeros de alto peso molecular no sufren efecto alguno, lo que se traduce a que solo se tiene síntesis de levana de bajo peso molecular en el cultivo, se destaca que en la figura 7 no se observa la señal correspondiente al polímero de alto peso molecular, esto es debido a que esa señal aparece después de las 6 h de cultivo y corresponde al GPA.

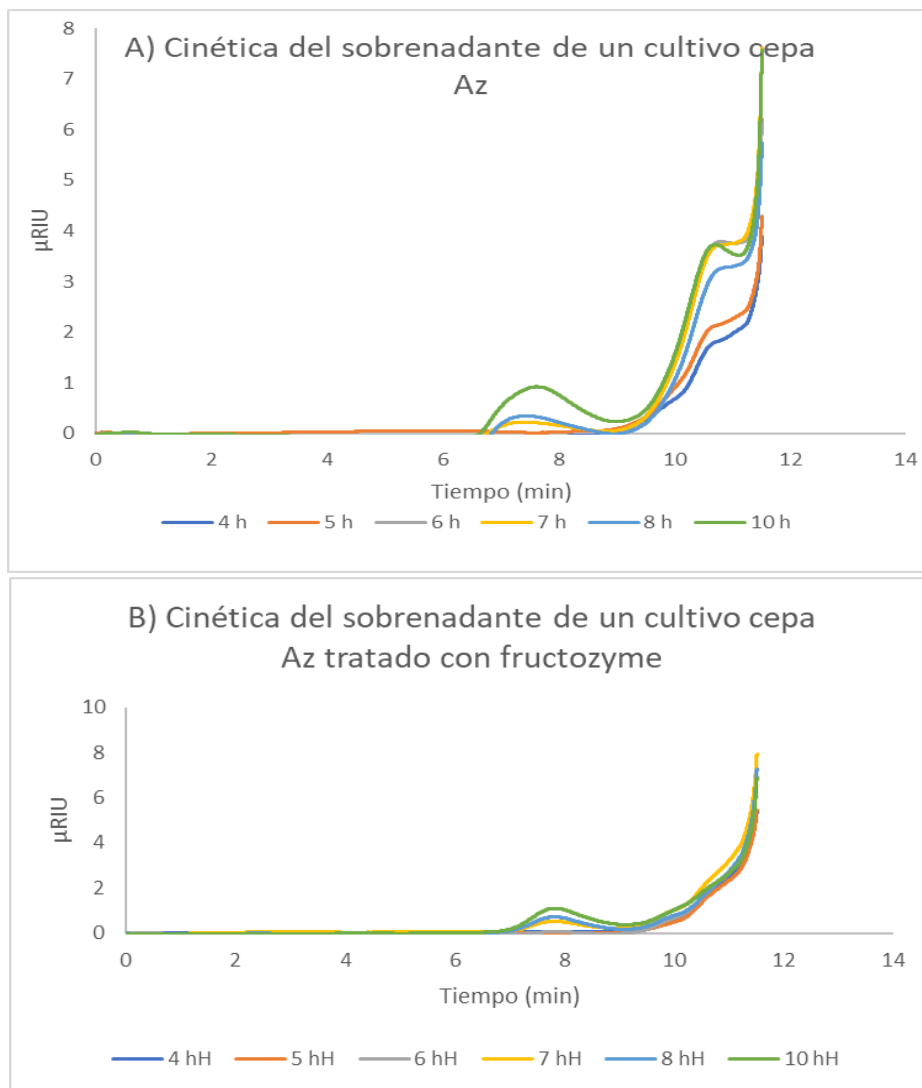


Figura 20. Evolución de los polímeros producidos durante el cultivo de *B. subtilis* cepa Az analizados por GPC. A) muestra el sobrenadante durante el cultivo. B) muestra los polímeros después de tratarlos con fructozyme.

Así mismo, es de suponer que el polímero de alto peso molecular que no se degrada, que también se observó en la extracción de polímeros solubles del natto, corresponde al PGA. Otro argumento importante es que la reología del medio es afectada después de las 7 h pues el PGA es el responsable de una alta

viscosidad, como se mencionó en los antecedentes, así como el hecho de que su síntesis empieza al inicio de la fase estacionaria. Sin embargo, es necesario confirmar química o enzimáticamente la identidad de este producto.

### **10.9 Purificación e identificación de la levansacarasa de *B. subtilis natto*.**

Se decidió utilizar el sobrenadante de 5 h de cultivo, teniendo en cuenta que aún no hay presencia del segundo polímero (PGA). Añadiendo que a este tiempo se cuenta con una buena actividad levansacarasa y la actividad proteolítica es incipiente, como se demostró en el gel de poliacrilamida, en el que se aprecia una banda de buena intensidad correspondiente a la levansacarasa, sin el nivel de degradación que se observa posteriormente en el cultivo. Se realizó la purificación de la enzima por intercambio catiónico. La enzima purificada se analizó en gel de poliacrilamida, mismo que se presenta en la Figura 21, donde se incluyó también como control SacB, la levansacarasa de la cepa *B.subtilis 168*. Dentro de las fracciones recolectadas de la purificación, la levansacarasa de la cepa Az se encontró en la fracción 9, mientras que en el gel de poliacrilamida la enzima se muestra sin presencia de otras bandas, por lo que se puede concluir que está suficientemente pura para su caracterización. Sin embargo, el rendimiento de producción como el de purificación resultaron ser muy bajos (menor al 10%) y no óptimos para su caracterización ya que las mismas proteasas interfieren en el proceso. Este fenómeno es consecuencia directa tanto de la poca producción de enzima, así como de la actividad proteolítica en el cultivo que causa su degradación. Por todo lo anterior para una caracterización formal se propuso la expresión recombinante, la cual, no será incluida en esta tesis.

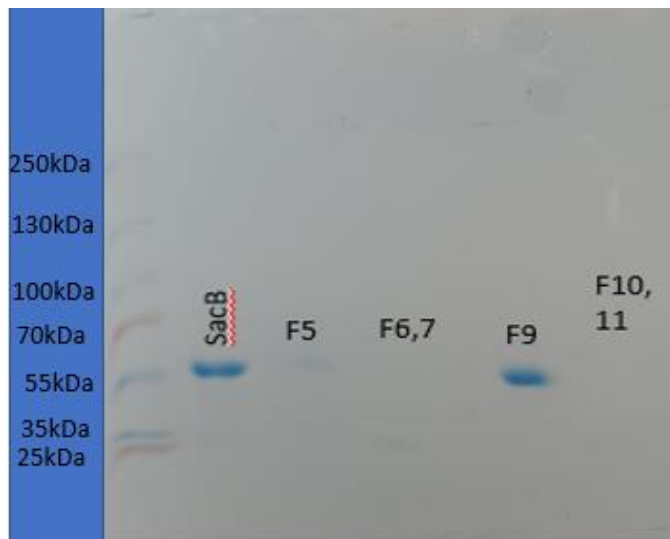


Figura 21. Gel SDS-page al 10% con las fracciones recolectadas que tuvieron actividad DNS, pertenecientes a la purificación de la levansacarasa de la cepa *B. subtilis* Az obtenida del sobrenadante del cultivo.

Con la enzima purificada se realizó un zimograma en SDS-page al 10 %, mismo que se presenta la figura 22, como referencia se utilizó la sacB de la cepa de *B.subtilis* 168. Se observa que ambas enzimas tienen el mismo peso molecular, así mismo al revelarse con los reactivos descritos en la metodología, muestran la característica acumulación de polímero, lo que es otra prueba sobre su identidad.

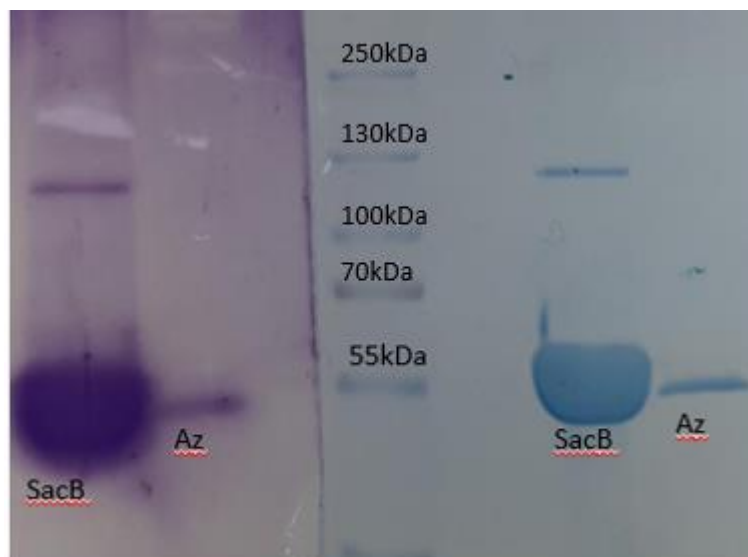


Figura 22. Zimograma de la levansacarasa purificada de la cepa *B. subtilis* Az. Se utilizó como control positivo a la levansacarasa sacB de la cepa *B. subtilis* 168. Del lado izquierdo se muestra el gel teñido con azul de Coomassie y del derecho el revelado con el reactivo de Schiff, previa incubación con sacarosa.

Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de síntesis de levana con la enzima pura, con el fin de observar si la levansacarasa de la cepa Az de *B. subtilis* tiene la capacidad de síntesis de polímero con una distribución bimodal, es decir,



si dicha levansacarasa tiene la especificidad de producir levana de alto y bajo peso molecular. Para dicho fin se preparó una reacción con 0.7 U/mL de la enzima pura utilizando 100 g/L de sacarosa en buffer de acetatos (50 mM a pH 6) y se detuvo hasta el consumo total de la sacarosa. El polímero obtenido se analizó por GPC y el cromatograma de dicho análisis se muestra en la figura 23, en la que se puede constatar que la levansacarasa de la cepa Az es capaz de producir levana de bajo y de alto peso molecular, tal como sucede con la levansacarasa recombinante de la cepa 168. Por lo anterior, podemos concluir que son las condiciones en las que se realizan los experimentos, específicamente los componentes del medio de cultivo son los responsables, que la levansacarasa proveniente de la cepa Az exclusivamente sintetice levana de bajo peso molecular, como se muestra en los experimentos de las figuras 7 y 20. Se ha demostrado que para SacB la alta fuerza iónica es un parámetro que propicia dicho efecto. Se sabe que *B. subtilis natto* tiene la secuencia en un gen que codifica para una levansacarasa, ubicado en el mismo operón que la levansacarasa, lo que es otro factor para tomar en cuenta cuando se utiliza el sobrenadante para producir levana, no obstante, esta actividad en el sobrenadante actuaría sobre la levana dando lugar a fructooligosacáridos y fructosa (Jensen et al., 2016).

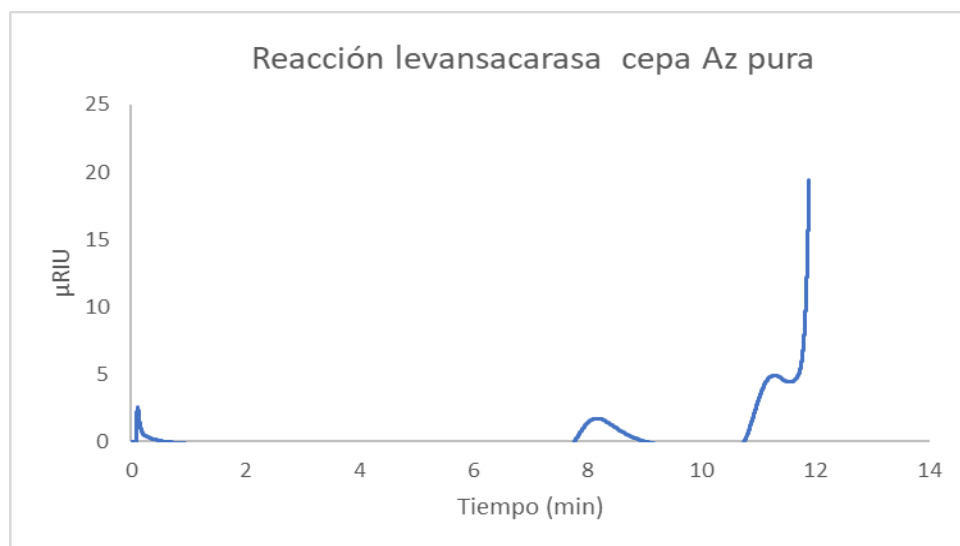


Figura 23. Cromatograma de una reacción con la levansacarasa de la cepa Az purificada con 0.7 U/mL mostrando un comportamiento bimodal.

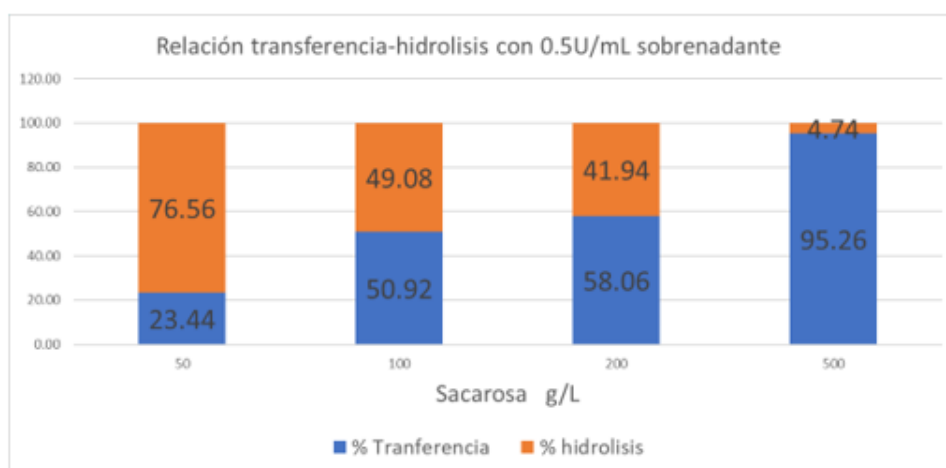
## 10.10 Síntesis de levana a partir del sobrenadante del cultivo.

Con los resultados anteriores, tomando en cuenta que solo se ha visto levana de bajo peso molecular al usar la enzima de *B. subtilis* Az directamente del sobrenadante, aunado a la actividad proteasa importante a partir de las 6h y como consecuencia la disminución de la actividad levansacarasa, se decidió producir la enzima y detener el cultivo a las 5 h para la última parte de este proyecto. En seguida se realizaron diversas reacciones de síntesis de levana a partir de medios de reacción con 0.5 U/mL de actividad a diferentes concentraciones de sacarosa. Dichos resultados se presentan en la figura 24, en la cual se puede observar que, a mayor concentración de sacarosa la relación transferencia/hidrólisis aumenta, tal como se ha demostrado que pasa con la levansacarasa de *B. subtilis* 168 expresada recombinantemente. Por otro lado, los tiempos de reacción para conversiones mayores al 90% fueron dependientes de la concentración de sacarosa, así para 200 g/L, 100 g/L y 50 g/L (58 h, 19 h y 10 h respectivamente). Estos tiempos no son descritos por una ecuación de Michaelis-Menten simple debido a que no siguen un comportamiento michaeliano, suponiendo una  $K_m$  de 10.8 mM correspondiente a SacB de la cepa 168.

En el caso particular de la reacción con 500 g/L de sacarosa apenas se alcanza un 60 % de conversión a las 65 h, aunque la relación de transferencia se ve incrementada considerablemente con respecto a la reacción con 200 g/L. Lo anterior se ha descrito ampliamente con anterioridad y en gran medida se puede relacionar a la menor disponibilidad de agua, pero también a la mayor presencia de aceptores en el medio, siendo la sacarosa responsable de este fenómeno ya que puede funcionar como aceptor. Otro fenómeno observado en estos experimentos es que cuando la sacarosa se agota en la reacción, la concentración de levana en el medio va disminuyendo. Este fenómeno se ilustra claramente en el anexo 4, donde se muestra lo que sucede en una reacción con 1.2 U/mL de actividad con sacarosa al 10 % a 37°C analizada por GPC, en la que se observa que a partir de las 10 h la concentración de levana disminuye, siendo más notorio

a las 24 horas. Dicho fenómeno se observó también en las reacciones con 0.5 U/mL en las que la relación transferencia/hidrólisis a tiempos posteriores de los analizados, aumenta por la pérdida/hidrólisis de la levana. Lo cual se constata por el aumento de fructosa en el medio de reacción.

En conclusión, es importante detener la reacción cuando se acerque al final, para asegurar la integridad de las levanas. La pérdida de levanas podría estar directamente relacionada con la actividad levanasica inherente a la levansacarasa o a la presencia de levanasas sintetizadas por *B. subtilis* Az. Como se mencionó, en las cepas de *B. subtilis* existe una levansasa en el mismo operón de la levansacarasa; información que estará disponible una vez que el genoma sea secuenciado, y que ya no se incluirá en este trabajo.



Sacarosa inicial. g/L	% de conversión	Tiempo (h)
50	100	10
100	90	19
200	90	58
500	60	65

Figura 24. Síntesis de levanas a diferentes concentraciones de sacarosa utilizando la enzima levansacarasa de *B. subtilis* Az directamente del sobrenadante como medio de reacción.

Para finalizar, al analizar por GPC las levanas sintetizadas en el sobrenadante como medio de reacción proveedor de enzima, se confirmó la especificidad de la reacción correspondiente a lo que se ha observado a lo largo del proyecto,

independientemente de la concentración inicial de sacarosa utilizada, en la figura 25 se observa que en absolutamente todas las reacciones se produce levana de bajo peso molecular, sin que se note alguna señal en cuanto a levana de alto peso molecular; como la que sintetiza la enzima purificada reaccionando en buffer (Figura 23).

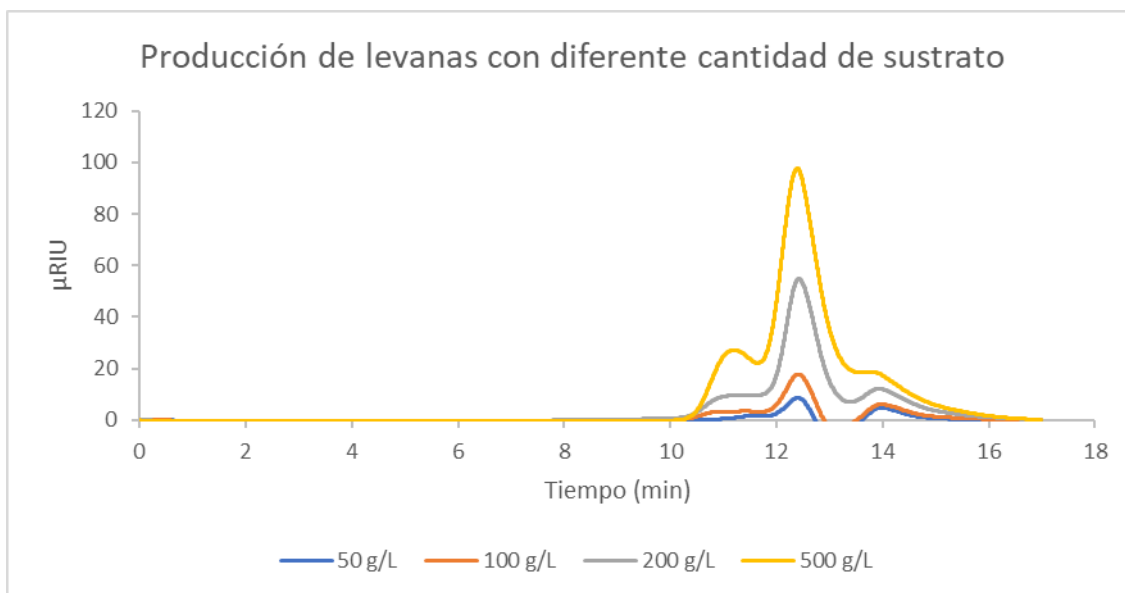


Figura 25. Cromatograma de GPC-HPLC que muestra el perfil de peso molecular de levanas sintetizadas a diferentes concentraciones de sacarosa a 37°C y 350rpm con enzima producida directamente en el medio de cultivo.

## 11 Conclusiones.

- En el *natto* existe tanto levana de alto como de bajo peso molecular.
- Se aislaron cinco cepas de cinco diferentes nattos comerciales, las cuales demostraron molecularmente pertenecían todas a la especie *B. subtilis*. Las 5 cepas producen levansacarasa que sintetizan levanas con el mismo perfil cromatográfico, cuando se realizan reacciones empleando la enzima directamente de los sobrenadantes de cultivo.
- Se seleccionó la cepa proveniente del *natto* definido como Az, empleando diversos criterios, entre otros su fácil manipulación y su capacidad para producir una actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo, comparable con la que se obtiene en cepas silvestres.
- El estado fisiológico del bacilo es crucial en el proceso de síntesis de la levansacarasa, y debe conocerse en detalle para optimizar la síntesis.
- La levana sintetizada empleando el sobrenadante del cultivo de la cepa Az es hidrolizada al final de la reacción, cuando la sacarosa ha sido consumida. Queda por determinar si esto es consecuencia de una actividad inherente a la propia enzima o bien, que el microorganismo produce también una levansacarasa que secreta al medio de cultivo.
- Hasta donde se analizó, la levansacarasa de la cepa Az se comporta como la levansacarasa SacB ya que, la levana sintetizada presenta un perfil bimodal de pesos moleculares al utilizar la enzima pura en condiciones estándar de reacción.

- Se logró definir una estrategia para sintetizar levana de bajo peso molecular, con un sistema que podría implementarse para producir un prebiótico “natural” directamente de la fermentación con *B. subtilis natto*.
- Las levansacarasas de las cepas Az y 168 de *B. subtilis* solo difieren en un aminoácido; en la posición 70 de la enzima que hasta el momento se desconoce su efecto en dicha proteína.

## 12 Perspectivas.

- Utilizar la metodología de las esporas en las otras cepas; con el fin de caracterizarlas de una manera más confiable en cuanto a actividad y el desarrollo del cultivo.
- Expresar heterológamente el gen de la levansacarasa de la cepa Az para estudiar las características de la enzima y compararla con SacB.
- Secuenciar los genes de la levansacarasa de las otras 3 cepas, con el fin de realizar un análisis a nivel de secuencia para conocer el grado de variabilidad entre ellas.

## 13 Anexos

### Anexo 1

#### Cepa Jk 16s

GTGCTRGCCTTCTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA  
GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTG  
TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAG  
CTAGTTGGTGAGGTAAYGGCTACCAAGGCRACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT  
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATYGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT  
ACCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT  
CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGG  
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT  
CTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA  
CTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATA  
GGACGTCCCCTTCGGGGGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG  
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC  
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACAG  
TGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT  
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  
AATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGG  
TAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGAACAAGWSC.

#### Cepa Sh 16s

CACAACGTGCTGTGGCTCTRCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGG  
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATG  
GTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGC  
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCRACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA



CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC  
AAGTACCGTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTT  
AAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAG  
AGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG  
ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA  
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGA  
GATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG  
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGA  
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC  
ACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCA  
GTTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG  
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTG  
AGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGAACATGTCA

### Cepa Az 16s.

GGGSGGTCTTACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG  
TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTT  
TGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT  
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG  
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAC  
CGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAG  
AGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC  
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  
CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC  
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGA  
CGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA  
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT  
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG

AGGAAGGTGGGGATGACGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGG  
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAAT  
ACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTAA  
CCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGGAGATAGACSC

Cepa Ok 16s.

GGGGGCTATACATGCGGGGGCTATACATGCGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA  
CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA  
CAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCRACGATGCGTAGCCGAC  
CTGAGAGGGTGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAG  
CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCA  
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA  
AGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAC  
TGGGGAACCTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA  
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA  
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTT  
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG  
ACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT  
GACATCCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC  
GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT  
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG  
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAG  
CCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT  
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTCACACCACGAGAG  
TTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTAACTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGG  
GTGAAGTCGAACAAGWCG

Anexo 2

Secuencia de nucleótidos del gen de la levansacarasa de *B. subtilis* Az.

TTCCCTCTAGAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGAAACGAACCAAAAGCCATA  
TAAGGAAACGTACGGCATTTCATATTACACGCCATGACATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAAATG  
AAAAATATCAAGTGCCTGAATTCGATCCGTCCACAATTAATAATATCTCTTCTGCAAAAGGCCTGGACGTTT  
GGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGATGGCACAGTCGAAACTATCACGGCTACCACATCGTCTTTGCA  
TTAGCCGGAGATCTAAAAATGCGGATGACACATCGATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAACTTCT  
ATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGCCGCTCTTTAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCCTA  
AAAGACCAAACGCAAGAATGGTCAGGTTTCAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTATACT  
GATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAACTGCAACTGCACAGGTTAACGTATCAGCATCAGACAG  
CTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTACGGCAAAACGTATCAAAATGT  
ACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTGAGAGATCTCACTACGTAG

AAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACACTGGAAGTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGA  
 ATCTTTATTTAACAAAGCATACTATGGCAAAGCACATCGTTCCTCCGTCAGAAAAGTCAAAAACCTTCTGCAA  
 AGCGATAAAAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCGCCCTCGGCATGATTGAGCTAAACGATGACTACA  
 CACTGAAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAAATTGAACGCGCGAACGTC  
 TTTAAAATGAACGGCAAATGGTACCTGTTCACTGACTCCCGCGATCAAAAATGACGATTGACGGCATTAC  
 GTCTAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTTTCTAATTCTTAACTGGCCATACAAGCCGCTGAACAAAAC  
 GGCTTGTGTTAAAAATGGATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAG  
 CGAAAGGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAACAGAGGGTTCTACGCAGACAAACAATCAACG  
 TTTGCGCCAAGCTTCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAA  
 GGACAATTAACAGtTAACAAAACCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG

Secuencia de aminoácidos levansacarasa cepa Az.

KETNQKPYKETYGISHITRHDMQLIPEQQKNEKYQVPEFDPSTIKNISSAKGLDVWDSWP  
 LQNADGTVANYHGYHIVFALAGDPKNADDTSIYMFYQKVGETSIDSWKNAGRVPFKDSK  
 FDANDSILKDQTQEWSSGATFTSDGKIRLFYTDGSGKHGKQTLTTAQVNVASDSSLNI  
 NGVEDYKSIFDGDGKTYQNVQQFIDEGNYSSGDNHTLRDPHYVEDKGHKYLVEANTGT  
 EDGYQGEESLFNKAYYGKSTSFRRQESQKLLQSDKRTAELANGALGMIELNDDYTLKK  
 VMKPLIASNTVTDEIERANVFKMNGKWYLF TDSRGSKMTIDGITSNDIYMLGYVSNL TGP  
 YKPLNKTGLVLKMDLDPNDVFTYSHFAVPQAKGNNVVITSYMTNRGFYADKQSTFAPSF  
 LLNIKGKKT SVKDSILEQGQLTVNK

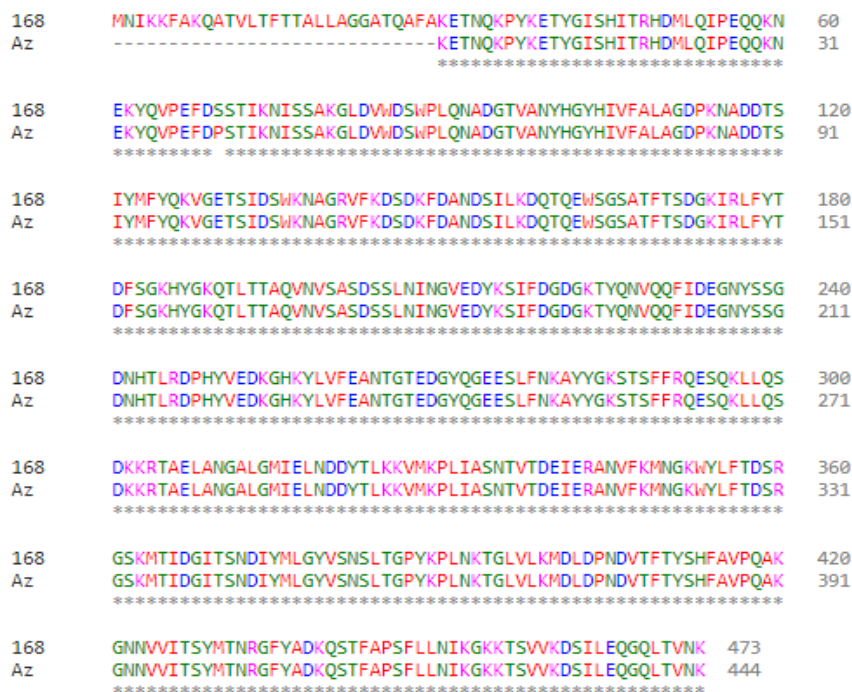


Figura 26. Alineamiento de aminoácidos de las levansacarosas pertenecientes a las cepas 168 y Az de *B. subtilis*.

### Anexo 3

Tabla 8. Efecto de la concentración de sacarosa en la actividad enzimática del sobrenadante para cultivos de la cepa Ok de *B. subtilis natto* a las 6h.

Sac g/L	DO	pH	Sobrenadante U/mL	Sacarosa residual g/L	Levana sobrenadante g/L
5	4.81 ± 0.62	6.69 ± 0.1	0.43 ± 0.13	0	0.30 ± 0.07
10	5.25 ± 0.63	6.69 ± 0.1	1.03 ± 0.13	0	0.38 ± 0.09
15	4.35 ± 0.35	6.65 ± 0.1	2.36 ± 0.41	0	0.54 ± 0.15
20	4.52 ± 1.46	6.64 ± 0.1	2.47 ± 0.46	0	0.60 ± 0.10

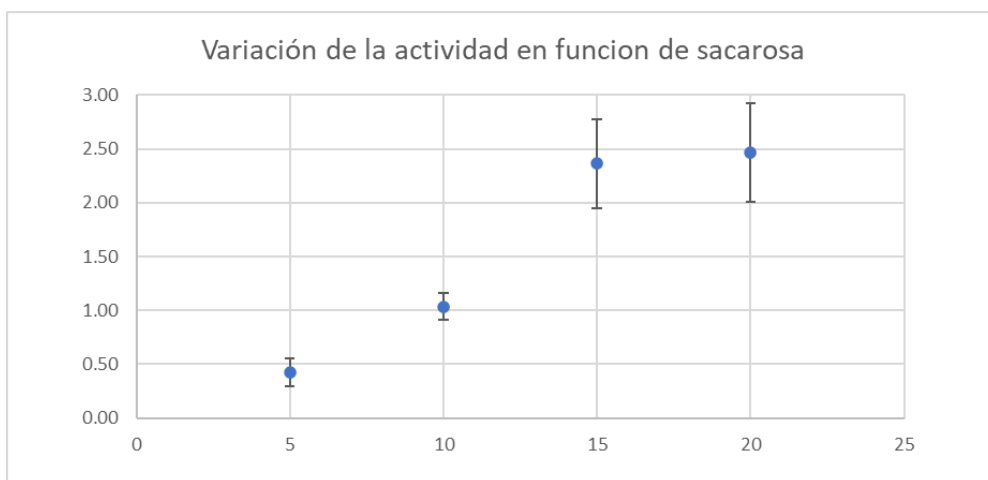


Figura 27. Relación de la actividad levansacarasa en el sobrenadante en función de la concentración de sacarosa en el cultivo

## Anexo 4

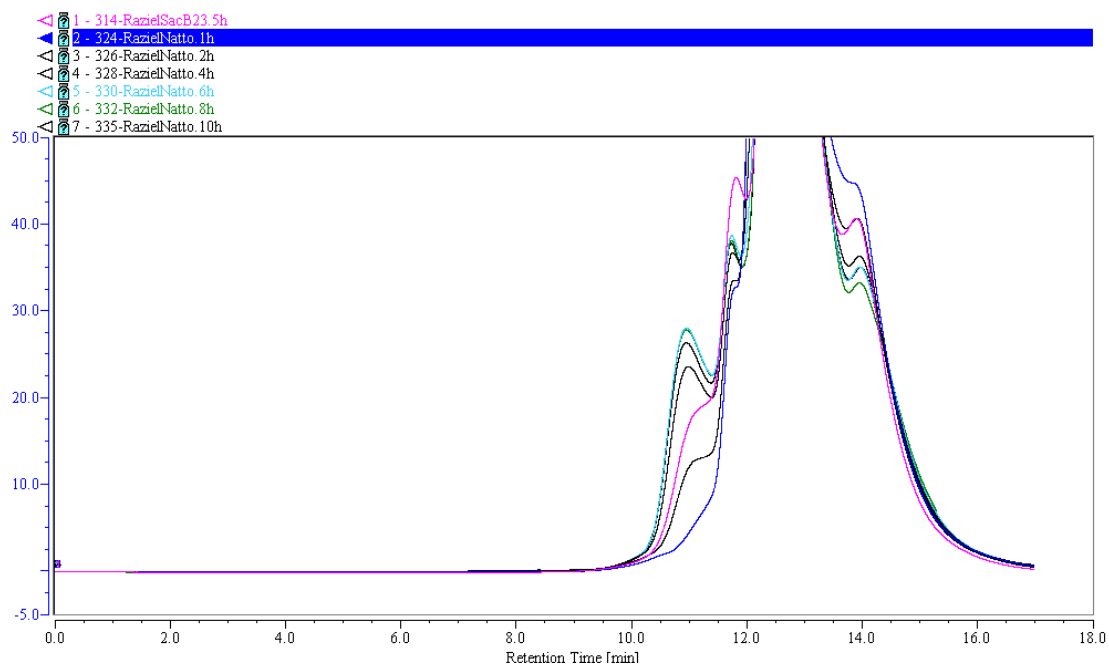


Figura 28. Cromatogramas en GPC que muestran la variación de la síntesis de levana empleando la enzima levansacarasa en el sobrenadante del cultivo de *B. subtilis* cepa Az. Se muestra el perfil de levana al tiempo 1, 2, 4 y 10h en color negro, cian para las 6h, verde para las 8h y fucsia para 23.5h (condiciones de reacción: 1.5 U/mL, 10% de sacarosa a 37°C).

## 14 Bibliografía.

- Abel-Santos, E. (2014). Endospores, Sporulation and Germination. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vols. 1–3). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00009-3>
- Afzaal, M., Saeed, F., Islam, F., Ateeq, H., Asghar, A., Shah, Y. A., Ofoedu, C. E., & Chacha, J. S. (2022). Nutritional Health Perspective of Natto: A Critical Review. *Biochemistry Research International*, 2022.  
<https://doi.org/10.1155/2022/5863887>
- Amati, G., Bisicchia, P., & Galizzi, A. (2004). DegU-P represses expression of the motility fla-che operon in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 186(18), 6003–6014. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6003-6014.2004>
- Ávila-Fernández, Á., Montiel, S., Rodríguez-Alegría, M. E., Caspeta, L., & López Munguía, A. (2023). Simultaneous enzyme production, Levan-type FOS synthesis and sugar by-products elimination using a recombinant *Pichia pastoris* strain expressing a levansucrase-endolevanase fusion enzyme. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02009-7>
- Ávila-Fernández, Á., Olvera-Carranza, C., Rudiño-Piñera, E., Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J., & López-Munguía, A. (2007). Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Science*, 173(4), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.07.009>
- Bajaj, I., & Singhal, R. (2011). Poly (glutamic acid) - An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*, 102(10), 5551–5561.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.047>
- Bersaneti, G. T., Pan, N. C., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2018). Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with Potential Application in the Food Industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(3), 838–851.

<https://doi.org/10.1007/s12010-017-2587-0>

- Birrer, G. A., Cromwick, A. M., & Gross, R. A. (1994).  $\gamma$ -Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, *16*(5), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90032-9)
- Bottaro, Larsen, B. (2008). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>.Ecology
- Cairns, L. S., Hopley, L., & Stanley-Wall, N. R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular Microbiology*, *93*(4), 587–598. <https://doi.org/10.1111/mmi.12697>
- Davidson, F. A., Seon-Yi, C., & Stanley-Wall, N. R. (2012). Selective heterogeneity in exoprotease production by *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, *7*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038574>
- Dos Santos, L. F., Bazani Cabral De Melo, F. C., Martins Paiva, W. J., Borsato, D., Corradi Custódio Da Silva, M. D. L., & Colabone Celligoi, M. A. P. (2013). Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* NATTO. *Romanian Biotechnological Letters*, *18*(4), 8413–8422.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Hoch, J. A., & Silhavy, T. J. (1995). *Two-Component Signal Transduction*. 447–471.
- Jensen, S. L., Diemer, M. B., Lundmark, M., Larsen, F. H., Blennow, A., Mogensen, H. K., & Nielsen, T. H. (2016). International Journal of Biological Macromolecules Levanase from *Bacillus subtilis* hydrolyses  $\alpha$ -2, 6 fructosyl bonds in bacterial levans and in grass fructans. *International Journal of*

*Biological Macromolecules*, 85, 514–521.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.008>

Kalamara, M., Spacapan, M., Mandic-Mulec, I., & Stanley-Wall, N. R. (2018). Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. *Molecular Microbiology*, 110(6), 863–878.

<https://doi.org/10.1111/mmi.14127>

Kambourova, M., Tangney, M., & Priest, F. G. (2001). Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 1004–1007.

<https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.1004-1007.2001>

Kimura, A., Kuwazawa, S., Wada, Y., Kyutoku, Y., Okamoto, M., Yamaguchi, Y., Masuda, T., & Dan, I. (2011). Conjoint analysis on the purchase intent for traditional fermented soy product (Natto) among Japanese housewives.

*Journal of Food Science*, 76(3), S217–S224. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02047.x>

Kunst, F., & Rapoport, G. (1995). Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2403–2407. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2403-2407.1995>

López, D., & Kolter, R. (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 134–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00199.x>

Lopez, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2009). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 152–163.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00148.x>

Magri, A., Oliveira, M. R., Baldo, C., Tischer, C. A., Sartori, D., Mantovani, M. S., & Celligoi, M. A. P. C. (2019). Production of fructooligosaccharides by *Bacillus subtilis* natto CCT7712 and their antiproliferative potential. *Journal of Applied Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14569>



- Milner, M., & Makise, K. (n.d.). *Natto and Its Active A Potent and Safe Thrombolytic Agent*.
- Nabi, I., & Das, S. (2015). Poly-Glutamic Acid (PGA) – Structure, Synthesis, Genomic Organization and Its Application: a Review | International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(June), 2258–2280.  
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(6\).2258-80](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(6).2258-80)
- Oku, T., & Nakamura, S. (2017). Fructooligosaccharide: Metabolism through Gut Microbiota and Prebiotic Effect. *Food & Nutrition Journal*, 3(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.29011/2575-7091.100028>
- Öner, E. T., Hernández, L., & Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>
- Ortiz-Soto, M. E., Porrás-Domínguez, J. R., Seibel, J., & López-Munguía, A. L. M. (2019). A close look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases. *Carbohydrate Polymers*, 219(April), 130–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.014>
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Dogsa, I., & Mandic-Mulec, I. (2014). Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1586–1591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316283111>
- Porrás-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M. E., & Munguía, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 132, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056>
- Porrás-Domínguez, J. R., Rodríguez-Alegría, M. E., Ávila-Fernández, Á., Montiel-Salgado, S., & López-Munguía, A. (2017). Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB1SacB).

- Carbohydrate Polymers*, 177(August), 40–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.040>
- Shih, I. L., Chen, L. D., & Wu, J. Y. (2010). Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 111–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.030>
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., & Hsieh, C. Y. (2005). Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8211–8215.  
<https://doi.org/10.1021/jf058084o>
- Tasaki, S., Nakayama, M., & Shoji, W. (2017). Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. *Development Growth and Differentiation*, 59(5), 369–378. <https://doi.org/10.1111/dgd.12383>
- Veening, J. W., Igoshin, O. A., Eijlander, R. T., Nijland, R., Hamoen, L. W., & Kuipers, O. P. (2008). Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Molecular Systems Biology*, 4(184), 1–15.  
<https://doi.org/10.1038/msb.2008.18>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wei, Q., Wolf-Hall, C., & Chang, K. C. (2001). Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus* strain, and fermentation time. *Journal of Food Science*, 66(1), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15601.x>
- Wu, F. C., Chou, S. Z., & Shih, I. L. (2013). Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.03.009>

Xu, Q., Yajima, T., Li, W., Saito, K., Ohshima, Y., & Yoshikai, Y. (2006). Levan ( $\beta$ -2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: Induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E prod. *Clinical and Experimental Allergy*, 36(1), 94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02401.x>



**Mario Raziell Romay-Ramírez, María Elena Rodríguez-Alegría y Agustín López Mun-guía, Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.**

Esta publicación fue revisada por el comité editorial de la Academia de Ciencias de Morelos.

#### Alimentos fermentados en la dieta

Hay mucho que aprender de la forma en que algunos países desarrollados han incorporado la ciencia y tecnología a su cultura y tradición alimentarias. Basta considerar el ejemplo del yogurt para ilustrar este punto. De hecho, es estudiando los beneficios del consumo de yogurt en la salud, que Eli Méchnikoff inicia los estudios científicos que hoy en día nos permiten tener muy claro que la *microbiota intestinal* tiene una importancia vital en nuestra vida y en la calidad de la misma. Méchnikoff fue Premio Nobel en Fisiología Celular en 1908 y director del Instituto Pasteur cuando el mismísimo Louis Pasteur dejó el cargo. Méchnikoff, por cierto, padre de la gerontología, estudió la microbiota intestinal de poblaciones de ancianos en Bulgaria, llegando a la conclusión de que si llegaban a viejos, era gracias al consumo de yogurt. Actualmente, hay países europeos como Holanda, Alemania y Francia, e incluso Turquía, en los que, en promedio, la población consume unos 35 kg de yogurt al año per cápita. En México, si bien lo consumimos, apenas llegamos a un promedio de 8 kg por mexicano al año. Hoy es claro que en la longevidad influyen muchos otros factores, incluida una vida sin estrés y cerca de la naturaleza. Y sin embargo...

La *microbiota intestinal* la integran más de treinta millones de millones (para no meternos en el lío de los billones y trillones en México y en los EUA) de distintas bacterias que pueblan nuestro intestino grueso agrupadas en más de 500 especies. Hoy sabemos que si queremos gozar de buena salud, debemos mantener a este batallón como nuestro aliado (ver: ¿Somos más bacteria que humano? ACMor 18 de julio de 2016). Para ello requerimos tener un perfil adecuado de especies bacterianas, lo que depende de diversos requisitos, siendo uno de los más importantes el consumir microorganismos como los del yogurt que es, como todos sabemos, un alimento fermentado elaborado por bacterias lácticas a partir de la leche. Necesitamos también consumir fibra soluble y azúcares complejos abundantes en los vegetales, ya que además de otras funciones en nuestro organismo, son el principal alimento de los microorganismos beneficiosos.

¿Por qué un producto como el yogurt ha llegado a tales niveles de popularidad y consumo en todo el mundo? Al analizar este y otros alimentos fermentados o producidos por microorganismos clásicos de la cultura europea, se constata que actualmente son producidos en mayor o menor medida empleando métodos industriales o semi industriales. En muchos casos, esto ha permitido conservar buena parte de su carácter tradicional/artesanal y al mismo tiempo garantizar el abasto, la seguridad para el consumidor – es decir la inocuidad del alimento– y muy particularmente, llevar el beneficio de su consumo a amplios sectores de la población. Es el caso de la *kombucha*, del *kefir*, de la *masa madre*, del *jocoque* o el de cientos de *quesos artesanales*, por citar algunos ejemplos. Un debate

interesante en el tema industria/tradición se da en Francia: por un lado, las instancias de salud prohíben el uso de leche bronca –sin pasteurizar– en la producción de ciertos quesos fermentados, y por el otro, muchos productores locales insisten en usarla, a pesar del alto riesgo que conlleva para la salud del consumidor. Charles de Gaulle decía: *es imposible gobernar un país que produce más de 300 quesos*.

Aunque en general, los europeos gozan de buena salud, *no solo de yogurt vive la microbiota* y no sólo por consumir yogurt se llega a viejo. En un artículo publicado en la revista *Nature* el 29 de julio pasado, un equipo de la Universidad de Keio, en Japón, dio a conocer un estudio con 160 ancianos con más de 100 años, de plano en “la cuarta edad”; también participaron 112 personas entre 85 a 89 años, y 47 de entre 21 y 55 años. El estudio demostró que la población que logra rebasar los 100 años tiene menor susceptibilidad a infecciones y no padecen de inflamación intestinal crónica: ¿por qué? Lo interesante de este estudio, es que se encontró que la microbiota intestinal de la población centenaria contiene bacterias capaces de producir sales biliares que tienen una poderosa capacidad contra las bacterias patógenas, capacidad que no iguala ningún antibiótico existente. ¿Cómo logró reunir esas características su microbiota? ¿qué comen los japoneses? Seguro pueden imaginar algunos de los maravillosos platillos que integran la cocina japonesa y apuntar hacia posibles responsables. Sin embargo, otro estudio reciente, publicado en el *British Medical Journal* de enero del 2020, sugiere, después de analizar la vida de unos 13,000 japoneses fallecidos en la última década, que mientras más *natto* se consume, menos riesgo de morir por afecciones cardíacas se tiene (<https://www.bmj.com/content/368/bmj.m34>). Y... ¿qué es el *natto*?

#### Un paseo por tiendas de conveniencia

Sugerimos al lector que por un momento se pare en la puerta de una tienda de conveniencia en México, de esas que hay ahora en cualquier ciudad, en cualquier colonia, y casi en cualquier calle (O por O, les llaman en la península yucateca) y eche un vistazo buscando –entre refrescos y botanas– algún alimento fermentado característico de la cultura alimentaria mexicana, patrimonio de la humanidad. Nos referimos a los alimentos que transforman y conservan las bacterias y que –como el yogurt en Europa– se consume por estos rumbos desde que éramos Mesoamérica ¿Ven por ahí *pozol*, *pulque*, *atole agrio*, *tesgüino*, *tepache*, *tuba* o algún otro? Y sin embargo, es claro que así como los fer-



**FIGURA 1. (A)** Productos en un mercado de conveniencia japonés. El *natto* es un producto tradicional, pero también semi industrializado, lo que permite que este alcance de cualquier consumidor en Japón o en cualquier país del mundo. **(b)** Nattos en un mercado de productos del Japón en la CDMX.

# Salud, dieta y longevidad

mentados lácteos han jugado desde siempre un papel clave en la salud intestinal de los europeos, por siglos los alimentos fermentados en México han sido esenciales en la salud de la microbiota intestinal de los mexicanos, al menos en las zonas rurales. Recordemos que antes de la revolución, en la Ciudad de México se bebía más pulque que cerveza. Ojalá alguien documentara la posible relación entre la longevidad en la población rural y el consumo de pulque.

Suponiendo ahora que el lector hubiera podido asistir a las olimpiadas en Tokyo y, haciendo la misma tarea, hubiera buscado en el equivalente a una tienda de conveniencia, algún alimento fermentado local. Es muy probable entonces que el lector encontrara un panorama como el de la Figura 1, dentro del cual el encargado de la tienda o el guía le mostraría diversas marcas comerciales de *natto*. No se cuántos *nattos* se identifican en la figura pero seguramente debe haber más de una docena. Para la investigación sobre el *natto* que los autores realizamos actualmente en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, pudimos adquirir –con todo y pandemia– cinco productos en un mercado de la colonia Roma en la CDMX. Aquí cabe la reflexión comparativa sobre qué tan lejos han llegado el yogurt y, en este caso el *natto*, comparados con nuestros fermentados tradicionales, que con excepción del pulque que empieza a llegar a los EUA, la mayor parte apenas logra atravesar la frontera de los poblados en que se produce.

#### ¿Qué es el *natto*?

El *natto* es un alimento fermentado tradicional de varias regiones del oriente asiático, particularmente de Japón, donde como ya se mencionó, está plenamente integrado a su extraordinaria cultura gastronómica. Su origen, cuenta la tradición, se remonta a una batalla de clanes en el Siglo X al noroeste del país. Los ejércitos tenían almacenadas reservas de granos de soja como alimento, mismos que fermentaban espontáneamente ocasionando cambios de sabor, textura y apariencia. Ante la escasez de alimento, había que consumir la soja aunque estuviera fermentada, y así nació el *natto*. No debe sorprendernos que los fermentados en Asia sean de arroz o de soja, pues son los granos base de la dieta oriental, como lo son maíz y frijol en la nuestra. Gracias a la inversión en ciencia y tecnología en el *natto*, su producción alcanzó las 261,000 toneladas en el 2018. El consumo de *natto*



**FIGURA 2. BACILLUS subtilis natto.** (a) colonias creciendo en una caja petri con medio sólido. (b) células vistas bajo el microscopio

está tan arraigado en la dieta japonesa que la nación del sol naciente debe importar grandes cantidades de soja para esta y otras formas de consumo. Paradójicamente el 70% del *natto* se produce en Japón con soja importada de los Estados Unidos de América, que es como si produjéramos *pozol* con maíz estadounidense. La soja sin duda ha constituido una de las más importantes fuentes de proteína en la dieta japonesa, como los frijoles en la nuestra, aunque no tengamos ningún producto fermentado tradicional derivado del frijol. La cultura en torno al *natto* se desarrolla paralelamente a la historia de Japón, pues fue un alimento rico en nutrientes, consumido particularmente durante los periodos de guerra debido en buena medida a la facilidad para su producción casera y su estabilidad una vez fermentado. Hoy, como hemos visto, si bien el *natto* se sigue produciendo de forma artesanal, también puede adquirirse en tiendas de autoservicio. Y se exporta. La composición nutricional lo ubica como un excelente y completo alimento, que por lo mismo, forma parte incluso del desayuno escolar.

#### Un superalimento pegajoso

El proceso de producción de *natto* a gran escala inicia con el lavado y esterilizado con vapor del grano de soja, con el propósito de cocerlo y suavizarlo para facilitar la fermentación. Entonces se agrega al actor central del proceso: *Bacillus subtilis*, en realidad la subespecie *Bacillus subtilis natto*, la bacteria responsable de la fermentación (figura 2). Se trata de una bacteria inocua, presente de manera natural en muchos alimentos y con la que, de hecho, hemos trabajado por décadas en nuestro laboratorio. En el caso del *natto*, los bacilos se agregan en forma de esporas aplicadas como aerosol a la masa de granos de soja. Ahí las esporas germinan y fermentan los granos en condiciones aerobias por varias horas hasta alcanzar una textura y aspecto característicos. En la figura 3 mostramos una imagen que demuestra por que se le describe como un “superalimento pegajoso”. Un buen *natto* –como un buen pulque– dependerá de su textura; pero también de la calidad de la materia prima, del tiempo de fermentación, de la temperatura y de la cepa de *Bacillus subtilis* disponible. Al producto terminado se le pueden agregar diferentes aditivos, según la región o consumirse acompañándolo de arroz, sushi, sopa, ensaladas e incluso a algunas bebidas. El parecido con el pulque no es coincidencia: en ambos casos parte de la textura se debe a polisacáridos conocidos como levanas.

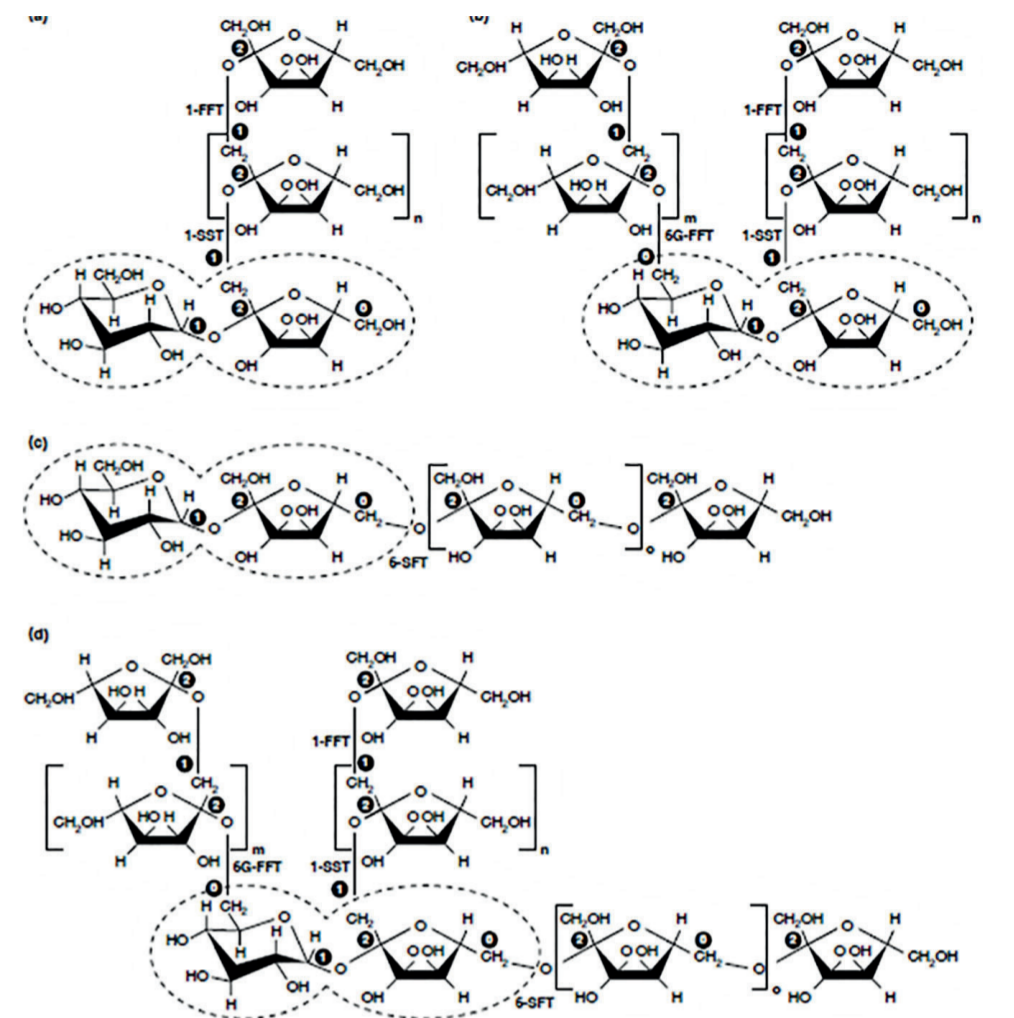


**FIGURA 3. UNA** característica intrínseca del *natto*, es que la fibra: “se ve” consecuencia de la fermentación del grano con *B. subtilis*

#### La riqueza del *natto*: prebióticos y probióticos

Un tema esencial en esta era de infecciones y pandemias, se refiere a la importancia vital que tiene la microbiota intestinal también en el sistema inmune. En este sentido, es vital fortalecerla mediante el consumo de microorganismos y fibra soluble, una característica que reúnen de manera excepcional los alimentos fermentados. Es claro ya que una *disbiosis* (un inadecuado perfil de especies microbianas en el intestino) aumenta el riesgo de infección por Sars-Cov2.

Pero cuidado, el *natto* no es un producto que de entrada deleitará tu paladar. El sabor no es su riqueza. Hay que reconocer que, de acuerdo con una encuesta realizada en 2017, solo al 63% de los japoneses les gusta mientras que el 13% de plano lo rechaza (<https://www.bbc.com/travel/article/20200727-japans-most-polarising-superfood>). Pero cuidado, el *natto* no es un producto que de entrada deleitará tu paladar. El sabor no es su riqueza. Hay que reconocer que, de acuerdo con una encuesta realizada en 2017, solo al 63% de los japoneses les gusta mientras que el 13% de plano lo rechaza (<https://www.bbc.com/travel/article/20200727-japans-most-polarising-superfood>). Pero cuidado, el *natto* no es un producto que de entrada deleitará tu paladar. El sabor no es su riqueza. Hay que reconocer que, de acuerdo con una encuesta realizada en 2017, solo al 63% de los japoneses les gusta mientras que el 13% de plano lo rechaza (<https://www.bbc.com/travel/article/20200727-japans-most-polarising-superfood>). Pero cuidado, el *natto* no es un producto que de entrada deleitará tu paladar. El sabor no es su riqueza. Hay que reconocer que, de acuerdo con una encuesta realizada en 2017, solo al 63% de los japoneses les gusta mientras que el 13% de plano lo rechaza (<https://www.bbc.com/travel/article/20200727-japans-most-polarising-superfood>).



**FIGURA 4. ESTRUCTURA** química de la inulina (b2-1) y la levana (b2-6), esta última, la fibra soluble que produce *B. subtilis* en el *natto* (estructura del centro). En círculo se marca la molécula de sacarosa, sobre la cual se agregan las moléculas de fructosa en diversas posiciones, dando lugar a una diversidad de fructanas.

fructosa, muy parecida a la *inulina*, muy estudiada actualmente por ser uno de los *prebióticos* más efectivos. Recordemos que un prebiótico, generalmente asociado con la fibra soluble, es un compuesto que los humanos no digerimos, de tal forma que llega intacto al intestino para delicia de la microbiota, lo que se traduce en múltiples beneficios. La *inulina*, así como la *levana*, cuyas estructuras se muestran en la figura 4, son capaces de modular la microbiota intestinal, la que contribuye a que tengamos un sistema inmunológico fuerte, y a la producción de agentes antiinflamatorios, anticancerígenos, anticolesterolémicos, incluso antioxidantes. Mientras que la *inulina* nos llega como premio al consumir vegetales como la cebolla, ajo, espárragos, alcachofas o extractos de agave, ambas, *inulina* y *levana*, son una de las riquezas nutrimentales de muchos alimentos fermentados.

#### Escuchar al intestino.

Sin lugar a dudas, uno de los principales problemas de la alimentación moderna está relacionado con la pérdida de fibra dietética y de microorganismos dentro de los componentes de la dieta. Aunado a esto hemos reducido la diversidad de especies de la microbiota como consecuencia del consumo de antibióticos, no solo por el mal uso o abuso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, sino también porque indirectamente los consumimos al ser empleados de manera rutinaria en los sistemas de producción intensiva de animales, carne en particular. Esta pérdida en biodiversidad se ha comprobado fehacientemente comparando el perfil de géneros y especies bacterianas de la microbiota intestinal de pobladores de zonas rurales con la

microbiota de individuos en las grandes ciudades. De niños en África con niños en Europa. De hecho, los cazadores-recolectores que aún subsisten en el planeta como los *Hadza* en Tanzania o los *Yanomamis* en el Amazonas tienen la mayor diversidad microbiana observada en los humanos. Una posible solución ha aparecido en los mercados occidentales: ¡consumir fibra o probióticos como un complemento alimenticio! De probióticos y prebióticos están llenos los anaques de farmacias, supermercados y tiendas naturistas. Sin embargo, la gran parte de quienes intentan consumir fibra a los niveles de antaño –hasta 50 gramos al día– por lo general registran problemas gastro-intestinales. La recomendación es entonces regresar a una dieta rica en vegetales y frutas que incluya diversos alimentos fermentados. En este sentido, el *natto*, como el yogurt y muchos otros alimentos fermentados aquí mencionados, son ejemplo del éxito de aplicar ciencia y tecnología a la tradición alimentaria: solo así los alimentos fermentados tradicionales pueden seguir siendo centrales en la dieta de los consumidores locales y trascender las fronteras de su lugar de origen. Y es que, si bien hay grandes virtudes en la alimentación del pasado, en ese pasado la gente moría de infecciones antes de padecer cáncer, diabetes o un problema cardiovascular. Hay que aprender de nuevo a escuchar las voces que salen del intestino, pero traducidas por la ciencia. Es sorprendente que, bien interpretados, los mensajes de las bacterias desde nuestras entrañas sean en beneficio de nuestra salud y longevidad.

**ESTA PUBLICACIÓN FUE REVISADA POR EL COMITÉ EDITORIAL DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE MORELOS**

Para actividades recientes de la academia y artículos anteriores puede consultar: [www.acmor.org.mx](http://www.acmor.org.mx)  
¿Comentarios y sugerencias?, ¿Preguntas sobre temas científicos? CONTACTANOS: [editorial@acmor.org.mx](mailto:editorial@acmor.org.mx)