

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 480**

21 Número de solicitud: 202031081

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/127 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.10.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.04.2022

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ GARCÍA, Borja;
RÚAS MADIEDO, Patricia;
RUIZ, Lorena;
MARGOLLES, Abelardo;
MARCOS, Raquel y
BLANCO, Aitor**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **MICROORGANISMO AEROBIO DEL GÉNERO *BIFIDOBACTERIUM* SPP**

57 Resumen:

Microorganismo aerobio del género *Bifidobacterium* spp.

La presente invención se relaciona con un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. que comprende un promotor que comprende la secuencia GAAAGGA (SEQ ID NO: 1) a una distancia de entre 12 y 31 nucleótidos del codón de inicio responsable de la transcripción de un gen, en donde dicho microorganismo es aerotolerante y pertenece a la especie *B. bifidum*. La presente invención también se relaciona con la composición que comprende dicho microorganismo y los usos del mismo tanto en salud debido a sus propiedades beneficiosas para la salud como en la fabricación de productos lácteos fermentados.

ES 2 908 480 A1

DESCRIPCIÓN

Microorganismo aerobio del género *Bifidobacterium* spp

5 La presente invención se refiere a un microorganismo aerobio del género *Bifidobacterium* spp., composiciones que lo comprenden, y al uso del mismo en la producción de productos lácteos fermentados como el queso y el yogurt. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la biotecnología, preferiblemente, en el campo de la industria alimentaria.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

El género *Bifidobacterium* incluye al menos 48 especies diferentes, de las cuales 40 se pueden aislar del tracto gastrointestinal de mamíferos, aves e insectos, y el resto
15 proviene principalmente de aguas residuales. Todas poseen un metabolismo fermentativo caracterizado por una vía glucolítica específica denominada “ruta bifida” (Sánchez et al., 2004). Las cepas de bifidobacterias de origen intestinal han sido objeto de numerosos estudios que vinculan la presencia de las mismas, o sus metabolitos, con beneficios para la salud humana. Las cepas específicas de bifidobacterias que ejercen
20 efectos beneficiosos sobre el huésped se consideran probióticas y se incluyen como agentes promotores de la salud en una gran variedad de suplementos dietéticos y alimentos denominados funcionales. Como ejemplo, en la industria láctea las cepas probióticas que pertenecen al género *Bifidobacterium* se usan como un componente adjunto al cultivo iniciador (o estárter) destinado a la producción de bebidas
25 fermentadas, quesos, helados y postres congelados; en algunas ocasiones las bifidobacterias pueden ser incluso responsables del proceso de fermentación. Sin embargo, su inclusión en alimentos funcionales constituye un desafío para la industria desde un punto de vista tecnológico. Por un lado, las empresas que producen y comercializan cultivos iniciadores y adjuntos han de trabajar con cepas “robustas” que
30 alcancen unos rendimientos mínimos de producción (obtención de biomasa a coste asequible), que sean capaces de resistir procesos de liofilización o secado a alta temperatura (entre otros) para obtener un concentrado estable y viable, tanto durante estos procesos como durante el almacenamiento posterior de los cultivos concentrados hasta el suministro a las empresas demandantes. Por otro lado, las empresas del sector
35 alimentario o del sector farmacia-parafarmacia que usan estos cultivos en sus procesos, tienen que controlar las pérdidas de viabilidad durante la fabricación y el

almacenamiento del alimento o del suplemento alimentario, respectivamente, que contienen cepas probióticas. Todo este proceso limita la aplicación de la mayoría de las especies de bifidobacterias. De esta manera, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* es casi la especie predominante en la gran mayoría de los productos fermentados y está presente en muchos preparados en forma de suplemento, y es suministrada por unas pocas empresas especializadas en la producción de cultivos iniciadores o adjuntos.

Entre los factores limitantes más importantes para la producción, uso y comercialización de bifidobacterias de origen intestinal está su baja tolerancia al oxígeno. La ausencia de mecanismos de detoxificación molecular impide que estas bacterias, que son anaerobias estrictas, eliminen especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el anión superóxido (O_2^-). De hecho, las concentraciones normales de oxígeno en el aire (21% v/v) son tóxicas para los microorganismos más abundantes del ambiente intestinal humano porque su alta reactividad induce daños en las moléculas biológicas, especialmente en el ADN y los fosfolípidos. Sin embargo, otros microorganismos aerobios, microaerófilos y aerotolerantes han desarrollado respuestas protectoras que permiten la tolerancia a la concentración de oxígeno ambiental. En presencia de oxígeno se acumulan especies ROS tanto en microorganismos anaerobios, como en subproductos del metabolismo aeróbico. En general, las bacterias anaerobias no albergan (o albergan, pero no expresan) genes que codifican el complejo enzimático reductor de estas especies ROS en sus genomas (principalmente catalasa, peroxidasa o superóxido dismutasa), u otras actividades relacionadas, tales como NAD(P)H peroxidasas o alquilhidroperóxido (Ahp) sistemas reductasa que desintoxican H_2O_2 a H_2O utilizando NAD(P)H.

En los últimos años varios grupos de investigación han estudiado la respuesta de diferentes especies de *Bifidobacterium* al oxígeno. En general, se ha comprobado que los miembros de este género son sensibles al oxígeno y no pueden formar colonias sobre placas de agar en una atmósfera normal porque, como regla general, el crecimiento se detiene en presencia de oxígeno por la acumulación citoplasmática de H_2O_2 .

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica una necesidad de proporcionar microorganismos del género *Bifidobacterium* spp. aerotolerantes al oxígeno capaces de ser empleados en procesos industriales de sector alimentario, u otros afines, donde la presencia de oxígeno es inevitable.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

5 Los inventores de la presente invención han aislado una bacteria del género *Bifidobacterium* spp., en particular de la especie *Bifidobacterium bifidum*, aerotolerante, es decir, es capaz de crecer en presencia de oxígeno, tras ser sometida a procesos de congelación y/o liofilización, cuando la mayoría de las cepas que pertenecen a este género son sensibles al oxígeno pues resulta tóxico para ellas.

10

Los inventores aislaron la cepa *B. bifidum* CECT30106 aerotolerante a partir de la cepa salvaje o parental de *B. bifidum* Wt (CECT30105) aislada de una biopsia de íleon de un individuo sano, la cual, tras ser sometida a un proceso de mutagénesis por luz ultravioleta fue capaz no solo de crecer en la superficie de una placa de agar de un medio definido, es decir, en medio sólido específico tanto en condiciones aerobias como anaerobias, sino que en productos fermentados pudo hacerlo durante más tiempo que otras cepas, sobreviviendo más allá de los 15 días, en concreto, hasta los 28 días (algo nunca antes descrito en el estado de la técnica), tras haber sido sometida a un proceso de congelación a -80°C o a un proceso de congelación a -80°C seguido de una liofilización por vacío.

15

20

El estudio genómico de esta cepa reveló que mostraba sobre-expresados diferencialmente genes relacionados con la resistencia al oxígeno y las reacciones redox, y que los promotores que regulan la expresión de dichos genes mostraban un motivo común localizado entre 12 y 31 nucleótidos del codón de inicio de la transcripción. En base a este descubrimiento, los inventores han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán explicados en detalle a continuación.

25

Microorganismo de la invención y composición que lo comprende

30

En un aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. que comprende un promotor que comprende la secuencia GAAAGGA (SEQ ID NO: 1) a una distancia de entre 12 y 31 nucleótidos del codón de inicio responsable de la transcripción de un gen. De aquí en adelante, este microorganismo será denominado "microorganismo de la invención".

35

Taxonómicamente, el microorganismo de la invención es un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp., que es un género de bacterias Gram-positivas, anaerobias, no móviles, con morfología variada y frecuentemente ramificadas. Sin embargo, en la presente invención, la bacteria del género *Bifidobacterium* spp. es aerobia, es decir, puede crecer y multiplicarse en presencia de oxígeno. Por lo tanto, en una realización particular, el microorganismo de la invención tiene la capacidad de crecer en condiciones aerobias.

En la presente invención se entiende por “condiciones aerobias”, a aquellas condiciones en las que hay presencia de oxígeno en el medio que rodea el microorganismo.

El microorganismo de la invención se caracteriza por contener un promotor que comprende la secuencia GAAAGGA (SEQ ID NO: 1) a una distancia de entre 12 y 31 nucleótidos del codón de inicio responsable de la transcripción de un gen.

En la presente invención se entiende por “promotor” a la región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción del ADN a ARN. Un promotor, por lo tanto, promueve la transcripción de un gen. En la presente invención, el promotor comprende la secuencia GAAAGGA (SEQ ID NO: 1) a una distancia de entre 12 y 31 nucleótidos del codón de inicio responsable de la transcripción de un gen. En una realización particular, dicho gen que es regulado por el mencionado promotor es el gen que codifica la proteína alquil hidroperóxido reductasa C y/o el gen que codifica la proteína alquil hidroperóxido reductasa F.

La proteína alquil hidroperóxido reductasa C o AhpC (en inglés *alkyl hydroperoxide reductase C* o *peroxiredoxin*) es una enzima bacteriana responsable de la reducción de hiperóxidos orgánicos directamente a su forma reducida de ditiol. En una realización particular, la proteína AhpC es la proteína AhpC de *B. bifidum*. En otra realización particular, la proteína AhpC comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 2. En otra realización particular, la proteína AhpC comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2 (GeneBank Access number SFC21796.1).

SEQ ID NO: 2

001 MTLIQHELTD FTVQAFQNE FHEVTKADVL GHWSVFFFYP ADFTFVCPT E LEDLAAKYED

ES 2 908 480 A1

061 FKKIGCEIYS VSCDTHFVHK AWHDANEKIA KIQYPLADP TALLAKDLDT YNEADGVAER
121 GDFIVNPEGK VVAYEVISSN VGRNADELLR RVQASQFVYE HGDQVCPAKW TPGEETIEPS
181 LDLVGLL

- 5 La proteína alquil hidroperóxido reductasa F o AhpF (en inglés *alkyl hydroperoxide reductase F*) es una flavoenzima homodimérica que cataliza la reducción dependiente de NADH de la proteína AhpC, que a su vez cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos.
- 10 En una realización particular, la proteína AhpF es la proteína AhpF de *B. bifidum*. En otra realización particular, la proteína AhpF comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 3. En otra realización particular, la proteína AhpF comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad
- 15 de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 3 (GeneBank Access number WP_047290408).

SEQ ID NO: 3

1 MTQINRSDLY DVVVIGGGPA GLTAGLYLAR ARYRVLILEK DDFGGQITIT DEVVNYPGVG
20 61 HTSGRALTQT MRNQAKDFGA EFLSAEATGL DVNGDIKTVH TSRGDLKTFG ILIATGASPR
121 KLGFACEAEY AGRGVAYCAT CDGEFFTGRE VLVVGGGFAA AEESVFLTKY ASKVTVLVRE
181 PDFTCDAAVS AEAKNNPKID VRYNVELKGV TAGKGGLREA TILDRGTGET ESWKPSDDGT
241 FGVFVFAGYV PATELVRGV ELDDHGYVVT RGYLETSVPG VYAAGDLRVK NLRQVVTATA
301 DGAIAAVELE RYAKQMSEKT GLVPPRPTAS AYEQAQAQTA AAVNSAAAAG TTPAPAPVKR
25 361 SADTAAATAA AKKPGELFSA AIKQQLGVVF GRMTRPVTLV LELDDTPLST ELQGFIGEMV
421 ALSNGKLSV AVDAAGVITA EDGSSAPTS TVGEPLAVTL PDGAELPVYG SLDDSGRAQF
481 DVAGVLP SAR PVVLMCVPAE NSEAGTLLFT GLAFHGVP SG HEFNSFVLGL YNAAGPGQPL
541 DDDLKARAEA IDTPIDVMIL VSLTCTMCPE TVLAAQRIAS LNPVRAEAY DVAHFPELKD
601 QYGAMSVPCI VINQPGGEQK VEFGKKSVPQ MLTLLGA

- 30 Otra característica del microorganismo de la invención es que presenta sobre-expresados genes relacionados con la resistencia al oxígeno y las reacciones redox, con respecto un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. no aerotolerante. En la presente invención se entiende por “no aerotolerante” a aquella bacteria del género
- 35 *Bifidobacterium* spp. que no puede crecer en presencia de oxígeno. En una realización particular, los genes sobre-expresados en la cepa aerotolerante de *Bifidobacterium* spp.

son el gen que codifica AphC y el gen que codifica AphF. Estas proteínas han sido descritas en párrafos anteriores de la presente descripción.

5 El microorganismo de la invención puede pertenecer a cualquier microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. Así, ejemplos de microorganismos del género *Bifidobacterium* incluyen, sin limitarse a, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. infantis*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B.*
10 *minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. suis*, *B. thermacidophilum* y *B. thermophilum*.

En una realización particular, el microorganismo de la invención es *B. bifidum* que, en otra realización todavía más particular, es la cepa *B. bifidum* IPLA60003. La cepa *B.*
15 *bifidum* IPLA60003 fue depositada bajo el tratado de Budapest el 26 de mayo de 2020 en la Colección española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito, localizada en Building 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, España. El número de depósito asignado fue el CECT30106. El depositante de la cepa fue el Consejo Superior de Investigaciones
20 Científicas.

En la presente invención también se contempla cualquier cepa derivada de la cepa *B. bifidum* IPLA60003, donde dicha cepa mantiene o mejora la capacidad de crecer y desarrollarse en presencia de oxígeno, es decir, es aerotolerante. El microorganismo
25 derivado puede producirse de forma natural o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, pero sin limitarse, al crecimiento del microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Según una realización preferida, la cepa derivada
30 de la cepa *B. bifidum* IPLA60003 es un mutante genéticamente modificado. Los términos cepa mutante o cepa derivada pueden ser utilizados indistintamente.

La presente invención también se refiere a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa
35 *B. bifidum* IPLA60003, o a partir de una combinación de microorganismos que comprenda al menos la cepa *B. bifidum* IPLA60003.

Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como por ejemplo, pero sin limitarse a, peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana, u otros como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones, como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas, o polisacáridos. Los metabolitos incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, pero sin limitarse, procesos de elaboración de alimentos o fármacos), durante el almacenamiento del producto o durante el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse, los ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula exportada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, de elaboración de alimentos o fármacos), el almacenamiento del producto o el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse a, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, polisacáridos, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos.

Como entiende el experto en la materia, el microorganismo de la invención puede estar contenido dentro de una composición. Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el microorganismo de la invención, de aquí en adelante “composición de la invención”, incluyendo todas las realizaciones particulares definidas en los párrafos anteriores.

Como es sabido, el género *Bifidobacterium* es uno de los géneros de bacterias autóctonas comensales o mutualistas presentes en la flora o microbiota intestinal, es decir de los microorganismos que residen en el colon. Ayudan en la digestión, y están asociadas con una menor incidencia epidemiológica de alergias y también previenen algunas formas de crecimiento de tumores. Las bifidobacterias pueden usarse como probióticos, jugando un importante papel en el efecto beneficioso de determinados alimentos o fármacos.

Así, en una realización particular, la composición de la invención es una composición nutricional funcional, o un nutracéutico.

En el caso de que la composición de la invención esté formulada como una composición nutricional funcional, dicha composición nutricional puede ser un alimento o ir incorporada en un alimento o producto alimenticio destinado tanto a la alimentación humana como a la alimentación animal. Así, en una realización particular, la composición nutricional funcional es seleccionada de entre un alimento (que puede ser un alimento para fines nutricionales específicos o un suplemento alimentario o un alimento funcional) y un suplemento nutricional.

El término "composición nutritiva funcional" o "composición nutricional funcional" de la presente invención se refiere a aquella composición que comprende un ingrediente o compuesto que puede estar presente en un alimento o en un suplemento alimentario, y que afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Ejemplos de alimentos que pueden comprender el microorganismo de la invención, o la composición que el microorganismo de la invención, incluyen, pero sin limitarse a, piensos, productos lácteos, productos vegetales, productos cárnicos, aperitivos, chocolates, bebidas, alimentos infantiles, cereales, fritos, bollería industrial, galletas, etc. Ejemplos de productos lácteos incluyen, pero sin limitarse a, productos derivados de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, helado, mantequilla, margarina o suero lácteo). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitarse a, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado o no fermentado, o un aperitivo. La bebida puede ser, pero sin limitarse a, leche o bebida de base vegetal no fermentada. No obstante, en una realización particular, el producto alimentario se selecciona del grupo que consiste en un producto lácteo, un producto cárnico, un producto vegetal, un forraje y una bebida.

En otra realización más particular, el alimento es un producto lácteo, todavía más en particular, un producto lácteo fermentado. En otra realización particular, el producto lácteo se selecciona de la lista que consiste en leche, queso, yogurt y kéfir.

El término "suplemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético", "suplemento nutricional", "suplemento alimentario" o "suplemento alimenticio", es un componente o componentes destinados a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos incluyen, pero sin limitarse a, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, los aminoácidos y los componentes de los

alimentos, como las enzimas y los extractos glandulares. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componentes únicos de una comida o de una dieta alimenticia, sino como complemento de la dieta.

5 El término “nutracéutico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto beneficioso sobre la salud. Dicho nutracéutico puede ser un suplemento.

En otra realización particular, la composición de la invención es administrada a un sujeto a través de la dieta.

10

Como entiende el experto en la materia, el microorganismo de la invención tiene que estar presente en la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva para que puedan ejercer su efecto beneficioso cuando es administrada a un sujeto. En la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente efectiva”
15 aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para producirle el efecto. Dicho componente de la composición farmacéutica se refiere al microorganismo de la invención. La cantidad terapéuticamente efectiva variará en función de, por ejemplo, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del sujeto, al igual que en función del modo
20 y del tiempo de administración, de la velocidad de excreción o de la combinación de fármacos entre otros. Así, en una realización particular, la concentración total de microorganismos del microorganismo de la invención en la composición es de entre 10^6 y 10^{12} CFU/mL o gramos (unidades formadoras de colonia = bacterias), preferiblemente, 10^9 CFU/mL o gramos. En otra realización particular, la dosis de administración del
25 microorganismo de la invención en la composición es de entre 10^6 y 10^{12} CFU/día, preferiblemente, 10^9 CFU/día, y en otra realización todavía más particular, el régimen de administración es de, al menos, una vez al día, en particular, dos veces al día, y más en particular, tres veces al día, una con cada ingesta de comida (desayuno, almuerzo y cena).

30

La composición de la invención, además del microorganismo de la invención, puede comprender otros microorganismos o componentes bioactivos.

35

Otros microorganismos que pueden acompañar al microorganismo de la invención en la composición incluyen, sin limitar a, microorganismo de grupos filogenéticos, géneros o especies de procariontes de origen intestinal, alimentario o ambiental, como por

ejemplo pero sin limitarse a Archaea, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Metanobacteria, Spirochaetes, Fibrobacteres, Deferribacteres, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cyanobacteria*, *Methanobrevibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*,
 5 *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio* o *Clostridium*.

10

En una realización particular, la composición de la invención comprende adicionalmente, un microorganismo seleccionado del grupo que consiste una levadura, un moho, y una bacteria ácido-láctica distinta de *Bifidobacterium* spp.

15

Ejemplos de mohos que pueden ir en combinación con el microorganismo de la invención incluyen, sin limitarse a, aquellos pertenecientes al género *Penicillium* (como ejemplo las especies *P. roqueforti*, *P. candidum*). Ejemplos de levaduras que pueden ir en combinación con el microorganismo de la invención incluyen, sin limitar a, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, *Debaromyces hansenii*, o similares.

20

Ejemplo de bacterias ácido-lácticas, y otras bacterias Gram-positivas, que pueden ir en combinación con el microorganismo de la invención incluyen, sin limitarse a, bacterias del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*.

25

Ejemplos de bacterias de los géneros arriba indicados incluyen, sin limitarse a, bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus xenteri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus mali* y similares; bacteria del género *Streptococcus* tales como *Streptococcus thermophilus*; bacterias del género *Lactococcus* tales como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp.

30

35

cremoris y similares; bacterias del género *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y similares; bacterias del género *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis*; bacterias del género *Propionibacterium*, tales como *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium acidipropionic*, y similares.

5

La composición según cualquiera de las definidas anteriormente, puede además comprender al menos un componente bioactivo (sustancia activa, principio activo o agente terapéutico), como son por ejemplo otros componentes de alimentos, productos vegetales y/o animales, minerales, vitaminas, o similares.

10

El término “componente bioactivo” hace referencia a un compuesto con actividad biológica en el ámbito de aplicación de la solicitud de patente que pueda mejorar o complementar la actividad del microorganismo de la invención, incluyendo ingredientes o componentes de los alimentos (por ejemplo y sin limitar: ácidos grasos poli-
 15 insaturados, ácido linoléico conjugado, prebióticos, fibra, goma Guar, glucomanano, quitosano, picolinato de cobre, calcio, etc.), plantas, extractos o componentes de plantas (por ejemplo y sin limitar polifenoles, efedrina o extractos de *Ephedra* spp., té verde [*Camellia sinensis*], o naranja amarga [*Citrus aurantium*]).

20

Debido a los efectos beneficiosos que los microorganismos del género *Bifidobacterium* tienen sobre la salud y el bienestar de un sujeto, la presente invención también contempla que el microorganismo de la invención puede ser empleado en una composición farmacéutica. Así, en otra realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

25

La “composición farmacéutica” es un conjunto de componentes que está formado al menos por el microorganismo la invención en cualquier concentración, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud o reducción del riesgo
 30 de enfermedad. Dicha composición farmacéutica puede ser un medicamento.

35

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica,

o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

Además del requerimiento de la eficacia terapéutica donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación del microorganismo de la invención y un componente bioactivo tal como se ha definido previamente.

En una realización particular, la composición farmacéutica además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes.

La "forma galénica o forma farmacéutica" es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

5

El "vehículo" o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

10

15

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

20

En cada caso la forma de presentación de la composición farmacéutica se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. Según una realización aún más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

25

30

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

35

Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica,

inhalada o parenteral. La cepa de la invención; los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de la invención, o la composición de la invención; pueden ir asociados, por ejemplo, pero sin limitarse, con liposomas o micelas.

5

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. Dicho componente de la composición farmacéutica se refiere a la cepa de la invención; o a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas; o una combinación de los mismos, y que opcionalmente pueden estar comprendidos en dicha composición en combinación con un componente bioactivo adicional, y que contribuyen al efecto terapéutico de la composición farmacéutica. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad del microorganismo de la invención; del microorganismo adicional o microorganismos adicionales que comprenda la composición de la invención; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particular; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esta descripción.

10

15

20

Usos del microorganismo y de la composición de la invención

25

Tal como se ha explicado previamente, el microorganismo de la invención, debido a que pertenece al género *Bifidobacterium* spp., tiene efectos beneficiosos sobre la salud y el bienestar de un sujeto al que se le administra el microorganismo de la invención.

30

Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el microorganismo de la invención, o de la composición de la invención, para su uso como medicamento.

35

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el microorganismo de la invención, o de la composición de la invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención del estreñimiento, de una infección por *Helicobacter pylori*, del síndrome del colon irritable (SCI), enfermedad inflamatoria intestinal (como colitis ulcerosa, pouchitis tras sufrir una cirugía por colitis ulcerosa, o enfermedad de Crohn), enfermedades autoinmunes, estados inflamatorios, y una diarrea.

El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados por una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- 5
- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
 - (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
 - (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

10 El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

15

En la presente invención, el término “estreñimiento” hace referencia a aquel proceso que padece un sujeto que tiene tres o menos evacuaciones de heces en una semana. Las heces pueden ser duras y secas.

20 En la presente invención, se entiende por “infección por *H. pylori*” a una infección bacteriana que provoca inflamación del estómago (gastritis), úlcera gastroduodenal y ciertos tipos de cáncer de estómago.

25 En la presente invención, se entiende por “enfermedad inflamatoria intestinal” (colitis ulcerosa, y enfermedad de Crohn) a una enfermedad inflamatoria del colon (el intestino grueso) y/o del recto. Está caracterizada por la inflamación y ulceración de la pared interior del colon. Los síntomas típicos incluyen diarrea (algunas veces con sangre) y con frecuencia dolor abdominal.

30 En la presente invención, se entiende por “síndrome del intestino irritable” a aquel síndrome que afecta al intestino grueso y que puede causar cólicos abdominales, distensión y cambios en los hábitos intestinales, dando lugar tanto a estreñimiento como a diarrea dependiendo del sujeto afectado.

35 En la presente invención, se entiende por “reservoritis” o “pouchitis” a la dolencia de causa desconocida que consiste en una inflamación inespecífica del reservorio ileoanal.

El reservorio ileoanal se realiza en aquellos sujetos que han precisado de la realización de una panproctocolectomía, independientemente de la patología de base.

5 Adicionalmente a las características propias del género *Bifidobacterium* spp., el microorganismo de la invención tiene la capacidad adicional de tolerar el oxígeno y de mantenerse viable en condiciones de aerobiosis durante más de 15 días, llegando incluso a los 28 días, en un producto lácteo fermentado. Esto hace que sea de especial interés su uso en la industria alimentaria en la producción de alimentos lácteos fermentados, o de alimentos funcionales, donde la mayoría de los procesos se llevan a
10 cabo en condiciones aerobias.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, o de la composición de la invención, en la producción de derivados lácteos fermentados.

15 En la presente invención, se entiende por “derivado lácteo fermentado” a los productos lácteos procedentes de los cultivos lácticos debido a la acción de las bacterias del ácido láctico (*Lactobacillales*) tales como los *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y el *Leuconostoc*.

20 Existen muchos tipos de lácteos de cultivo o fermentados y se pueden encontrar con sus variantes a lo largo de todo el mundo. Ejemplos de productos lácteos fermentados incluyen, sin limitar a, quesos, yogur, requesón, suero de mantequilla (Estados Unidos, Canadá), leche acidophilus (Estados Unidos, Canadá), kiselo mlyako (Bulgaria), sauermilch o dickmilch (Alemania), zure melk (Países Bajos), lapte bătut (Rumanía),
25 filmjök o fil (Suecia), surmelk o kulturmelk (Noruega), piimä y viili (Finlandia), amasi (Sudáfrica), calpis (Japón), suero de leche (Venezuela) y pilfrut (Bolivia).

La producción de la gran mayoría de productos lácteos fermentados se basa en la utilización de cultivos iniciadores producidos industrialmente, obligada en parte por el uso de leche
30 pasteurizada en la que la microbiota original de la leche ha sido parcialmente destruida. El uso de este tipo de cultivos, junto con la utilización de métodos de procesado más higiénicos y condiciones de maduración controladas, ha tenido un efecto enormemente positivo en la calidad, proporcionando productos microbiológicamente más seguros y con unas propiedades organolépticas y reológicas más reproducibles.

35

Métodos de la invención

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para producir un producto lácteo fermentado que comprende incubar el microorganismo de la invención, o la composición según de la invención, con un producto lácteo en las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo el proceso industrial de la fermentación. A modo de ejemplo, pero sin limitarse a, en un proceso de fermentación típico se utilizaría leche pasterizada que se inocularía con un cultivo iniciador y/o con el microorganismo de invención, se incubaría a 37°C hasta alcanzar un pH inferior o igual a 4,5 y se enfriaría a 4°C para su posterior almacenamiento en refrigeración durante su vida útil que se podría extender más allá de 28 días.

El microorganismo de la invención puede haber sufrido previamente a la incubación con el producto lácteo un proceso de liofilización y/o congelación, sin que ello altere su capacidad de llevar a cabo la fermentación del producto lácteo en presencia de oxígeno.

Ejemplos de producto lácteos que pueden ser fermentados con el microorganismo o la composición de la invención incluyen, sin limitar a, la leche.

Todas las realizaciones particulares descritas previamente para el microorganismo de la invención y la composición de la invención a largo de la descripción, tanto individualmente como en combinación, son aplicables al presente aspecto inventivo.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para conferir aerotolerancia a un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. que comprende transformar un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. no tolerante al oxígeno con un promotor que comprende la secuencia GAAAGGA (SEQ ID NO: 1) a una distancia de entre 12 y 31 nucleótidos del codón de comienzo responsable de la transcripción de un gen.

En la presente invención, se entiende por “transformación bacteriana” a un proceso de transferencia de material genético a través del cual ciertas bacterias, por ejemplo, las del género *Bifidobacterium* spp, pueden recolectar material genético de otros organismos. Los métodos de transformación bacteriana son conocidos en el estado de la técnica y son práctica de rutina para el experto en la materia.

35

Todos los términos empleados en el presente aspecto inventivo, así como los de sus realizaciones particulares, han sido explicados para aspectos inventivos anteriores, y son aplicables al presente aspecto inventivo.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Fenotipo aerotolerante de *B. bifidum* CECT30106. Colonias de CECT30106 creciendo en la superficie de placas de agar en aerobiosis y anaerobiosis.

10 **Figura 2. Rutas metabólicas afectadas por la aireación.** A) Diferentes rutas metabólicas ($FDR \leq 0.05$; con dos excepciones marcadas con un asterisco) pertenecientes al metabolismo central que están sobre-expresadas durante el crecimiento de la cepa CECT30106 en aireación con respecto a condiciones anaeróbicas. B) Además, también están sobre-expresados genes que codifican
15 actividades implicadas en el metabolismo de fármacos

Figura 3. Motivo común compartido por los promotores de los genes sobre-expresados en la cepa CECT30106. Los niveles de expresión relativos de estos genes en condiciones de aireación y anaerobiosis, obtenidos a partir de los datos RNAseq, se
20 presentan a la derecha. El primer ATG se marca en negrita. Este motivo se propone como diana de tres proteínas regulatorias que presentan cambios en su secuencia de aminoácidos en la cepa CECT30106 con respecto a la cepa salvaje Wt (CECT30105).

Figura 4. Cambios inducidos en la cepa CECT30106 en presencia de oxígeno. (A) contenido de ATP normalizado por concentración de proteína. (B) Representación de las proporciones redox calculadas como la proporción de FAD con respecto a la suma
25 las señales fluorescentes de FAD más NADH después del crecimiento de la cepa CECT30106 bajo anaerobiosis, aerobiosis y aireación. (C) Actividades F_1F_0 -ATPasa total y específica (tipo F) en membranas de la cepa CECT30106 obtenidas a partir de
30 células crecidas en aerobiosis o anaerobiosis.

Figura 5. Crecimiento (Log CFU/ml) de las tres cepas de *B. bifidum* en distintas condiciones experimentales: cultivos frescos estandarizados, cultivos de cepas sometidas a congelación (siembra directa tras el proceso, o cultivados durante 24 horas
35 en presencia de O_2 o en anaerobiosis), y cultivos de cepas sometidas a liofilización (ídem).

Figura 6. Evolución del pH y recuentos (Log CFU/ml) de las leches fermentadas con tres cepas de *B. bifidum*. Para el pH y recuentos se muestran únicamente los valores de la media de tres replicados biológicos; los coeficientes de variación de estos datos (% media/desviación estándar) oscilaron entre 0,01 – 6,49% para pH y 1,53 – 45,0% para los recuentos. Se muestra la media y desviación estándar de la supervivencia final (% CFU 27 días/CFU final fermentación) de las cepas tras la refrigeración durante 27 días.

10 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

15 Ejemplo 1. Caracterización de *B. bifidum* CECT30106 aerotolerante

15

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Se cultivaron rutinariamente *Bifidobacterium bifidum* LMG11041 [Cepa tipo
20 (ATCC29521T) adquirida en colección belga], CECT30105 y CECT30106 en MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) suplementado con 0,05 % (p/v) de L-cisteína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) (MRSC) o en BHI (Oxoid, Ltd., Baingstoke, Hampshire, R. U.) suplementado con 0,05 % (p/v) de L-cisteína HCl monohidrato (BHIC, Sigma, St. Louis, MO) y 2 % (p/v) de glucosa (Sigma, St. Louis,
25 MO). Dependiendo del fenotipo de aerotolerancia, estas cepas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en i) una cámara anaerobia MG500 (Don Whitley Scientific, West Yorkshire, R. U.) bajo 10 % (v/v) de H₂, 10 % de CO₂ y 80 % de N₂ (denominadas condiciones anaerobias), ii) un incubador convencional (denominado condiciones aerobias o de aerobiosis), o iii) un incubador-agitador giratorio Excella E24 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) (denominado condiciones de aireación). En este último
30 caso, se cultivaron cultivos líquidos de 200 ml en matraces de 500 mL bajo agitación (a 250 rpm). Se monitorizó el crecimiento en cultivos líquidos siguiendo la DO600nm en diferentes tiempos de incubación.

35

1.2. Generación de una cepa aerotolerante de *B. bifidum*.

Para generar mutantes, se propagó la cepa CECT30105, aislada de la mucosa del íleon de un individuo sano, en MRSC. Los cultivos se incubaron a 37 °C en condiciones anaerobias y se usó un cultivo durante la noche para inocular 50 mL de MRSC fresco (1 % v/v). Los cultivos de fase exponencial DO_{600nm} = 0,4) se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 5 mL de PBS que se depositaron en una placa de Petri estéril; finalmente, se expusieron a luz UV (mesa de esterilización por radiación ultravioleta, JP Selecta, Barcelona, España) durante 3 minutos. Posteriormente, se sembraron en la superficie de MRSC y tras la incubación en aerobiosis se observó una única colonia que fue capaz de formar colonias en la placa de Petri I. Esta cepa se denominó CECT30106.

1.3. Secuenciación del genoma.

Se extrajo ADN total de CECT30105 y CECT30106 usando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), con un protocolo modificado para bacterias Gram-positivas. La secuenciación del genoma se realizó en GenProbio SRL, (Italia) usando el método de extremos pareados de Illumina NextSeq, según protocolos estándar de Illumina, utilizando el secuenciador Illumina HiSeq2000. Ambos genomas se subieron y ensamblaron en PATRIC usando el ensamblador incorporado SPADES (<https://www.patricbrc.org>). La secuencia del genoma de CECT30105 consistió en 1.850.464 lecturas de 250 pb de extremos pareados según el secuenciador Illumina HiSeq2000. El resultado del ensamblaje final fue un conjunto de 32 cóntigos no orientados, con una longitud total de 2.168.250 pb y un contenido de GC de 62,6 %. Se calcularon las pautas de lectura abiertos (ORF) y el ARNt generando un número total de 1808 y 55, respectivamente. En el caso de la cepa CECT30106, se ensamblaron un número total de 1.572.920 lecturas de 250 pb de extremos pareados, en 54 cóntigos no orientados, para una longitud total de 2.185.465 pb y un contenido de GC de 62,5 %, obteniéndose 1817 ORF y 56 genes codificantes de ARNt.

1.4. Comparación de los genomas de las y análisis de polimorfismo de un solo nucleótido.

Se realizó la comparación de genomas entre cepas CECT30105 y CECT30106 usando la herramienta Mauve v2.4.0 (Darling, et al. 2004, Genome Research, 14(7):1394-403). Se ordenaron los cóntigos del genoma de ambas cepas y se alinearon contra el genoma de referencia de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 (secuencia de RefSeq de NCBI: NC_014638.1). Se seleccionó el alineador Muscle 3.6 (Edgar, 2004 Nucleic Acids

Res. 32(5):1792-1797; Edgar, 2004 BMC Bioinformatics, (5) 113) con los parámetros por defecto.

Además, se llevó a cabo el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para descubrir mutaciones génicas en la cepa CECT30106. El alineamiento de los archivos del ensamblaje de ambas cepas se realizó usando el servicio de web LAST (Kielbasa, S. M., et al. 2011 Genome Res. 21, 487–493). Se seleccionó el tipo de alineamiento de máxima puntuación para alinear los archivos de ensamblaje de ambas cepas. No se ha tenido en cuenta el alineamiento de los primeros y últimos 300 pares de bases de cada cóntigo.

1.5. Lisis celular y extracción de ARN

Todo el material usado en esta etapa se esterilizó previamente en autoclave dos veces durante 15 minutos a 121 °C. Se recogieron cultivos celulares de la cepa CECT30106 cultivados en condiciones anaerobias o aerobias en la fase de crecimiento exponencial (DO600nm \approx 0,6), se centrifugaron (10.000 x g, 5 minutos, temperatura ambiente) y se trataron con RNA-Protect siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Los sedimentos bacterianos se sometieron posteriormente a una extracción con fenol ácido, resuspendiendo las células en 400 μ L de TE, 250 μ L de fenol ácido (Calbiochem), 150 μ L de cloroformo (Merck), 50 μ L de SDS al 10 % (p/v) y 500 μ L de perlas de circonia/sílice (0,5 – 0,1 mm; BioSpec). La mezcla se mantuvo en hielo y se trató en un dispositivo FastPrep-24 (MP) con 4 pulsos de 30 segundos a velocidad máxima, con incubaciones intercaladas de 1 minuto en hielo. Las células lisadas se centrifugaron (10.000 x g, 10 minutos, 4 °C) y la fase superior se transfirió a tubos fríos que contenían 500 μ L de cloroformo. Los tubos se centrifugaron otra vez (10.000 x g, 5 minutos, 4 °C) y la fase superior resultante se transfirió a un tubo limpio. Estos sobrenadantes resultantes se usaron para obtener al menos 20 μ g de ARN total usando el kit RNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen) y que incluía una digestión en columna con el kit RNase-free DNase (Qiagen). La concentración de ARN total se estimó usando un dispositivo de NanoDrop.

1.6. Secuenciación de ARN y análisis RNASeq-

Alícuotas de 20 μ g de ARN total se enviaron para secuenciación a las instalaciones de GenProbio S.R.L, donde el ARNr se empobreció usando el kit riboZero (Illumina). La preparación de librerías, la ejecución de secuencia y los datos sin procesar se obtuvieron en una máquina Illumina Myseq siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, se obtuvieron 4 millones de lecturas de 75 nt para cada muestra. Para el análisis RNASeq, la secuencia genómica de la cepa *B. bifidum* CECT30106 y su anotación en formato *.gff, se obtuvieron previamente en el servidor PATRIC. En primer lugar, se comprobó la calidad de los datos sin procesar de RNASeq con FASTQC y se filtraron si fue necesario con el kit de herramientas FASTX. Se formó un índice genómico de la cepa CECT30106 con Bowtie2, y se alinearon las lecturas de RNASeq. Las lecturas mapeadas se convirtieron en el formato *.bam y se contaron usando la herramienta Counts. La salida de este software se usó como entrada para DESeq2 de la biblioteca R, que se usó para calcular la expresión génica diferencial entre las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Todas las gráficas se obtuvieron en el entorno R usando las siguientes bibliotecas: RcolorBrewer, gplots, genefilter y calibrate.

1.7. Análisis diferencial de la expresión génica

Se realizó el análisis diferencial de la expresión entre condiciones de crecimiento aerobias y anaerobias de la cepa CECT30106 con el procedimiento Hisat2+HTseq+DESeq2 (Wen, G. A Simple Process of RNA-Sequence Analyses by Hisat2, Htseq and DESeq2. in *Proceedings of the 2017 International Conference on Biomedical Engineering and Bioinformatics - ICBEB 2017* 11–15 (ACM Press, 2017). doi:10.1145/3143344.3143354). Este protocolo usa HISAT2 (Kim, D., et al. 2015. *Nat. Methods* 12, 357–360) para alinear lecturas de muestras, HTSeq (Anders, S., et al. 2015. *Bioinformatics* 31, 166–169) para normalizar los recuentos sin procesar y DESeq (Love, M. I., et al. 2014. *Genome Biol.* 15, 550) para realizar el análisis de expresión diferencial. Se seleccionó el genoma de CECT30106 para alinear y anotar doce muestras de cada condición. Los genes con valor de $q < 0,05$ y $|\log_2(fc)| > 1$ se definieron como significativamente diferencialmente expresados.

1.8. Enriquecimiento de vías enzimáticas diferencialmente expresadas.

Se seleccionó la herramienta EC2KEGG v1 (Porollo, A. 2014. *Source Code Biol. Med.* 9, 19) para identificar vías enriquecidas entre las dos condiciones de crecimiento. Para dicho enriquecimiento, se seleccionaron enzimas significativamente diferencialmente expresadas, es decir, genes con número de la Comisión de Enzimas (EC). Se seleccionó *Bifidobacterium bifidum* BGN4 (bbf; en la base de datos KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) como genoma de referencia.

1.9. Descubrimiento de motivos en promotores génicos.

Se realizó la identificación de motivos comunes compartidos por los promotores de los genes diferencialmente expresados (sobre-expresados) de la cepa CECT30106 usando la herramienta Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) Suite 5.0.3 (Bailey, T. L. et al. 2009. Nucleic Acids Res. 37, W202–W208). Se seleccionó el modo de descubrimiento clásico para encontrar motivos entre 6 y 50 aminoácidos de longitud.

1.10. Estimación del equilibrio redox por espectroscopía de fluorescencia.

Se monitorizaron las propiedades de fluorescencia de suspensiones de células tamponadas (DO600nm \approx 0,6) en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,0, en un espectrofotómetro de fluorescencia Eclipse (Varian, Inc., Palo Alto, CA). Para estimar el equilibrio redox de las células, los inventores usaron el método descrito por Ammor y colaboradores (Ammor, M. S et al. 2007. J. Microbiol. Methods 69, 100–6), en el que los valores de intensidad de fluorescencia correspondientes al NADH se calcularon a partir de la emisión a 413 nm tras aplicar una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 316 nm, mientras que para FAD⁺ los valores de intensidad se calcularon a partir de la emisión a 436 nm a una λ_{ex} de 380 nm. La relación redox se dedujo a partir de los datos de NADH y FAD⁺ obtenidos, usando la siguiente ecuación: relación redox = Intensidad de FAD⁺/(Intensidad de FAD⁺ + Intensidad de NADH).

1.11. Actividad ATPasa.

Se calculó la actividad de ATPasa presente en membranas dadas la vuelta a partir de la liberación de fosfato inorgánico, medido colorimétricamente después de su reacción con molibdato de sodio y verde de malaquita, como se describió previamente (Sánchez, B., et al. 2006. Environ. Microbiol. 8, 1825–1833). Las membranas de la cepa CECT30106 se obtuvieron de cultivos independientes (50 mL) en las las condiciones enumeradas anteriormente (aireación, aerobiosis y anaerobiosis). Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 4 mL de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0, suplementado con MgSO₄ 10 mM y se trataron con 10 mg/mL de lisozima y 50 unidades/mL de mutanolisina. Las suspensiones se incubaron a 30 °C durante 4 horas con agitación constante. Se rompieron las células pasándolas una vez a través de un disruptor celular (Constant Systems Ltd., Daventry, Reino Unido) a 2,06 X 10⁸ Pa. Se retiraron por centrifugación (13000x g, 4 °C, 20 minutos) las células sin romper y los residuos celulares. Se midió la concentración de proteína del extracto de membranas usando un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calculó la actividad específica de F₁F₀-ATPasa preincubando las membranas durante 10 minutos a 37 C y posteriormente durante 60

minutos sobre hielo con dicitclohexilcarbodiimida (DCCD) (Sigma; concentración final 0,2 mM), que es capaz de inhibir todas las ATPasas con la excepción de la clase F_1F_0 (Sánchez, B., et al. 2006. Environ. Microbiol. 8, 1825–1833). Se midió la actividad de las muestras de membrana sin inhibidor y se usó como control de actividad de ATPasa total.

1.12. Medición del contenido de ATP intracelular

Se determinó el contenido de ATP intracelular de la cepa CECT30106 cultivada anaerobia o aeróbicamente por ensayo fluorimétrico en lisados celulares usando el kit de ensayo de ATP (Abcam Cambridge, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la cantidad de ATP presente en los lisados celulares obtenidos por sonicación se midió usando diluciones seriadas de un estándar de ATP que se correlacionó con unidades arbitrarias de bioluminiscencia para obtener una recta de calibración que permite calcular la molaridad de ATP. La bioluminiscencia de los estándares de ATP y de los lisados celulares se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Varian, Palo Alto, CA) con un tiempo de integración de 1 s. Se calcularon los valores de intensidad de bioluminiscencia de ATP a partir de la longitud de onda de emisión de 535 nm tras aplicar una longitud de onda de excitación de 380 nm. Los niveles de ATP se corrigieron por la concentración de proteína, que se estimó con un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL). Los resultados se expresaron como nmoles de ATP por mg de proteína total.

2. RESULTADOS

2.1 Generación de la cepa aerotolerante de *B. bifidum*.

La cepa CECT30105, que se denomina no mutante o parental salvaje (*wild type* o wt), se aisló de una biopsia de íleon de un individuo sano. Esta cepa, que también mostró un ligero fenotipo de aerotolerancia sin precedentes previos en la literatura, se sometió a mutagénesis al azar por radiación UV. Se procedió a seleccionar mutantes capaces de formar colonias sobre la superficie de placas de agar incubando las placas bajo una atmósfera normal (aerobiosis o aeróbica) a 37 C. Después de este procedimiento, los inventores fueron capaces de aislar una única colonia que se denominó CECT30106, que se identificó apropiadamente como *B. bifidum* después de la amplificación y secuenciación del gen de ADN 16S ribosómico. Es interesante señalar que tanto MRSC como BHI soportaron el crecimiento de la cepa CECT30106 en líquido, pero la presencia de colonias visibles en placas con agar solo se observó en agar-BHI

complementado con 1,8 % (p/v) de glucosa y 0,25 % (p/v) de cisteína (Figura 1). La cepa fue capaz de crecer hasta una DO600 nm de $2,36 \pm 0,17$ en cultivos líquidos estáticos (aerobiosis) y hasta valores de DO600nm de $1,34 \pm 0,28$ cuando cultivos de 200 mL se sometieron a una agitación constante en matraces de 500 mL (200 rpm; aireación).

El genoma de la cepa CECT30106 muestra los rasgos genéticos típicos de una bifidobacteria, tal como la presencia de la vía típica de fermentación de glucosa denominada “vía bifido”, un clúster de F₁F₀-ATP sintasa completo, o una hidrolasa de sales biliares, así como 141 genes implicados en el metabolismo de hidratos de carbono. Sin embargo, el 57 % de los genes no se asignaron a una categoría funcional específica que se corresponde con 528 genes que codifican proteínas hipotéticas. Dentro del genoma se detectaron genes que codifican homólogos de las enzimas de detoxificación de oxígeno, como BatA, BatB, proteína C y F de alquilhidroxiperóxido reductasa y proteínas de protoporfirinógeno oxidasa.

2.2. Comparación de genomas e identificación de polimorfismos de un solo nucleótido.

Se realizó el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para detectar mutaciones inducidas por UV en la cepa CECT30106A con respecto a la no mutante (wt o CECT30105), que podrían ser responsables de su fenotipo de aerotolerancia. Se identificaron veintiséis SNP en la cepa CECT30106 con respecto a la cepa CECT30105 no mutante (Tabla 1), estando tres de ellos situados en regiones intergénicas y el resto en marcos de lectura abiertos, que se correspondieron en la mayoría de los casos con proteínas hipotéticas. El resto de genes afectados por la radiación UV codificaron la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, una proteína que contiene repeticiones de TPR, una proteína de extrusión multi-antimicrobiano, la ADP-glucosa transglucosilasa, la isoleucil-ARNt sintetasa, una proteína ribosómica LSU y una proteína reguladora con similitud de BlastP con reguladores de la detección de arsénico.

CECT30105		SNP		Cambio triplete		Cambio de aminoácido		Función
Cóntigo	Posición	30105	30106	30105	30106	30105	30106	
1	234374	T	A	GGT	GGA	Thr	Ser	Proteína que contiene repetición de TPR
	234335	T	C	TGT	TGC	Thr	Ala	
	234327	G	A	CGC	CAC	Ala	Val	
	354599	T	C	-	-	-	-	Región intergénica
	354593	G	C	CCG	CCC	Arg	Gly	Proteína de extrusión multi-antimicrobiana
	354591	T	G	GTT	GGT	Asn	Thr	
	354558	T	G	GTA	GGA	Tyr	Ser	

CECT30105		SNP		Cambio triplete		Cambio de aminoácido		Función
Cóntigo	Posición	30105	30106	30105	30106	30105	30106	
	354554	T	G	GGT	GGG	Thr	Pro	(antiportador de Na(+)/fármaco)
	286680	T	G	GGT	GGG	Thr	Pro	Hipotética, relacionada con fosfatasa de amplia especificidad
	286387	A	C	CAC	CCC	Val	Gly	
	286357	T	C	CTC	CCC	Glu	Gly	
	259301	C	T	CCG	CTG	Pro	Leu	Proteína hipotética
2	41221	G	A	GGG	GGA	Pro	Ser	Proteína hipotética
5	25487	G	T	GGG	GGT	Pro	Thr	5,10-metilentetrahidrofolato reductasa
	25493	G	T	GGG	GGT	Pro	Thr	
	31646	A	C	CAC	CCC	Val	Gly	Proteína hipotética
	31666	C	T	CCC	TCC	Gly	Gly	
	88104	G	T	GGA	GTA	Ser	Tyr	ADP-glucosa transglucosilasa
	88114	G	T	GGG	GGT	Pro	Thr	
6	133884	A	C	ACC	CCC	Gly	Gly	Isoleucil-ARNt sintetasa
	133877	A	C	CAC	CCC	Val	Gly	
	133870	T	C	GTC	GCC	Asp	Gly	
	31339	G	T	-	-	-	-	Región intergénica
7	133871	T	G	AGT	AGG	Thr	Pro	Proteína ribosómica LSU
	31339	C	A	CAC	CAA	His	Gln	Proteína reguladora ArsR
9	63547	A	C	-	-	-	-	Región intergénica

Tabla 1. SNPs en el genoma de CECT30106 con respecto a la cepa CECT30105.

2.3 Cambios en los perfiles de expresión genética.

5 Se analizó la expresión diferencial de los genes entre las condiciones de crecimiento aerobias y anaerobias de la cepa CECT30106 por RNAseq. Este análisis mostró que en condiciones de aireación, cientos de genes se expresaron en exceso (553, FDR \leq 0,05), en particular varios implicados en la resistencia al oxígeno y reacciones redox (por ejemplo, NADPH nitrorreductasa insensible al oxígeno, tiorredoxina, proteínas C y

10 F de alquilhidroxiperóxido reductasa), la mayoría de los genes de la “vía bifido” y el operón de F₁F₀-ATPasa. En general, los diferentes perfiles de expresión génica de la cepa CECT30106 cultivados en aireación con respecto a la anaerobiosis permitieron el agrupamiento de los experimentos de RNASeq por condición usando un PCA no supervisado.

15

2.4. Enriquecimiento de vías enzimáticas diferencialmente expresadas.

El agrupamiento de los genes diferencialmente expresados entre las dos condiciones de crecimiento (aireación frente a anaerobiosis) en la cepa CECT30106 reveló cambios principalmente relacionados con el metabolismo central de la bacteria. Solo se tuvieron

en cuenta las vías con valores de FDR iguales o inferiores a 0,05 (Figura 2A). La elevada concentración de oxígeno en el medio de crecimiento aumentó la expresión de genes que pertenecen a las vías relacionadas con glicólisis/gluconeogénesis, utilización de hidratos de carbono, amino- y nucleótido azúcares, nicotinato y nicotinamida, energía, metabolismo de xenobióticos (fármacos, Figura 2B) y metabolismo microbiano, junto con otros relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios. En términos de vías con expresión disminuída, el número fue notablemente más bajo y afectó principalmente a rutas metabólicas y de biosíntesis de metabolitos secundarios. Particularmente, la mayoría de los genes de la “vía bifido” se expresaron por exceso, que incluyen la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD y la acetato kinasa, sugiriendo que el crecimiento en aireación fuerza a la bacteria a sintetizar más ATP y agentes rédox para alimentar la maquinaria celular responsable de superar el estrés oxidativo. Esta observación se reforzó por el hecho de que el gen que codifica la L-lactato deshidrogenasa vio reducida su expresión 2,4 veces en aireación en comparación con la anaerobiosis. Muchos otros genes que codifican enzimas cuyas actividades alimentan la vía central de obtención de energía se sobre-expresaron, aunque los genes que codifican muchas enzimas glucolíticas y transportadores de azúcar se reprimieron por oxígeno. Finalmente, los genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de componentes asociados a la superficie y estructurales, tales como peptidoglicano, ácidos teicoicos y lípidos, se vieron afectados por la presencia de oxígeno durante el de crecimiento de CECT30106.

2.5. Promotores de genes sobre-expresados que comparten un motivo genético.

Se llevó a cabo un análisis para identificar motivos compartidos por los promotores de los genes más significativamente sobre-expresados en la cepa CECT30106 cultivados en aerobiosis. Se seleccionaron dieciséis promotores de genes relacionados con el fenotipo de aerotolerancia de esta cepa. Once de estos 16 promotores compartieron un motivo común (GAAAGGA (SEQ ID NO: 1); valor $e = 0,0031$) a una distancia entre 12 y 31 nucleótidos del codón de iniciación. Este hecho se asoció a la presencia de una proteína ribosómica y un regulador genético en el que los SNP inducidos por radiación UV determinaron un cambio de aminoácido en la secuencia codificante de la proteína final (Figure 3), y se propone este motivo como diana de los dos reguladores genéticos mutados. En particular, los genes que codifican la proteína C y F de alquilhidroperóxido reductasa, con función conocida en la desintoxicación del peróxido de hidrógeno endógeno, estuvieron entre los genes más regulados por incremento de su expresión (histograma de la figura). Un simple análisis de secuencias mostró que estas proteínas

no están presentes en todas las especies de *Bifidobacterium*, y su regulación por aumento de su expresión parece crucial para lograr la aerotolerancia.

2.6 Cambios fisiológicos y bioquímicos en respuesta al oxígeno.

5 Para corroborar algunos de los resultados obtenidos después del análisis global de la expresión genética por RNASeq, se realizaron diferentes pruebas bioquímicas y enzimáticas en la cepa CECT30106 cultivada en condiciones de aireación, aerobias o anaerobias. En primer lugar, la concentración de ATP intracelular en CECT30106, medida como los nmoles de ATP normalizados por los mg de proteína citoplasmática
10 total, fue significativamente más alta en aireación que en aerobiosis o anaerobiosis (Figure 4A). En segundo lugar, la relación rédox calculada a partir de los valores de fluorescencia de los cofactores FAD⁺ y NADH no mostró cambios perceptibles entre las tres condiciones, aunque las señales individuales de FAD⁺ y NADH disminuyeron en las condiciones aerobias y de aireación (Figura 4B). Los presentes inventores finalmente
15 midieron la actividad de ATPasa tipo F presente en las membranas de *B. bifidum*. Para ello, los inventores incluyeron el inhibidor de tipo F₁F₀ N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) en los experimentos (Solioz, 1984. Trends Biochem. Sci. 9, 309–312). No se encontraron diferencias en la actividad total o en la actividad de ATPasa tipo F entre las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (Figura 4C), sugiriendo que aunque todos los
20 genes comprendidos en el clúster de F₁F₀-ATPasa se encontraron sobre-expresados mediante la técnica de RNASeq, esto no se tradujo en una actividad más alta, al menos en nuestras condiciones experimentales.

Ejemplo 2. Propiedades tecnológicas de cepas de *Bifidobacterium bifidum*.

25

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Bacterias y condiciones de cultivo

En este estudio se han empleado 3 cepas de *Bifidobacterium bifidum* cuyos códigos y
30 origen se recogen en la Tabla 2.

C. IPLA	C. CECT	Observaciones
LMG11041	-	Cepa tipo (= ATCC29521 ^T) adquirida en colección belga
IPLA60008	CECT30105	Cepa parental, nuevo aislado de biopsia humana
IPLA60003	CECT30106	Cepa derivada, adaptada en laboratorio a O ₂

Tabla 2. Códigos de las cepas de *B. bifidum* utilizadas en este estudio

La cepa *B. bifidum* IPLA60008 fue depositada bajo el tratado de Budapest el 26 de mayo de 2020 en la Colección española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito, localizada en Building 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, España. El número de depósito asignado fue el CECT30105. El depositante de la cepa fue el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

De forma rutinaria, salvo que se especifique otro medio, las cepas LMG11041 e IPLA60008 se crecieron en MRSc (MRS de Biokar + 0,25% de L-cysteine-HCl monohydrate) a partir de los stocks almacenados a -80°C los cuales se sembraron en la superficie de agar-MRSc y se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis en la cabina Mac500 (Down Whitley Scientific, West Yorkshire, UK) con una atmósfera de 10% H₂, 10% CO₂ and 80% N₂, durante al menos 3 días. Posteriormente, se picaron colonias de cada cepa para inocular 10 ml de caldo MRSc que se incubó en las mismas condiciones durante una noche. Sin embargo, la cepa CECT30106 se descongeló directamente en el medio de cultivo BHIGc (BHI de Oxoid, + 2% glucosa + 0,25 % L-cysteine-HCl monohydrate), antes de proceder a inocular 10 mL de medio fresco correspondiente a cada cepa para generar el pre-cultivo.

Los pre-cultivos líquidos se utilizaron para inocular diferentes volúmenes de distintos medios según se indica en los apartados siguientes, con el objetivo de estandarizar los procesos. En general, los recuentos para las cepas LMG11041 e CECT30105 se hicieron en agar-MRSc y para la cepa CECT30106 en agar-BHIGc.

25 **1.2. Supervivencia a la congelación y liofilización**

Con este diseño experimental pretendemos comprobar el comportamiento de las tres cepas en estudio frente a procesos tecnológicos utilizados para la obtención de biomasa de cultivos bacterianos que, posteriormente, podrán ser utilizados en empresas del sector alimentario, farmacéutico o biotecnológico. Se ha estudiado la resistencia, y capacidad posterior para crecer en presencia de O₂, de las tres cepas frente a la congelación (a -80°C) y frente a la liofilización (que también incluye un paso previo de congelación a -80°C). Para comparar los resultados se han utilizado cultivos frescos (activos) estandarizados. Como material de partida se utilizaron 50 ml del medio correspondiente a cada cepa, que se inocularon (2%) con los pre-cultivos descritos en el apartado anterior, los cuales se incubaron en condiciones de anaerobiosis estándar durante 19±1 horas. Los cultivos crecidos de 50 mL fueron el inóculo utilizado para los

siguientes procedimientos, los cuales se realizaron por triplicado (3 replicados biológicos).

5 Para llevar a cabo los “cultivos frescos” (F) se procedió a inocular (1%) 2 tubos con 10 mL de medio fresco: el tubo FA se incubó en condiciones de anaerobiosis y el tubo FO se incubó a 37°C en una estufa estándar (por tanto, en presencia de aire y oxígeno). Tras 24 horas de incubación se procedió al recuento de los viables, utilizando los medios correspondientes, incubándose las placas en condiciones de anaerobiosis durante al menos 3 días.

10

Para llevar a cabo los “cultivos tras la congelación” (C) se utilizaron 24 mL del cultivo de partida que se lavaron con PBS y se resuspendieron en 2,4 mL (factor concentración x10) del medio correspondiente con 30% de glicerol como agente crioprotector procediéndose a su congelación a -80°C (congelador New Brunswick U500) durante 24 horas. Tras este periodo, los tubos se descongelaron a temperatura ambiente; por un lado, se procedió a la siembra directa tras la congelación y, por otro, se procedió a inocular (1%) 2 tubos con 10 mL de medio fresco: el tubo CA se incubó en condiciones de anaerobiosis y el tubo CO se incubó a 37°C en una estufa estándar. Tras 24 horas de incubación se procedió al recuento de los viables, utilizando los medios correspondientes, incubándose las placas en condiciones de anaerobiosis durante al menos 3 días.

15

20

25

Para llevar a cabo los “cultivos tras la liofilización” (L) se utilizaron los 24 mL restantes del cultivo de partida que se lavaron con PBS y se resuspendieron en 2,4 mL (factor concentración x10) de leche (BD skim-milk, Difco, reconstituida al 11% y tindalizada) como agente crioprotector procediéndose a su congelación a -80°C durante 24 horas. Tras este periodo, los tubos se liofilizaron en un liofilizador (Freezemobile 12EL, Virtis) durante 24 horas adicionales. Posteriormente, los líofilos se resuspendieron en el mismo volumen de partida (2,4 mL) de PBS; por un lado, se procedió a la siembra directa tras la liofilización y, por otro, se procedió a inocular (1%) 2 tubos con 10 mL de medio fresco: el tubo LA se incubó en condiciones de anaerobiosis y el tubo LO se incubó a 37°C en una estufa estándar. Tras 24 horas de incubación se procedió al recuento de los viables, utilizando los medios correspondientes, incubándose las placas en condiciones de anaerobiosis durante al menos 3 días.

30

35

En todos los casos, se procedió a realizar los recuentos de los pre-cultivos (= muestra “inicial”), así como de los cultivos directos tras las condiciones de estrés (= muestra “tras x tratamiento”) o tras ser incubados 24 horas en presencia de oxígeno (= muestra “cultivo-O₂”) o en ausencia de oxígeno (= muestra “cultivo –ANA), como se describió anteriormente.

1.3. Fermentación láctea

Se utilizó leche esterilizada semidesnatada de vaca comercial (Alimerka S.A., Lugo de Llanera, Asturias) para evaluar la capacidad de fermentación y supervivencia en el producto fermentado de las 3 cepas en estudio. Para ello, los pre-cultivos de las bacterias crecidos durante una noche se utilizaron para inocular (2%) 100 mL de MRSc fresco que se incubó durante 19±1 horas. Los cultivos se lavaron con 50 mL de PBS estéril y se resuspendieron en 10 mL de leche (factor de concentración del cultivo inicial x10) con los cuales se inocularon 100 mL de leche comercial. Tras su correcta homogenización por agitación, se repartieron en 10x10 tubos Falcon de 10 mL, 9 de los cuales se incubaron en un baño a 37°C durante 22 ± 2 horas (el tubo número 10 se utilizó como muestra tiempo inicio fermentación = IF). Trascorrido ese tiempo, tras comprobar si se había formado un coágulo, se paró la fermentación dejando enfriar a temperatura ambiente durante 2 horas antes de introducir 8 tubos en una cámara refrigerada a 8°C (el tubo número 9 se utilizó como muestra tiempo final fermentación = FF). Para el seguimiento de la vida útil de las leches fermentadas se utilizó un tubo por semana durante aproximadamente 1 mes (muestras d4, d8, d11, d15, d18, d21, d24 y d27).

Para el análisis de las muestras recogidas en los 10 puntos de muestreo indicados anteriormente, se separó 1 mL en un tubo eppendorf estéril para proceder a los recuentos y el resto para medir el pH utilizando un pH-metro (Crison basic 20). Para los recuentos se realizaron diluciones seriadas en Ringer ¼ (Merck) las cuales se sembraron en la superficie de agar-MRSc (cepas LMG11041 e CECT30105) o en agar-BHlc (cepa CECT30106) y se incubaron durante al menos 3 días en las condiciones de anaerobiosis descritas anteriormente. Finalmente, tras realizar los recuentos de las placas de cada punto de muestreo, se picaron de forma aleatoria colonias de algunas de las placas y de los puntos de muestreo para confirmar la identidad de las cepas. Para ello se extrajo ADN directamente de las colonias, siguiendo métodos estandarizados en el grupo utilizando el kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma, St. Louis, MO), y se procedió a la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S

utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' [SEQ ID NO: 4]) y 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3' [SEQ ID NO: 5]). Se realizó la PCR en las siguientes condiciones: paso inicial a 95°C durante 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 45 s, y 72°C durante 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 10 minutos y 4°C para mantenimiento. Finalmente, los productos de amplificación se secuenciaron en Macrogen y las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos Genbank utilizando la herramienta Blastn (NCBI, *National Center of Biotechnology Information*).

2. RESULTADOS

2.1. Supervivencia a la congelación y liofilización

En la Figura 5 se muestra el número de viables (Log CFU/ml) recuperados en cada una de las condiciones experimentales descritas en el apartado 1.2 anterior.

Los “cultivos frescos”, es decir realizados a partir de un pre-cultivo estandarizado activo, muestran que únicamente la cepa CECT30106 adaptada en el laboratorio a O₂ es capaz de crecer en condiciones de aerobiosis dado que no se han detectado viables para las otras dos cepas (nivel de detección ≤ 100 CFU/mL).

El estudio de viabilidad de las tres cepas tras la congelación muestra similares resultados respecto al cultivo inicial de referencia dado que no se detectaron variaciones en el recuento de los viables obtenidos de las cepas (stock concentrado x10) antes de liofilizar (8,67±0,32, 7,86±0,82 y 7,92±0,80 Log CFU/mL, para CECT30106, CECT30105 y LMG11041, respectivamente) respecto a los obtenidos tras la siembra directa de los stocks tras su descongelación (8,57±0,37, 7,95±0,74 y 8,09±0,86 Log CFU/mL, respectivamente). Cuando estos stocks congelados se utilizaron para inocular nuevo medio fresco, se observó que en condiciones de anaerobiosis alcanzaron recuentos similares (7,65±0,80, 7,14±0,38 y 6,86±0,60 Log CFU/mL, respectivamente) a los del cultivo frescos de referencia (8,19±0,31, 7,10±0,02 y 7,51±0,14 Log CFU/mL, respectivamente). De nuevo cuando los cultivos generados a partir del inóculo congelado se incubaron en presencia de oxígeno, la única cepa capaz de crecer y conseguir un número similar de viables (7,48±0,99 Log CFU/mL) al del incubado en anaerobiosis fue la CECT30106.

Finalmente, el estudio de supervivencia a la liofilización y capacidad de crecimiento posterior en presencia y ausencia de oxígeno mostró resultados similares a los de la congelación para las cepas CECT30106 y CECT30105 (viables stock concentrado x10 antes de liofilizar $8,46\pm 0,18$ y $7,67\pm 0,82$; viables tras siembra directa de los liófilos $8,22\pm 0,41$ y $7,54\pm 0,82$; viables tras cultivo después de liofilizar e incubación en anaerobiosis $7,46\pm 0,19$ y $7,05\pm 0,61$) siendo la adaptada a O₂ la única capaz de crecer en presencia del mismo ($7,20\pm 0,27$). En el caso de la cepa LMG11041 no se han conseguido resultados reproducibles con respecto a los viables tras la liofilización (en dos replicados biológicos los recuentos estuvieron por debajo del límite de detección (2 Log CFU/mL) y en otro se obtuvieron 8.27 Log CFU/mL). Sin embargo, los 3 liófilos de esta cepa sí fueron capaces de crecer tras ser inoculados en medio fresco e incubados en anaerobiosis mientras que, concordando con los resultados obtenidos en los otros procedimientos experimentales, no fue capaz de crecer en presencia de oxígeno.

En resumen, las cepas CECT30106 y CECT30105 son capaces de sobrevivir a los procesos de congelación y liofilización utilizados en este estudio, y únicamente la cepa que ha sido adaptada en el laboratorio a oxígeno, CECT30106, es capaz de crecer en presencia de éste tras haber sido sometida a procesos de congelación y liofilización. La cepa de colección LMG11041 resiste bien la congelación, pero no se obtuvieron datos concluyentes sobre la liofilización, y en ningún caso es capaz de crecer en presencia de oxígeno.

2.2. Fermentaciones lácteas

En la Figura 6 se muestran los valores medios (de triplicados) del pH, recuentos y supervivencia tras finalizar el periodo de estudio de vida útil (27 días) en refrigeración de las leches fermentadas con las tres cepas de *B. bifidum* en estudio.

Respecto a la capacidad de acidificación de las cepas en leche, cabe destacar que las cepas CECT30106 (adaptada a O₂) y CECT30105 (parental wt) alcanzaron valores de pH más bajos al final de la fermentación que la cepa de colección LMG11041 ($4,45\pm 0,01$, $4,56\pm 0,17$ y $5,04\pm 0,20$, respectivamente), la cual mantuvo los valores de pH más altos durante todo el periodo de conservación en refrigeración (Figura 6). Los 10 tubos con la leche esterilizada control (no inoculada) mantuvieron sus valores de pH estables ($6,62\pm 0,01$) durante todo el periodo de estudio y no se detectaron recuentos de microorganismos en MRSc (límite de detección 10 CFU/mL) en ninguno de los puntos de muestreo.

Respecto los recuentos obtenidos durante la fermentación (Figura 6), la cepa adaptada a O₂ (CECT30106) fue capaz de incrementar cerca de una unidad logarítmica (FF – IF: 0,832 Log CFU/mL) los recuentos tras su inóculo en leche, mientras que su cepa parental (CECT30105 que es capaz de crecer en microaerofilia) lo hizo ligeramente (0,232 Log CFU/mL) y la cepa de colección (anaerobia estricta) no fue capaz de incrementar el número de viables respecto a los inoculados (-0,031 Log CFU/mL), a pesar de partir con unos recuentos en la leche recién inoculada ligeramente mayores (IF: 7,71±0,35 Log CFU/mL) respecto a las cepas obtenidas en el IPLA (IF: 7,26±0,24 y 7,10±0,18 Log CFU/mL para CECT30106 y CECT30105, respectivamente).

La evolución de las leches fermentadas almacenadas en refrigeración durante 27 días muestra, como cabía esperar, un descenso continuado en el recuento de los viables en los productos fermentados. Sin embargo, a pesar de la mayor acidez de las leches fermentadas con las cepas CECT30106 y CECT30105, lo que supone una condición de estrés adicional para las mismas, el descenso en el número de viables sigue la misma tendencia que la cepa de colección LMG11041. El recuento (Log CFU/mL) final de las células que sobrevivieron tras 27 días de almacenamiento en frío fueron: 3,87± 0,19, 2,16±0,45 y 3,05±0,01 para CECT30106, CECT30105 y LMG11041, respectivamente. Teniendo en cuenta el número inicial de células del que se partía tras la fermentación, estos datos muestran que el porcentaje de supervivencia de la cepa CECT30106 fue superior al de las otras dos cepas en estudio (Figura 6).

En general, los datos obtenidos en este estudio muestran que las cepas de *B. bifidum* obtenidas en el IPLA son capaces de crecer y fermentar la leche, consiguiendo la coagulación de la misma al generar un valor de pH igual o inferior al punto isoeléctrico de la caseína. Por ello, las leches fermentadas con estas dos cepas presentaron una consistencia semi-sólida, mientras que las inoculadas con la cepa de colección eran líquidas. Esta cepa (LMG11041) no fue capaz de crecer en leche, aunque la bajada de pH indica que muestra cierta actividad metabólica para mantener su viabilidad en estas condiciones. Finalmente, las tres cepas fueron capaces de mantener el número de viables por encima de la dosis de mínima recomendada (7 Log CFU/mL o g) por algunos autores para cepas probióticas durante al menos 4 días en refrigeración tras la fermentación: 7,93±0,62, 7,61±1,22 y 7,43±1,06 para CECT30106, CECT30105 y LMG11041, respectivamente.

Finalmente, para comprobar que los microorganismos que recuperamos viables de las leches fermentadas recogidas en los distintos puntos de muestreo se correspondían con la especie *B. bifidum*, se recogieron al azar 17 colonias (Tabla 3) de las cuales se aisló ADN para llevar a cabo la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S.

5

Leche fermentada con CECT30106	Leche fermentada con CECT30105	Leche fermentada con LMG11041
3BIT4A-227 (d27)	3BIT4-INDF (FF)	LMG-1F (FF)
3BIT4A-1F (FF)	3BIT4-227 (d27)	LMG-2F (FF)
3BIT4A-2F (FF)	3BIT4-3NF (FF)	LMG-3NF (FF)
3BIT4A-3F (FF)	3BIT4-1F (FF)	LMG-INDF (FF)
3BIT4A-3NF (FF)	3BIT4-2F (FF)	LMG-2NF (FF)
3BIT4A-327 (d27)		
3BIT4A-INDF (F)		

Tabla 3. Colonias aisladas de las placas de recuentos de las leches fermentadas en distintos puntos de muestreo (final de fermentación = FF y día 27) los cuales se muestran entre paréntesis.

10

Tras la secuenciación de los productos de PCR se confirmó que todas las cepas pertenecieron a la especie *B. bifidum* mostrando un 100% de cobertura (coverage) y 100% de identidad con las secuencias de cepas depositadas en la base de datos Genbank (NCIB) y con la de las cepas originales.

15

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. que comprende un promotor que comprende la secuencia GAAAGGA (SEQ ID NO: 1) a una distancia de entre 12 y 31 nucleótidos del codón de inicio responsable de la transcripción de un gen.
2. Microorganismo según la reivindicación 1, en donde el microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. es *Bifidobacterium bifidum*.
3. Microorganismo según la reivindicación 2, en donde el microorganismo *B. bifidum* es la cepa *B. bifidum* con número de depósito CECT30106.
4. Microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el microorganismo comprende sobre-expresados los genes que codifican la proteína alquil hidroperóxido reductasa C y/o alquil hidroperóxido reductasa F con respecto a una bacteria del género *Bifidobacterium* spp. no aerotolerante.
5. Composición que comprende un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Composición según la reivindicación 5, en donde la composición comprende adicionalmente, un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en una levadura y una bacteria ácido-láctica distinta de *Bifidobacterium* spp.
7. Composición según la reivindicación 6, en donde la composición es una composición nutricional funcional, o un nutraceutico.
8. Composición según la reivindicación 7, en donde la composición nutricional funcional es un alimento o un suplemento nutricional.
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8, en donde el alimento es un producto lácteo.
10. Composición según la reivindicación 9, en donde el producto lácteo se selecciona de la lista que consiste en leche, queso, yogurt y kéfir.

11. Uso de un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición según la reivindicación 5 o 6, en la producción de derivados lácteos fermentados.
- 5 12. Un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición según la reivindicación 5 o 6, para su uso como medicamento.
13. Un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición según la reivindicación 5 o 6, para su uso en el tratamiento y/o prevención del estreñimiento, de una infección por *Helicobacter pylori*, del síndrome del colon irritable (SCI), colitis ulcerosa, pouchitis tras sufrir una cirugía por colitis ulcerosa, una infección de las vías respiratorias y una diarrea.
- 10 14. Método para producir un producto lácteo fermentado que comprende incubar un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición según la reivindicación 5 o 6, con un producto lácteo en las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo el proceso industrial de la fermentación.
- 15 15. Método para conferir aerotolerancia a un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. que comprende transformar un microorganismo del género *Bifidobacterium* spp. no tolerante al oxígeno con un promotor que comprende la secuencia GAAAGGA (SEQ ID NO: 1) a una distancia de entre 12 y 31 nucleótidos del codón de comienzo responsable de la transcripción de un gen.
- 20

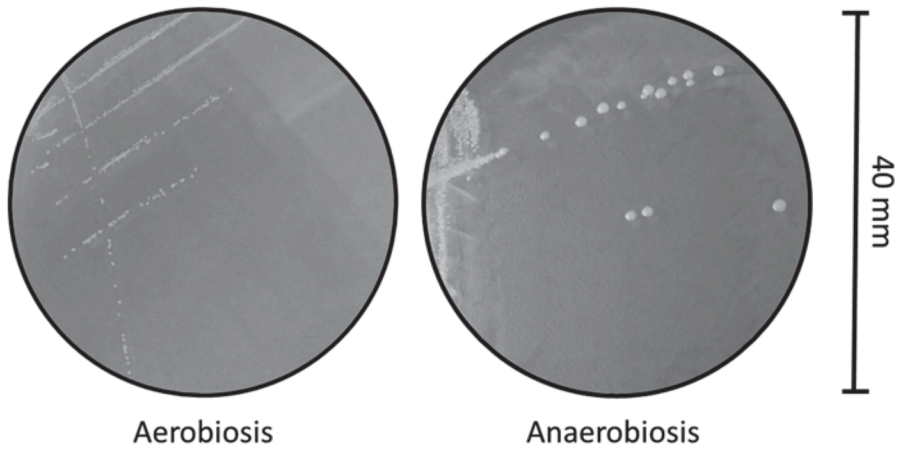


FIG. 1

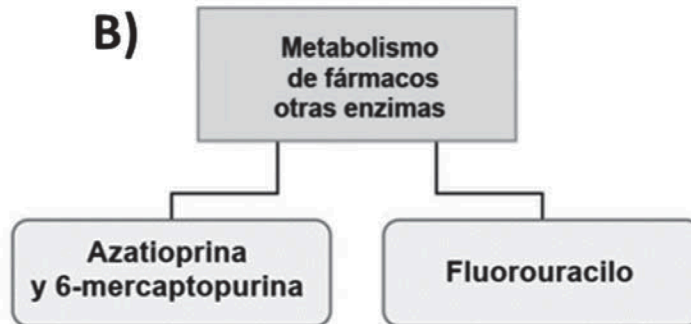
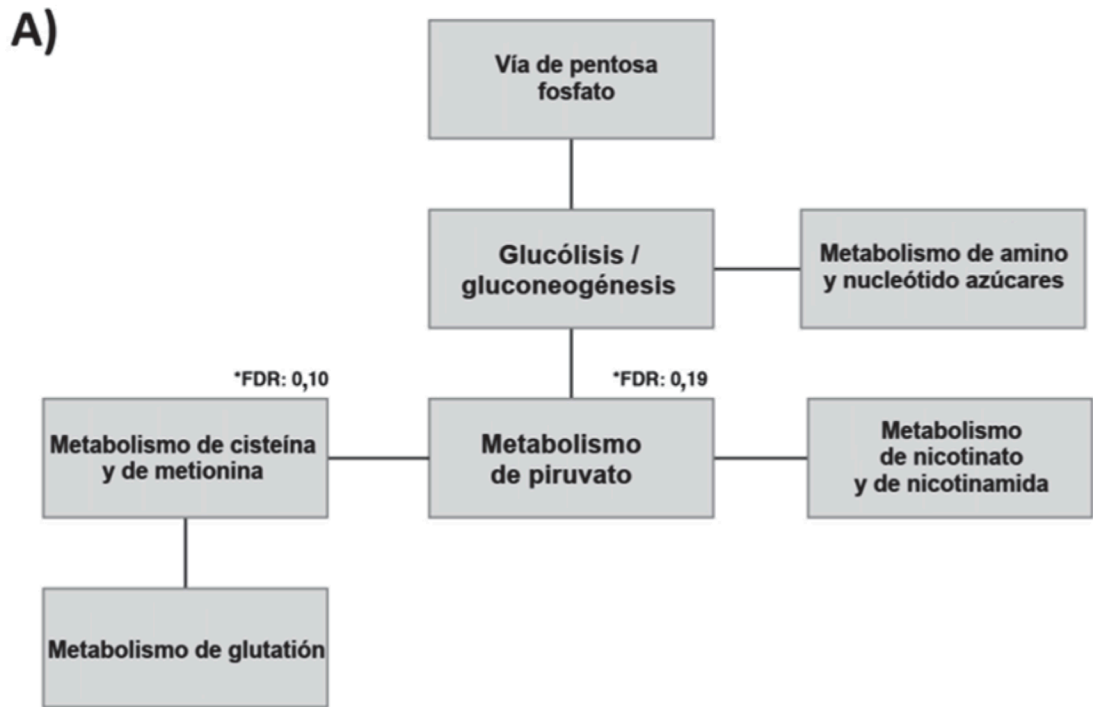


FIG. 2

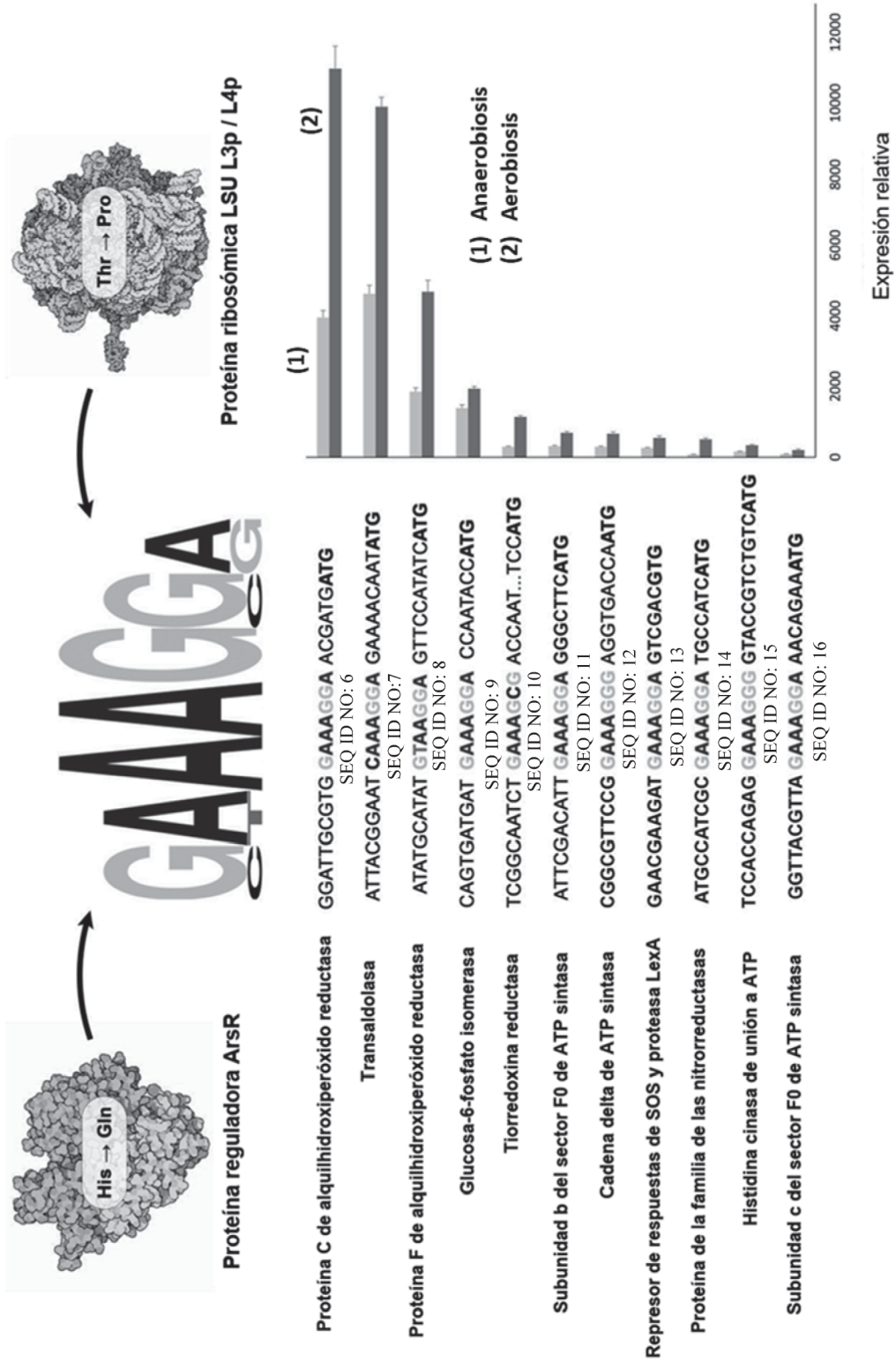


FIG. 3

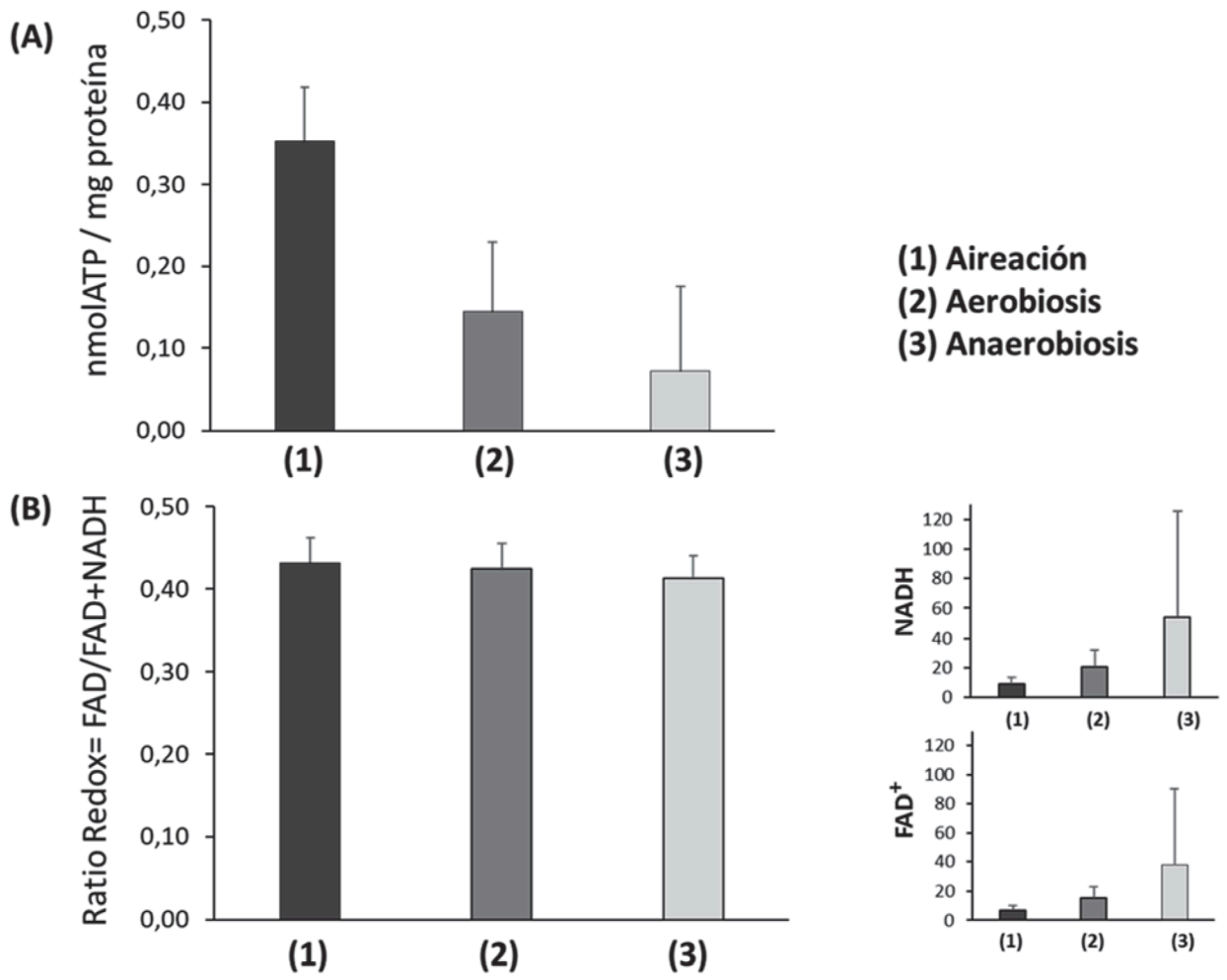


FIG. 4

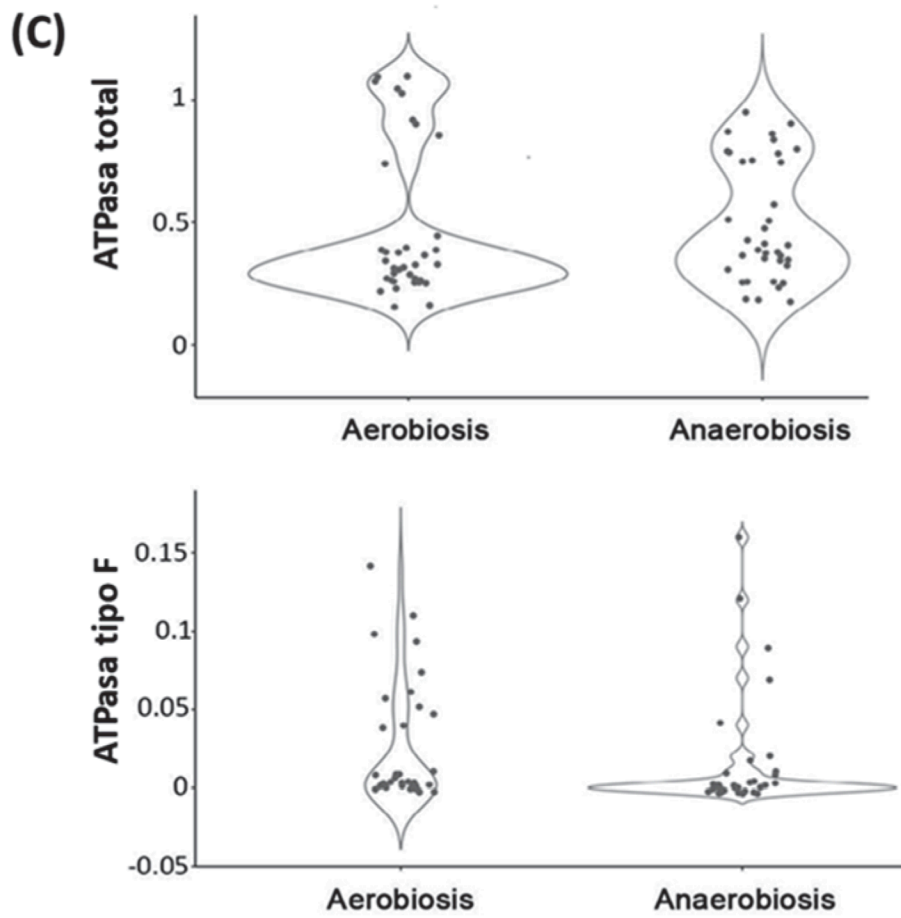


FIG. 4 (Continuación)

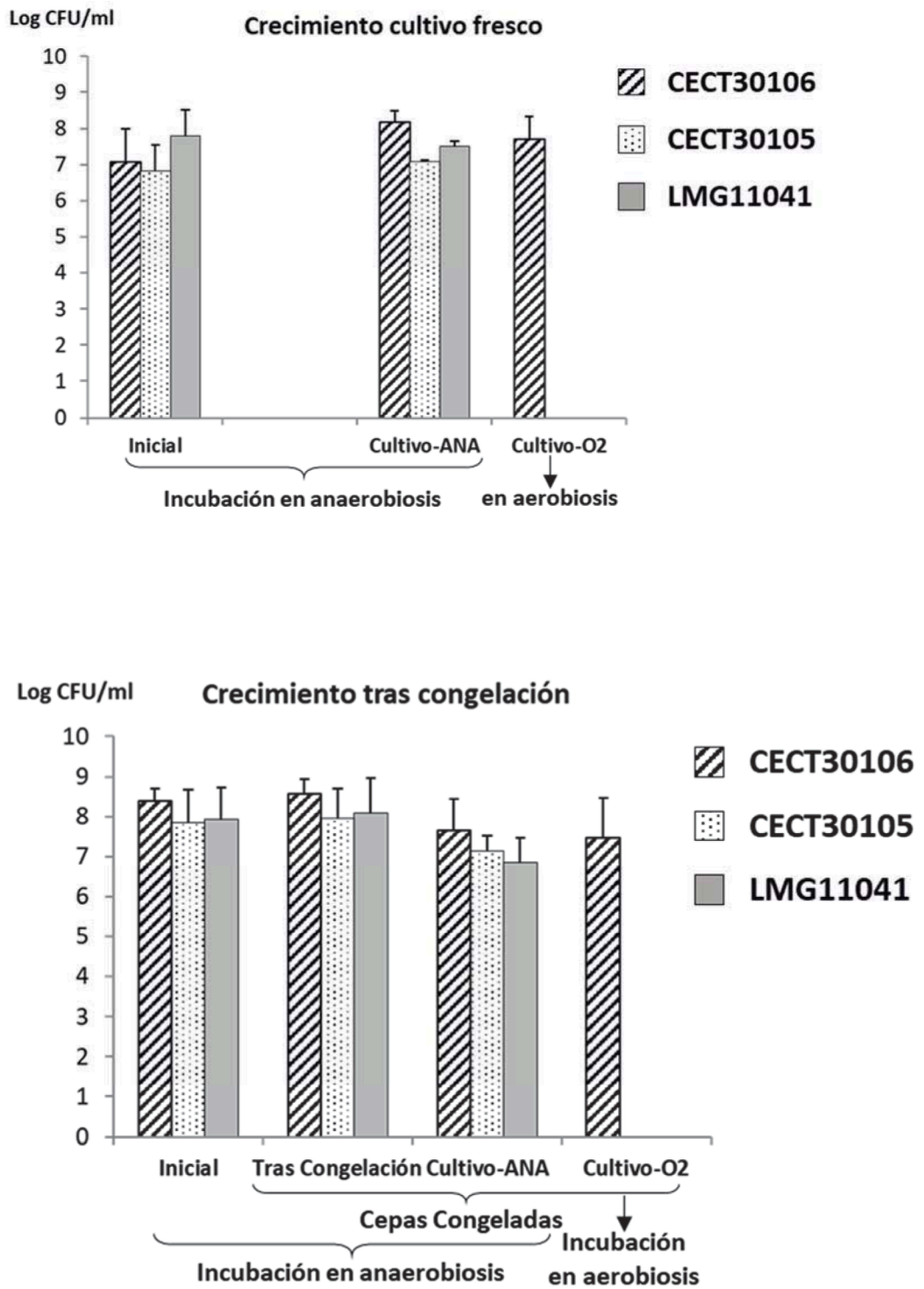


FIG. 5

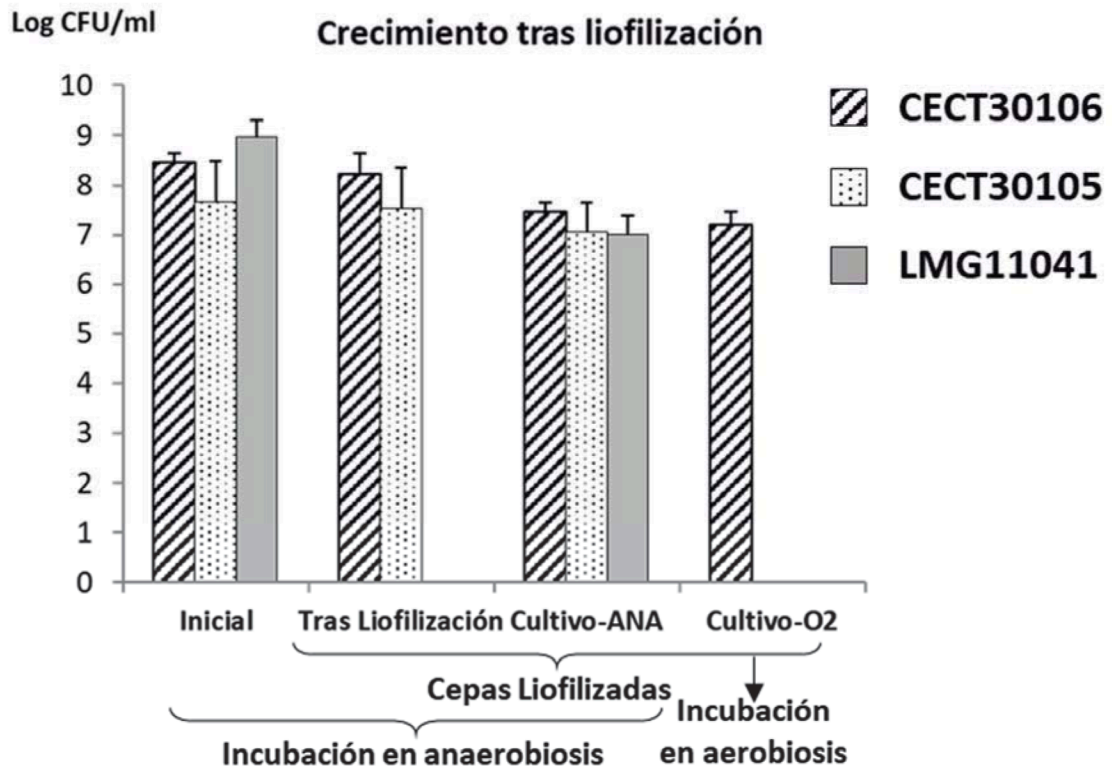


FIG. 5 Continuación

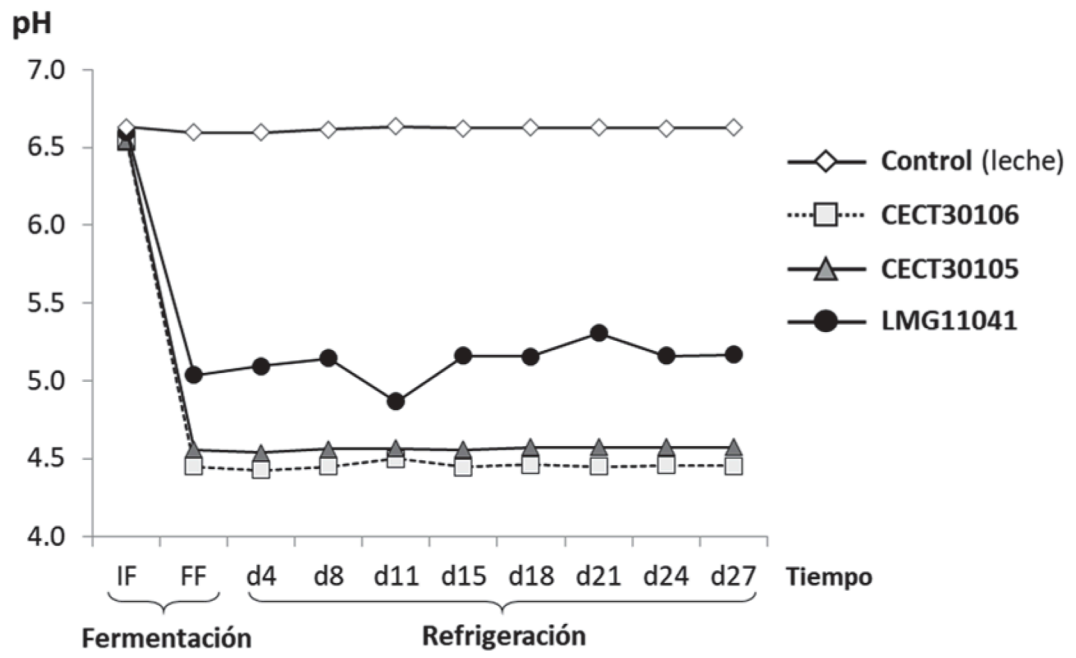


FIG. 6

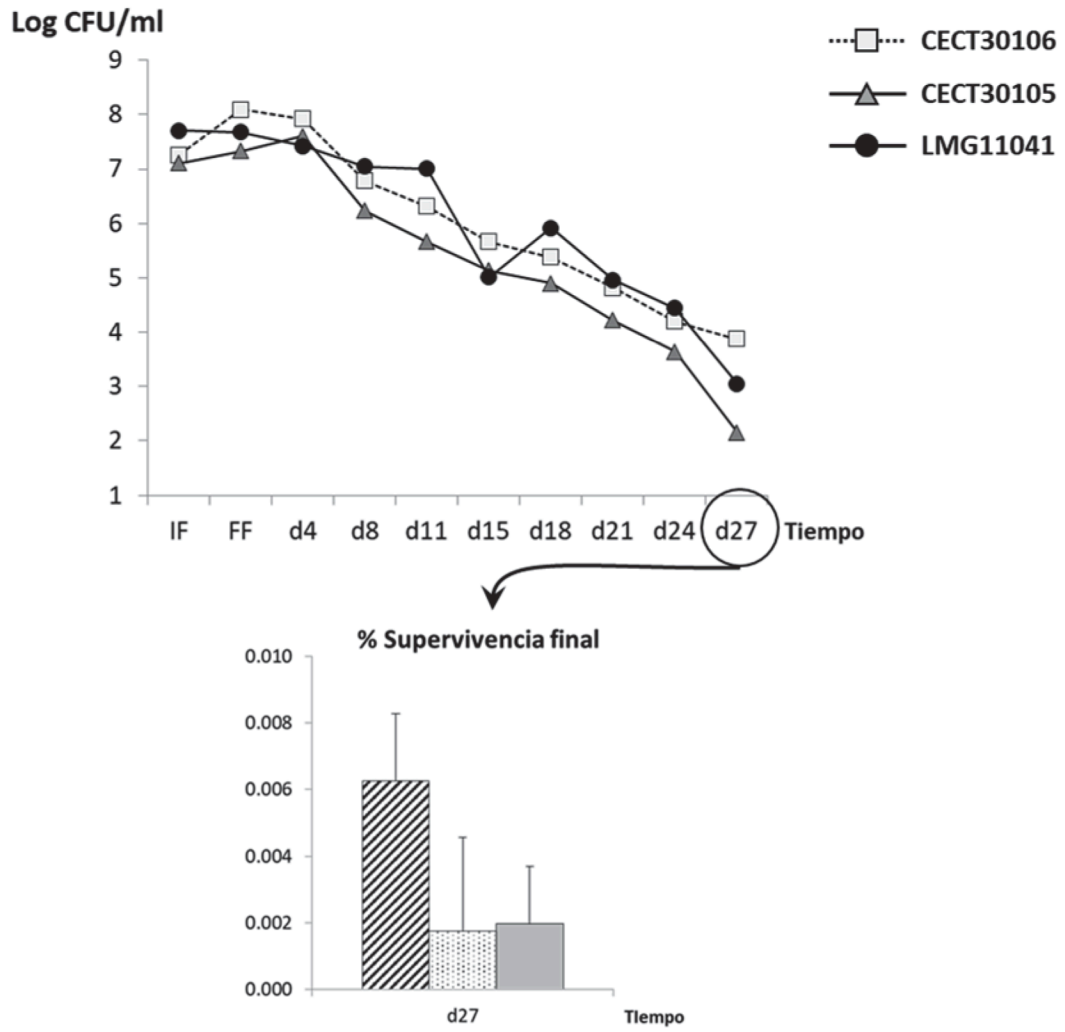


FIG. 6 (Continuación)



21 N.º solicitud: 202031081

22 Fecha de presentación de la solicitud: 28.10.2020

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SIMPSON P J et al. "Intrinsic tolerance of <i>Bifidobacterium</i> species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage". Journal of Applied Microbiology, Wiley-Blackwell Publishing Ltd, GB. , 01/01/2005, Vol. 99, Nº 3, Páginas 493 - 501 [en línea][recuperado el 03/08/2021], ISSN 1364-5072, <DOI: doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02648.x>. (ver Tabla 1)	1-14
A	RUIZ L et al. "Molecular clues to understand the aerotolerance phenotype of <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> ". Applied and Environmental Microbiology February 2012 American Society for Microbiology usa. , 31/01/2012, Vol. 78, Nº 3, Páginas 644 - 650 [en línea][recuperado el 22/07/2021]. , ISSN 0099-2240 (print) ISSN 1098-5336 (electronic), <DOI: doi:10.1128/AEM.05455-11>. todo el documento.	1-14
A	XIAO MAN et al. "Oxidative stress-related responses of <i>Bifidobacterium longum</i> subsp <i>longum</i> BBMN68 at the proteomic level after exposure to oxygen". Microbiology (Reading) JUN 2011, 31/05/2011, Vol. 157, Nº Part 6, Páginas 1573-1588 [en línea][recuperado el 02/08/2021]. , ISSN 1350-0872(print) ISSN 1465-2080(electronic), <DOI: doi:10.1099/mic.0.044297-0>. todo el documento.	1-14
A	VICTOR LADERO AND BORJA SANCHEZ. "Molecular and technological insights into the aerotolerance of anaerobic probiotics: examples from bifidobacteria". Current Opinion in Food Science, 27/03/2017, Vol. 14, Páginas 110-115 [en línea][recuperado el 22/07/2021]. , <DOI: dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.03.002>. todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-14

Fecha de realización del informe
04.08.2021

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)
A23C9/127 (2006.01)
A61K35/745 (2015.01)
A61P1/00 (2006.01)
C12R1/01 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A23C, A61K, A61P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, Compendex/EI y Bases de Datos TXT