(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 803 748**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/36 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2016** **PCT/EP2016/076064**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017** **WO17072296**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2016** **E 16787891 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020** **EP 3237603**

(54) Título: **Método de adaptación**

(30) Prioridad:

28.10.2015 GB 201519087

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2021

(73) Titular/es:

METABOGEN AB (100.0%)
Erik Dahlbergsgatan 11A
411 26 Gothenburg, SE

(72) Inventor/es:

KHAN, MUHAMMAD-TANWEER y
BÄCKHED, FREDRIK

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 803 748 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de adaptación

Campo de la invención

La presente invención se refiere, generalmente, al crecimiento de bacterias. Más específicamente, la invención se refiere a un método para la adaptación al ambiente oxidante de microorganismos anaerobios y su uso en el desarrollo de nuevos probióticos. También se proporcionan cepas nuevas (adaptadas) obtenidas mediante los métodos de la invención.

Antecedentes de la invención

La microbiota del intestino adulto consiste en hasta 100 billones de microorganismos, equivalente a diez veces nuestra cantidad total de células somáticas y germinales. Los genomas colectivos de nuestros microbios intestinales (microbioma) pueden contener una cantidad de genes 150 veces mayor que nuestro propio genoma y dotarnos de capacidades fisiológicas que no hemos tenido que desarrollar por nosotros mismos. Sin embargo, estas comunidades siguen en gran parte sin haber sido estudiadas, dejando casi totalmente desconocida su influencia sobre el desarrollo, la fisiología, la inmunidad, la nutrición y la salud de los humanos. La comunidad microbiana tiene una inmensa capacidad para influir en la biología del hospedador y es fundamental para el desarrollo de nuestro sistema inmunológico, la capacidad de procesar polisacáridos de la dieta por lo demás indigeribles, además de ser una fuente de producción de vitaminas y hormonas, etc. Las comunidades microbianas en el intestino grueso tienen funciones vitales en la regulación de la salud intestinal y en la patogénesis de varias enfermedades.

La microbiología tradicional se ha centrado en el estudio de las especies individuales como unidades aisladas. Sin embargo, muchas, si no la mayoría, nunca han sido aisladas exitosamente como ejemplares viables para el análisis, posiblemente debido a que su crecimiento es dependiente de un ambiente microbiano específico que no se ha reproducido experimentalmente. Los avances en las tecnologías de secuenciación de ADN han creado un nuevo campo de investigación, denominado metagenómica, que permite el examen exhaustivo de las comunidades microbianas, incluso las que comprenden organismos no cultivables. En lugar de examinar el genoma de una cepa bacteriana individual que ha sido cultivada en un laboratorio, el enfoque metagenómico permite el análisis de material genético derivado de comunidades microbianas completas cultivadas a partir de ambientes naturales.

El microbioma del intestino humano sirve como fuente de microbios beneficiosos, probióticos potenciales. A pesar de tanto prevenir como favorecer papeles de la microbiota intestinal en enfermedades tales como la inflamación intestinal, la enfermedad cardiovascular, la diabetes y el trastorno del espectro del autismo, ningún tratamiento disponible contiene probióticos novedosos o los llamados probióticos de nueva generación, como lo indican varios estudios metagenómicos. Incluso si se aíslan con éxito, muchos microbios aislados del intestino requieren condiciones anaerobias estrictas para su crecimiento y no pueden sobrevivir más de un par de minutos cuando se exponen al aire del ambiente. Esto hace complicado desarrollar formulaciones probióticas estables y robustas. Se ha demostrado que el microorganismo anaerobio intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* utiliza una lanzadera de electrones extracelular para crecer en interfases oxico-anóxicas en el intestino (M Tanweer Khan y col, ISME Journal (2012) 6, 1578-1585). Además, se ha demostrado que los antioxidantes pueden ser una estrategia para mantener la bacteria intestinal humana altamente sensible al oxígeno *Faecalibacterium prausnitzii* viva en el aire ambiente (M Tanweer Khan y col., PLOS ONE, 9(5), e96097, 2014). Se ha demostrado además que la tolerancia al oxígeno de una bacteria intestinal anaerobia obligada de la especie Clostridium puede aumentarse en un proceso de domesticación a largo plazo (M Li y col., J Appl Microbiol. 2015 Mar; 118(3); 619-28). Por lo tanto, son necesarios microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno y la presente invención proporciona un método de adaptación de microorganismos anaerobios, junto con nuevas cepas de microorganismos que se han obtenido utilizando dichos métodos.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para la adaptación de microorganismos anaerobios y la selección de microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno, permitiendo por lo tanto que estos organismos sean relativamente más tolerantes al oxígeno cuando se exponen al aire del ambiente. Esto tiene la ventaja adicional de permitir el cultivo y almacenamiento mejorados de los microorganismos, p. ej., almacenamiento a más largo plazo.

En la presente invención se proporciona un “simulated human intestinal redox model” (modelo redox intestinal humano simulado - SHIRM) en donde tienen lugar una inducción doble gradual de estrés oxidativo, mediante la aplicación de tensión y difusión de oxígeno, y un cambio gradual de la relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado a fin de ajustar el estado redox.
El oxígeno es letal para los microorganismos anaerobios, de modo que el oxígeno disuelto (concentración de oxígeno), utilizado para el estrés oxidativo, aumentará pero mantenido a una concentración subletal, aunque se use el par de equivalentes opuestos antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox del medio ambiente. El estrés oxidativo también es inducido por la tensión aplicada. El estrés oxidativo aumenta la tolerancia bacteriana al ambiente oxidante y hace posible mantener el microorganismo vivo en el aire del ambiente durante períodos de tiempo relativamente más prolongados.

Las concentraciones de oxígeno subletales apropiadas (concentraciones que no dan lugar a la destrucción de todas las bacterias presentes o, en otras palabras, concentraciones en las cuales algunas o no todas las bacterias son destruidas) pueden determinarse fácilmente, por ejemplo, de tal manera que al menos algunas de (pero generalmente no todas) las bacterias pueden sobrevivir y se pueden seleccionar a continuación para la siguiente etapa en los métodos. Las bacterias supervivientes se cultivan de nuevo, por ejemplo con un aumento del estrés oxidativo (por ejemplo, aumentando la concentración de oxígeno disuelto) de modo que de nuevo al menos algunas de (pero generalmente no todas) las bacterias pueden sobrevivir y se pueden seleccionar a continuación para la siguiente etapa en el método. Esta etapa de aumento del estrés oxidativo se puede repetir de nuevo tantas veces como sea necesario o deseable con el fin de lograr más microorganismos tolerantes al oxígeno.

Las realizaciones de la invención se exponen en el conjunto de reivindicaciones anexas.

La presente invención proporciona un método para la adaptación de microorganismos anaerobios y la selección de microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno, comprendiendo dicho método las etapas de cultivar dichos microorganismos con una doble inducción gradual de estrés oxidativo mediante el aumento gradual de la tensión aplicada y de la difusión del oxígeno, y una reducción gradual de la concentración de antioxidante combinada con un incremento gradual en la concentración del equivalente opuesto oxidado para cambiar la relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox, en donde la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantiene a una concentración subletal en la que se eliminan algunos pero no todos los microorganismos.

La presente invención proporciona un método para la adaptación (o entrenamiento) de microorganismos anaerobios y la selección de los microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno (p. ej., relativamente más tolerantes al oxígeno), en donde los microorganismos se cultivan con una combinación de una doble inducción gradual de estrés oxidativo, mediante tensión aplicada y difusión de oxígeno, y una reducción gradual de la concentración de antioxidante combinada con un aumento gradual de la concentración de equivalente opuesto oxidado para modificar la relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox.

La presente invención proporciona además un método para una mayor producción de microorganismos anaerobios que comprende adaptar microorganismos anaerobios y seleccionar un microorganismo anaerobio más tolerante al oxígeno mediante los métodos de la invención descritos en la presente memoria, en donde los microorganismos se cultivan además con una combinación de tensión aplicada/potencial oxidante constante, difusión de oxígeno, y relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado que se ha optimizado para la producción de los microorganismos adaptados al oxígeno, en donde la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantiene a una concentración subletal, permitiendo por lo tanto una presión selectiva y dando lugar a un alto rendimiento de determinadas cepas de microorganismos. Dicho cultivo está en una configuración óptima o, en otras palabras, la combinación de tensión aplicada/potencial oxidante constante, difusión de oxígeno y relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado se han optimizado para la producción de los microorganismos anaerobios.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el conjunto redox del lumen del intestino humano. A pesar de que hay un flujo continuo de oxígeno debido a la ingestión de alimentos y difusión desde la mucosa intestinal, el potencial redox neto del intestino permanece negativo, a aprox. -300 mV.

La **Figura 2** muestra el daño potencial a las enzimas sensibles al oxígeno ocasionado por el estrés oxidativo y el mecanismo de recuperación.

La **Figura 3** muestra la ruta fermentativa principal empleada por la microbiota intestinal del intestino humano.

Figura 4a

Simulated Human Intestinal Redox Model (Modelo redox intestinal humano simulado - SHIRM) de 3 cámaras hecho a medida.

Figura 4b

Presentación esquemática del flujo de electrones desde células bacterianas hacia aceptores de electrones en SHIRM. Potenciales redox (potencial reductor y potencial oxidante) medido en (E_o') voltios.

Figura 4c

Presentación esquemática de SHIRM de intermedios involucrados en la transferencia de electrones de la célula bacteriana a los aceptores de electrones, incluidos los potenciales redox.

Figura 5

Flujo de trabajo básico de la operación de SHIRM.

Figura 6

Representación de cámara anódica de SHIRM acoplada a un alimentador de oxígeno de aprox. 100 ml de volumen de lecho pequeño.

Figura 7

SHIRM de respiración de aire: difusión de oxígeno directo del aire a la cámara anódica mediante brazo lateral.

Figura 8

Flujo de trabajo de la operación de SHIRM, 10 etapas

Figura 9

Selección de cepas adaptadas

Figura 10

Estrategia para explorar los perfiles de tolerancia al oxígeno de las cepas adaptadas.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

Definiciones

"Adaptación" es un proceso evolutivo dinámico, p. ej., debido a selecciones naturales, por el cual un organismo adquiere una mayor capacidad para vivir en su hábitat o hábitats. El proceso de adaptación (o entrenamiento) de los microorganismos puede llevarse a cabo, también, ventajosamente, en un ambiente no natural/artificial/*in vitro* tal como en los métodos de la presente invención.

"Antioxidante" es un agente que evita la formación de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno, hidroxilo y lípido, mediante la eliminación de radicales libres o mediante la reparación o eliminación de moléculas dañadas. Los antioxidantes frecuentemente pueden actuar directamente como agentes reductores.

"Agente reductor" es una sustancia, elemento o compuesto que pierde (o "dona") un electrón a otro agente en una reacción química redox. Puesto que el agente reductor pierde electrones, se dice que se ha oxidado.

Los "equivalentes opuestos oxidados" son sustancias químicas que ocasionan la retirada de electrones de otra especie. El equivalente opuesto oxidado es la forma oxidada del antioxidante.

Los "mediadores redox" o lanzaderas de electrones son compuestos que pueden experimentar una reacción redox reversible y facilitan la transferencia/lanzadera de electrones hacia y desde las bacterias.

"Tensión aplicada", "Tensión externa", "Potencial oxidante", "Potencial oxidante eléctrico aplicado", "Potencial de electrodos aplicado", "Tensión" y "Tensión potencial" se pueden usar indistintamente y se refieren a la tensión aplicada a las cámaras en el biorreactor.

"Difusión de oxígeno" es el movimiento de las moléculas de oxígeno de una concentración alta a una baja.

"Flujo de oxígeno" es la cantidad de oxígeno liberado por unidad de tiempo en la cámara, p. ej., la cámara anódica que contiene los microorganismos.

Los microbiota del intestino junto con compuestos activos redox de la dieta y donantes de electrones, tales como carbohidratos y proteínas, desempeñan un papel en el mantenimiento del ambiente reductor en el intestino. Esto significa que la microbiota del intestino se adapta para hacer frente a los flujos de oxígeno disuelto en el lumen del intestino (Figura 1). El oxígeno disuelto en concentraciones altas puede ser letal para un gran número de microbios intestinales y el ambiente reductor favorece la recuperación del daño oxidativo (Figura 2). En mayor detalle, la Figura 3 muestra la ruta fermentativa principal empleada por la microbiota del intestino en el intestino humano. La desproporción electrónica durante el crecimiento anaerobio es equilibrada por la mezcla de fermentación de ácido y producción de gas. Algunos microbios respiran electrones hacia aceptores de electrones extracelulares, tales como nitrato, sulfato o complejo metálico insoluble. Además, el oxígeno puede actuar como aceptor de electrones indirecto, ya que algunos de los microbios intestinales pueden consumir oxígeno en pequeñas cantidades. Los compuestos activos redox, tales como el galato, la rutina, el resveratrol, la cafeína y las flavinas están presentes en

la dieta normal, posiblemente oxidados en el tracto digestivo, también pueden actuar como aceptores de electrones (Figura 1). El estado redox del intestino puede influir en la biodisponibilidad de determinados fármacos o metabolitos. A pesar del hecho de que hay un flujo continuo de oxígeno a través de la ingestión de alimentos y difusión desde la mucosa intestinal, el potencial redox neto del intestino permanece negativo, a aprox. -300 mV. Este ambiente reductor deficiente en oxígeno favorece el crecimiento de microbios anaerobios estrictos en el lumen intestinal.

La alta sensibilidad al oxígeno es una seña de identidad de muchos microbios intestinales, lo cual hace enormemente difícil cultivar estos microbios y almacenarlos durante un período de tiempo prolongado. Otra dificultad del aislamiento y el cultivo de representantes de la microbiota intestinal para desarrollar nuevos probióticos potenciales es la complejidad del ambiente intestinal en términos de nichos y hábitats distintos. Una formulación probiótica debe ser estable en el aire ambiental durante varios meses, pero constituye un reto debido a la sensibilidad al oxígeno de muchos microbios intestinales. Varios microbios intestinales son alimentados de forma cruzada a partir de otros microbios y también pueden requerir algunos factores de crecimiento del hospedador, lo que dificulta la estimulación de estas condiciones *in vitro*.

Faecalibacterium prausnitzii es un ejemplo de un probiótico potencial con propiedades antiinflamatorias en diversas enfermedades metabólicas. Representa hasta más del 5 % de las bacterias del intestino humano, lo que la hace una de las bacterias más abundantes en la microbiota intestinal. *F. prausnitzii* produce cantidades relativamente altas de butirato, que desempeña un papel principal en la fisiología del intestino y es un metabolito principal en el lumen colónico. El butirato también estimula la proliferación celular y favorece la secreción de moco desde la mucosa del colon. *F. prausnitzii* es una bacteria enormemente sensible al oxígeno y solo sobrevive un par de minutos cuando se expone al aire ambiental.

Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente una nuevo método de adaptación al oxígeno de microorganismos aerobios y describen en la presente memoria un método para dicha adaptación al oxígeno, permitiendo por lo tanto que dichos organismos se vuelvan relativamente más tolerantes al oxígeno y de este modo estables y robustos para su almacenamiento y uso como cepas probióticas y en formulaciones o composiciones probióticas para intervenciones en mamíferos. El nuevo método permitiría específicamente el desarrollo y el uso de *F. prausnitzii* como cepa probiótica con características robustas para tolerar la producción a escala industrial y capaz de adaptarse al ambiente intestinal humano en casos de trastornos intestinales donde el estrés oxidativo es la principal seña de identidad.

La presente invención proporciona un método para la adaptación de microorganismos anaerobios y la selección de los microorganismos anaerobios relativamente más tolerantes al oxígeno, en donde los microorganismos son cultivados en una combinación de una doble inducción gradual de estrés oxidativo, mediante un aumento gradual de la tensión aplicada y difusión de oxígeno, y una reducción gradual de la concentración de antioxidante combinada con un incremento gradual en la concentración del equivalente opuesto oxidado para cambiar la relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox, en donde la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantiene a una concentración subletal en la que se eliminan algunos pero no todos los microorganismos. Los métodos de la invención se llevan a cabo por lo tanto generalmente *in vitro*.

La inducción doble de estrés oxidativo aumenta la tolerancia de los microorganismos al ambiente oxidante, permitiendo por lo tanto que el microorganismo sea más, o relativamente más, tolerante al oxígeno (p. ej., cuando se expone al aire ambiente). Los microorganismos que son más (o relativamente más) tolerantes al oxígeno (p. ej., cuando se exponen al aire ambiental) pueden referirse convenientemente a una comparación con la(s) cepa(s) de partida (o la(s) cepa(s) progenitora(s) usada(s) en los métodos de adaptación de la invención.

La mayor tolerancia al oxígeno permite mantener los microorganismos vivos en el aire ambiental durante períodos de tiempo relativamente más prolongados, lo que es claramente ventajoso.

La tensión aplicada o tensión externa aplicada se aplica generalmente a un ánodo, p. ej., en un ánodo de grafito, fieltro de grafito o fieltro de carbono o fibra de carbono, por ejemplo mediante un potenciostato, y se aumenta gradualmente. Para aplicar la tensión a los microorganismos, éstos se suministran convenientemente en una cámara anódica adecuada u otro recipiente, p. ej., un biorreactor, al cual se aplica la tensión. El circuito celular se completa, p. ej., conectando una cámara catódica con la cámara anódica, p. ej., a través de un brazo lateral de la cámara anódica, preferiblemente separadas por una membrana de intercambio de iones (p. ej., una membrana selectiva a cationes o una membrana de intercambio de protones). La tensión aplicada se puede aumentar (preferiblemente mediante un aumento gradual) hasta un máximo de 0,6 V, más específicamente de 0,6 V frente a Ag/AgCl.

Convenientemente, los métodos implican el uso de difusión de oxígeno, por ejemplo, mediante la aplicación de un flujo de oxígeno a los microorganismos. El flujo de oxígeno (p. ej., flujo de oxígeno a través de la cámara anódica) se puede mantener purgando un alimentador de oxígeno con gas oxígeno puro o aire para lograr las concentraciones deseadas de oxígeno disuelto (en particular las concentraciones de oxígeno disuelto deseadas en contacto con los microorganismos). El oxígeno disuelto se difundirá a través del alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica, creando de esta manera la difusión de oxígeno (o flujo de oxígeno) de los métodos descritos. El flujo (o difusión) de oxígeno se puede controlar, por ejemplo, mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo mediante la conexión de un alimentador de oxígeno u otra fuente de oxígeno a la cámara anódica, p. ej., otro brazo lateral de la cámara anódica, por ejemplo separado mediante, por ejemplo, un septo variable (p. ej., una membrana variable tal como una membrana

semipermeable) que tiene diferentes constantes de difusión de oxígeno. De forma adicional o alternativa, el flujo de oxígeno se puede controlar cambiando el volumen del lecho del alimentador de oxígeno. Por ejemplo, en las Figuras se muestran alimentadores de oxígeno de 100 ml y 250 ml (ver la Figura 6 y 4a). El alimentador de oxígeno también se puede eliminar para permitir la difusión directa de oxígeno hacia la cámara anódica, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 7. Una membrana, por ejemplo, una membrana de septo, entre la cámara anódica y el alimentador de oxígeno (o fuente de oxígeno) se puede recubrir además con agar de mucina para permitir una mejor difusión controlada del oxígeno desde el alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica. De forma adicional, los agentes reductores o antioxidantes presentes en el medio eliminarán oxígeno disuelto y, por lo tanto, influirán en la cinética de difusión de oxígeno y por consiguiente en el flujo de oxígeno. Por ejemplo, en los métodos de la presente invención, se pueden usar antioxidantes (en particular la cantidad o nivel de antioxidantes) presentes en el medio de cultivo de microorganismos para eliminar oxígeno y, de ese modo, pueden usarse como un medio para controlar los niveles o cantidades o concentración de oxígeno (oxígeno disuelto) presente en el cultivo de microorganismos. Por ejemplo, un nivel bajo (o inferior) de antioxidante en el cultivo de microorganismos generalmente significará que hay disponible más oxígeno (o existe más estrés oxidativo) mientras que un nivel alto (o mayor) de antioxidantes significará, generalmente, que hay disponible menos oxígeno (o un nivel bajo de oxígeno) (o hay menos estrés oxidativo).

Cualquiera de estos métodos de control de la difusión o flujo de oxígeno, o una combinación de estos, puede usarse fácilmente para lograr la cantidad o concentración deseada de oxígeno disuelto en el medio de cultivo de microorganismos y, por consiguiente, lograr el cambio gradual (preferiblemente, aumento gradual) en la difusión de oxígeno, flujo de oxígeno o concentración de oxígeno disuelto (o cantidad o nivel de oxígeno disuelto) usado para inducir el estrés oxidativo en los métodos de la presente invención.

Por lo tanto, en los métodos de la invención, las condiciones iniciales son, preferiblemente, un flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) bajo (o cero) y los métodos comprenden un aumento gradual en el flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno), por ejemplo hasta un flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) alto. Un flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) cero se refiere a 0 moles de oxígeno presentes en el medio de cultivo de microorganismos (p. ej., en la cámara anódica). Un flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) bajo ilustrativo se refiere a aproximadamente 10 µM de oxígeno disuelto presente en el medio de cultivo de microorganismos (p. ej., en la cámara anódica) que, por ejemplo, se difunde en el medio de cultivo de microorganismos/cámara anódica en una hora (por hora). Un flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) alto ilustrativo se refiere a una cantidad de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 250 µM de oxígeno disuelto presente en el medio de cultivo de microorganismos (p. ej., en la cámara anódica) que, por ejemplo, se difunde en el medio de cultivo de microorganismos/cámara anódica en una hora (por hora).

El estrés oxidativo real generado por el flujo de oxígeno (o difusión del oxígeno o concentración de oxígeno) también depende de la presencia de antioxidantes en el medio de cultivo. Por ejemplo, si se tiene un alto nivel de antioxidantes, un flujo de oxígeno alto producirá menos estrés oxidativo. Si se tiene un nivel de antioxidantes muy bajo en el medio un pequeño flujo de oxígeno puede generar un estrés oxidativo alto. De nuevo, el experto en la técnica es perfectamente capaz de controlar estas condiciones para lograr la inducción gradual de estrés oxidativo.

Para controlar la concentración inicial de oxígeno disuelto (p. ej., para reducir la concentración inicial de oxígeno a niveles bajos (o cero)), se puede retirar gas oxígeno del medio de cultivo, p. ej., purgando con nitrógeno exento de oxígeno.

El antioxidante se incluye en el medio de cultivo para proteger los microorganismos frente a concentraciones letales de oxígeno y para simular el ambiente redox del intestino. Por ejemplo, el antioxidante puede ser cisteína, glutatión, ácido ascórbico, ditiotreitol o ácido gálico. El antioxidante, por ejemplo, la cisteína o cualquier otro antioxidante adecuado, se utilizará para influir en o ajustar el potencial redox o el estado redox. Muchas bacterias requieren cisteína como fuente de azufre. Cuando se reduce la cisteína, como en algunos de los métodos de esta invención, se obtendrá un menor contenido total de azufre del medio de cultivo. Para compensar esa disminución, se añade el equivalente opuesto oxidado, por ejemplo, cistina (en el caso de la cisteína). Otros equivalentes opuestos oxidados (p. ej., para los antioxidantes indicados anteriormente) pueden ser el estado oxidado de glutatión, deshidroascorbato, ditiotreitol oxidado o ácido gálico oxidado, según lo apropiado. Además, en los medios de cultivo se pueden incluir también mediadores redox adecuados.

El cambio gradual de estado redox, p. ej., el cambio gradual de concentraciones de equivalentes opuestos antioxidante/oxidado, se lleva a cabo para ajustar el estado redox del medio de cultivo. El potencial redox se puede calcular según la ecuación de Nernst (a). Esto puede utilizarse para cualquier antioxidante adecuado y su equivalente opuesto oxidado.

$$E_{\mathrm{h}} = E_{\mathrm{o}} + \frac{RT}{nF} ln\left(\frac{[\textit{Equivalente opuesto oxidado}]}{[\textit{Agente reductor/antioxidante}]^2}\right) \qquad \text{(a)}$$

donde:
E_h = Potencial redox = V
E_o = Potencial redox estándar del par de equivalentes opuestos (agente reductor/antioxidante)/oxidado
R = Constante general de los gases = 8,31451 J K^{-1} mol^{-1}

F = Constante de Faraday = 96,485 C/mol
T = Temperatura absoluta (K)
n = Número de electrones implicados

Por lo tanto, una persona experta en la técnica puede calcular fácilmente los potenciales redox de cualquier relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado. A modo de ejemplo, los valores de potencial redox (E_h) calculados para diversas concentraciones del par redox cisteína/cistina se presentan en la Tabla 1.

E_o para el par Cistina/Cisteína = 0,25 V a pH 7,4 y n = 2.

Si se usa cisteína/cistina como par de equivalentes opuestos antioxidante/oxidado, la concentración inicial preferida de cisteína podría calcularse a partir de la fórmula de reacción (b).

$$4R\text{-}SH + O_2 \rightarrow 2R\text{-}SS\text{-}R + H_2O \qquad (b)$$

Según la ecuación (b), 4 moles de cisteína (R-SH) reaccionan con un mol de oxígeno para producir 2 moles de cistina (R-SS-R).

La concentración de oxígeno disuelto en agua a 25 °C es de aproximadamente 200 µM y, cuando el medio de cultivo no se purgue con nitrógeno antes del experimento, aproximadamente 800 µM de cisteína reaccionarán con 200 µM de oxígeno generando 400 µM de cistina. Por lo tanto, para un medio de cultivo que tenga 8 mM de cisteína se observará un potencial redox inicial de alrededor de -223 mV. Sin embargo, la desgasificación total del oxígeno en medio de cultivo con nitrógeno libre de oxígeno proporciona un potencial redox de alrededor de -283 mV, cercano al potencial redox luminal del intestino (alrededor de -300 mV). Por lo tanto, cuando se utilizan cisteína/cistina como par, la concentración inicial preferida de cisteína (u otro equivalente opuesto antioxidante) es de 8 mM. Este es un ejemplo de una alta concentración de antioxidante, donde la cisteína/cistina se usa como un par; sin embargo, se apreciará que las concentraciones altas equivalentes de antioxidantes se pueden calcular fácilmente para otros pares. Además, la concentración inicial preferida de cistina (u otro par equivalente opuesto oxidado) es de 0 mM o una concentración de cualquier otra manera baja para lograr el potencial redox inicial deseado. También se prefiere que el medio de cultivo haya quedado completamente desgasificado de oxígeno (o que el oxígeno se haya eliminado completamente del medio de cultivo). En otras palabras, las condiciones preferidas se seleccionan para acercarse lo más posible al potencial redox luminal del intestino de -300 mV al inicio del método. Al llevar a cabo los métodos se prefiere que se produzca una reducción gradual en la concentración de antioxidante combinada con un aumento gradual en la concentración del equivalente opuesto oxidado para dar como resultado un aumento gradual global del potencial redox. Convenientemente, para la cisteína/cistina (u otro par de equivalentes opuestos antioxidante/oxidado), esto puede ser una reducción gradual de 1 mM en la concentración de cisteína y un aumento de 1 mM en la concentración de cistina. Sin embargo, también se pueden utilizar aumentos/disminuciones graduales siempre y cuando tenga lugar un cambio gradual en el estado redox.

Este razonamiento se puede adaptar a cualquier par de equivalentes opuestos antioxidante/oxidado adecuado. Cuando se reduce la concentración de antioxidante, ésta se equilibra con una cantidad equivalente del equivalente opuesto oxidado correspondiente.

El método puede llevarse a cabo convenientemente en un biorreactor adecuado y, generalmente, implica varias etapas de reinoculaciones de cultivo bacteriano (p. ej., en medios de cultivo nuevos). En algunas realizaciones preferidas de la invención, cada etapa del cambio o inducción gradual como se describe en la presente memoria, p. ej., una inducción doble gradual de estrés oxidativo mediante tensión aplicada y difusión de oxígeno, y un cambio gradual de relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox, p. ej., cada etapa de la reducción gradual en la concentración de antioxidante combinada con un aumento gradual en la concentración del equivalente opuesto oxidado, un aumento gradual en la tensión aplicada y un aumento gradual en el flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) puede implicar una reinoculación. La reinoculación también se puede denominar en la presente descripción como una etapa de subcultivo o una etapa de cultivo.

En primer lugar, se puede inocular una sola colonia de bacterias en un medio de cultivo apropiado, como se conoce en la técnica y se deja crecer hasta que el cultivo alcance la fase estacionaria. Las condiciones iniciales pueden ser una o más, o todas, de flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) bajo, preferiblemente flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) cero, baja tensión aplicada, preferiblemente 0,1 V, más específicamente 0,1 V frente a Ag/AgCl, alta concentración de antioxidante (ver más arriba los cálculos de la ecuación de Nernst), o concentración cero, de equivalente opuesto oxidado (ver más arriba los cálculos de la ecuación de Nernst). Para las siguientes reinoculaciones se puede llevar a cabo una disminución gradual de concentración antioxidante, aumento de equivalente opuesto oxidado, tensión aplicada aumentada y mayor flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno).

Cuando el crecimiento de los microorganismos se reduce significativamente, las condiciones se pueden mantener constantes en las condiciones optimizadas (o finales) alcanzadas, lo que se puede ilustrar con cisteína 3 mM, cisteína 5 mM, 0,6 V frente a Ag/AgCl y 0,2 $nmolesml^{-1}min^{-1}$ respectivamente (ver las Figuras 5 y 8), para dejar que la cepa se adapte. En otras palabras, una vez que los cambios graduales dan lugar a una disminución significativa del crecimiento

de los microorganismos, entonces se interrumpen estos cambios graduales y los microorganismos se cultivan durante una o más etapas utilizando condiciones constantes (o condiciones optimizadas o finales) correspondientes a las condiciones alcanzadas al final de los cambios graduales. Estas etapas constantes permiten que las cepas se adapten. Tras inoculaciones repetidas en condiciones constantes, una vez que la cepa se ha adaptado, en algunas realizaciones se puede continuar las inoculaciones con una o más (o preferiblemente todas) de una disminución gradual adicional de la concentración de antioxidante, aumento del equivalente opuesto oxidado, tensión aplicada aumentada, y flujo de oxígeno (o difusión de oxígeno o concentración de oxígeno) aumentado (ver la Figura 5).

Todos los subcultivos obtenidos de cada etapa del método se pueden analizar a la vez con el fin de seleccionar la cepa mejor adaptada o un subcultivo se puede analizar directamente después de la recuperación para decidir si se deben continuar o no las inoculaciones. Si el subcultivo no se ha adaptado, entonces será apropiado continuar con las inoculaciones, de lo contrario, si la cepa se ha adaptado, entonces esa cepa se puede seleccionar y el método puede detenerse (ver, por ejemplo, la Figura 8). Por ejemplo, los subcultivos obtenidos se pueden analizar para determinar la tolerancia al oxígeno y, si muestran el nivel deseado de tolerancia al oxígeno, por ejemplo, un nivel aumentado (preferiblemente aumentado de forma significativa) de tolerancia al oxígeno en comparación con una cepa de control relevante (p. ej., las cepas iniciales o progenitoras) o un nivel suficiente de estabilidad (p. ej., el tiempo de almacenamiento) cuando se expone a oxígeno (p. ej., en aire ambiental) entonces la cepa se ha adaptado y se puede seleccionar. Una medida conveniente de la tolerancia al oxígeno se puede obtener evaluando el crecimiento de los microorganismos en condiciones aerobias (p. ej., con exposición al aire ambiental). Por ejemplo, cuando las cepas se exponen a oxígeno se puede realizar una medida del número de unidades formadoras de colonias (UFC), p. ej., en forma de una medida de UFC/ml. Las cepas adaptadas (tolerantes al oxígeno) ilustrativas tendrán al menos $1x10^2$ o $1x10^3$ UFC/ml, preferiblemente al menos $1x10^4$ o $1x10^5$, cuando se expongan al oxígeno, p. ej., aire ambiental. En los ejemplos se describe un método apropiado (ver, p. ej., la Tabla 3). Si la cepa no se ha adaptado, se pueden continuar las inoculaciones.

Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la invención, las condiciones de partida se seleccionan de uno o más, o todos, de: cisteína 8 mM (o concentración equivalente de un antioxidante alternativo), cistina 0 mM (o equivalente opuesto oxidado alternativo), una tensión aplicada de 0,1 V y un flujo de oxígeno igual a cero o bajo. En dichas realizaciones, los cambios graduales pueden continuar hasta que uno o más, o todos, de: una concentración de cisteína mínima de 3 mM (o una concentración equivalente de un antioxidante alternativo), una concentración de cistina máxima de 5 mM (o una concentración equivalente de un equivalente opuesto oxidado alternativo), una tensión aplicada máximo de 0,6 V, y un flujo de oxígeno alto.

Por lo tanto, en los métodos preferidos de la invención, la tensión aplicada no supera 0,6 V, y/o la concentración de cisteína no es inferior a 3 mM y/o la concentración de cistina no es superior a 5 mM y/o la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantiene a una concentración subletal.

Como resultará evidente a partir de la descripción anterior, en algunas realizaciones de la invención, una vez completados los cambios graduales, el método comprende una o más etapas adicionales de cultivo (subcultivo) de dichos microorganismos en las condiciones finales (optimizadas o constantes) de tensión aplicada, difusión de oxígeno (flujo de oxígeno o concentración de oxígeno) y relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado alcanzada después de los cambios graduales (ver, por ejemplo, la Figura 8).

En otras realizaciones, el método comprende, además, etapas posteriores en las que se llevan a cabo cambios graduales adicionales (ver, por ejemplo, la Figura 5).

La determinación de la cantidad de etapas de los cambios graduales a llevar a cabo puede ser determinada por una persona con experiencia en la técnica monitorizando el comportamiento de los microorganismos o haciendo un análisis de cribado de los microorganismos (p. ej., como se describe en otra parte de la presente memoria), mientras están adaptándose. Por ejemplo, las realizaciones preferidas de los presentes métodos pueden implicar hasta 5 o 6 etapas de cambios graduales, p. ej., 3, 4, 5 o 6 etapas de cambios graduales o, al menos, 5 etapas de cambios graduales, p. ej., hasta 10 etapas de cambios graduales, p. ej., 7, 8, 9 o 10 etapas.

La determinación del número total de etapas, p. ej., etapas de cultivo (incluidas las etapas de cambios graduales a llevar a cabo en condiciones constantes u optimizadas) para lograr la adaptación de microorganismos anaerobios y la selección de microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno, puede ser determinada por una persona experta en la técnica mediante la monitorización del comportamiento de los microorganismos o el análisis de cribado de los microorganismos (p. ej., como se describe en otro lugar de la presente memoria), mientras están adaptándose. Por ejemplo, las realizaciones preferidas de los presentes métodos pueden implicar hasta 6, 7, 8, 9, 10 o 12 etapas, o hasta 15, 20, 25, 30 o 35 etapas.

En métodos que implican etapas de cultivo a llevar a cabo en condiciones constantes u optimizadas, la determinación del número de etapas, p. ej., las etapas de cultivo a llevar a cabo, puede ser determinada por una persona con experiencia en la técnica monitorizando el comportamiento de los microorganismos o haciendo un análisis de cribado de los microorganismos (p. ej., como se describe en otra parte de la presente memoria), mientras están adaptándose. Por ejemplo, las realizaciones preferidas de los presentes métodos pueden implicar hasta 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 12 etapas, o hasta 15, 20, 25, 30 o 35 etapas llevadas a cabo en condiciones constantes u optimizadas.

En algunas realizaciones, la adaptación de los microorganismos anaerobios y la selección de microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno se pueden lograr al final de estas etapas en condiciones constantes u optimizadas (o, a veces, de hecho, al final de las etapas de cambios graduales). Por lo tanto, la persona experta en la técnica puede determinar fácilmente el número de dichas etapas a realizar, p. ej., monitorizando el momento en que se ha producido una adaptación significativa o suficiente o máxima (tolerancia al oxígeno).

El método puede usarse también para la producción de una cepa adaptada y seleccionada (p. ej., para la producción o crecimiento de un microorganismo seleccionado mediante el método). En dichos métodos las condiciones de cultivo se mantienen constantes con una configuración óptima, p. ej., las condiciones optimizadas (o constantes) establecidas usando los métodos de la invención descritos anteriormente, p. ej., antioxidante 3 mM, equivalente opuesto oxidado 5 mM, 0,6 V y 0,2 $nmolesml^{-1}min^{-1}$. Esto da lugar a un alto rendimiento de la cepa bacteriana seleccionada.

El método se lleva a cabo de forma cómoda en un biorreactor denominado SHIRM "Simulated Human Intestinal Redox Model" (modelo redox intestinal humano simulado), Figura 4a, b y c. En SHIRM el estrés oxidativo doble se aplica mediante tensión externa (tensión aplicada) y difusión de oxígeno (flujo de oxígeno) y el potencial redox/estado redox del sistema está controlado por un par de equivalentes opuestos antioxidante/oxidado. Puesto que el oxígeno es letal para los organismos cultivados, aumentará el oxígeno disuelto pero mantenido a una concentración subletal, mientras se usa un cambio gradual de la relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidando para ajustar el estado redox del ambiente (ver, por ejemplo, la Figura 5 o la Figura 8, donde se muestran concentraciones ilustrativas de cisteína/cistina, lo cual se puede adaptar fácilmente a otros pares de equivalentes opuestos antioxidante/oxidado). El estrés oxidativo mediante tensión aplicada y difusión de oxígeno aumenta la tolerancia bacteriana al ambiente oxidante y las células se ven expuestas repetidamente a nuevas condiciones oxidantes (p. ej., la Figura 5 o la Figura 8). Las cepas adaptadas o que han evolucionado se analizan en términos de tolerancia al oxígeno. Las cepas también pueden ser seleccionados en función de sus características metabólicas, tales como su perfil de ácidos grasos (p. ej., producción de butirato en el caso de bacterias productoras de butirato tales como *Faecalibacterium prausnitzii*) y evaluación de la cinética de crecimiento, para seleccionar la cepa mejor adaptada. Las cepas adaptadas o que han evolucionado están por lo tanto adaptadas para tener una mejor tolerancia (p. ej., que los microorganismos iniciales o progenitores relevantes) a un ambiente que contiene oxígeno o una mejor tolerancia a condiciones de estrés tales como la exposición al aire ambiente (estrés oxidativo) o, por ejemplo, a sales biliares. Por lo tanto, si las cepas son, por ejemplo, de *Faecalibacterium prausnitzii*, las cepas se seleccionan de modo que se mantienen o mejoran características metabólicas tales como la producción de butirato u otra producción de ácidos grasos, pero las cepas muestran una mayor tolerancia al oxígeno (p. ej., en comparación con la cepa de *Faecalibacterium prausnitzii* inicial o progenitora relevante).

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para la adaptación de microorganismos anaerobios y la selección de los microorganismos anaerobios relativamente más tolerantes al oxígeno, en donde los microorganismos son cultivados en una combinación de una doble inducción gradual de estrés oxidativo, mediante un aumento gradual de la tensión aplicada y de la difusión del oxígeno, y una reducción gradual en la concentración de antioxidante combinada con un incremento gradual en la concentración del equivalente opuesto oxidado para modificar la relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox, en donde la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantiene a una concentración subletal en la que se eliminan algunos pero no todos los microorganismos.

En otra modalidad preferida, el método para la adaptación al oxígeno de los microorganismos anaerobios se lleva a cabo utilizando un biorreactor denominado "Simulated Human Intestinal Redox" (modelo redox intestinal humano simulado - SHIRM) e incluye, aunque no de forma limitativa, las siguientes etapas:

a) La inoculación de una sola colonia de bacterias en medios de cultivo (como se conoce en la técnica) incluidos mediadores redox y agentes reductores adecuados para proteger las células bacterianas frente a concentraciones letales de oxígeno y para simular el ambiente redox del intestino.

b) Cuando el cultivo alcanza la fase exponencial tardía, una parte del cultivo se puede usar para el análisis y otra parte se puede usar para su posible reinoculación en el reactor SHIRM.

c) La inoculación del cultivo en el reactor SHIRM que contiene los mismos medios de cultivo se usó en el aislamiento primario y el cultivo rutinario de la cepa bacteriana. El medio de cultivo ahora denominado (SBCM, "Shirm Bed Culture Medium" o medio de cultivo de lecho Shirm)

I. Se disminuye la concentración de agente reductor/antioxidante, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, cisteína, glutatión, ácido ascórbico, ditiotreitol y ácido gálico, y se equilibra con una cantidad equivalente de un "equivalente opuesto oxidado" correspondiente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, cistina, estado oxidado de glutatión, deshidroascorbato, ditiotreitol oxidado y ácido gálico oxidado.

II. Los potenciales de oxidación eléctricos aplicados se mantienen mediante tensión externa, p. ej., sobre un ánodo de grafito, fieltro de grafito o fieltro de carbono o fibra de carbono mediante potenciostato. El circuito de la celda se completa, p. ej., conectando la cámara catódica a un brazo lateral de la cámara anódica separado por una membrana de intercambio de protones.

III. El flujo de oxígeno se controla conectando el alimentador de oxígeno hacia otro brazo lateral de la cámara anódica separada por un septo variable que tiene diferentes constantes de difusión de oxígeno. El flujo de oxígeno instantáneo se mide, por ejemplo, mediante una sonda DO de tipo Clark, ver la Figura 4A.

IV. El flujo de oxígeno se mantiene purgando el alimentador de oxígeno con oxígeno gaseoso puro o aire y se logran las concentraciones de oxígeno disuelto deseadas siguiendo la ley de Henry de la solubilidad de los gases. El oxígeno disuelto se difunde a continuación a través del alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica.
V. De forma adicional, el flujo de oxígeno se controla modificando el volumen del lecho de alimentador de oxígeno. El alimentador de oxígeno también se puede eliminar para permitir la difusión directa de oxígeno hacia la cámara anódica.
VI. La membrana de septo, entre la cámara anódica y el alimentador de oxígeno se puede recubrir además con agar de mucina para permitir una mejor difusión controlada del oxígeno desde el alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica.
VII. El SHIRM contiene Shirm Bed Culture Media (medios de cultivo de lecho de Shirm - SBCM), que se purga con nitrógeno exento de oxígeno para retirar el oxígeno disuelto.
VIII. El biorreactor SHIRM se hace funcionar hasta que el cultivo alcanza la fase estacionaria.
d) Una parte del primer subcultivo se usa para la inoculación en el reactor SHIRM.
e) Se inicia la reinoculación en el reactor SHIRM teniendo una concentración en antioxidante reducida gradualmente, una concentración de equivalente opuesto oxidado aumentada y una tensión aplicada aumentada (máximo de 0,6 V). Menos antioxidante eliminará menos oxígeno, por lo tanto habrá una mayor cantidad de oxígeno disponible y las células experimentarán más estrés oxidativo. El alimentador de oxígeno regula además el flujo de difusión de oxígeno. Esta etapa se repite hasta que disminuye el crecimiento.
f) Manteniendo todas las condiciones constantes, se repiten las reinoculaciones y se analiza el nuevo subcultivo en términos de caracterización metabólica comparativa, la cinética de crecimiento, la estabilidad y la tolerancia. Si el análisis es satisfactorio, se selecciona este subcultivo y, si no, se repite la etapa f).

En estos métodos, cada subcultivo se puede analizar antes de la posterior reinoculación (o se analiza después de cada etapa) y el método se detiene cuando la cepa se ha adaptado adecuadamente al oxígeno. A continuación, se selecciona esta cepa. En dichos métodos se pueden analizar hasta aproximadamente 30 subcultivos, o hasta aproximadamente 10 subcultivos (u otras cantidades de subcultivos, tal como los descritos en otra parte de la presente memoria), antes de detener el método.

Se puede utilizar una o más de las etapas anteriores, según sea apropiado, en cualquiera de los métodos de la invención como se describe en la presente memoria.

En otra realización preferida, se recuperan aproximadamente 30 subcultivos (ver, por ejemplo, la Figura 5) o aproximadamente 10 subcultivos (ver, por ejemplo, la Figura 8) u otras cantidades de subcultivos (como se describe en otra parte de la presente memoria) y a continuación se analizan todos para hallar la cepa más adecuada. De este modo, no es necesario analizar los subcultivos después de cada etapa, sino que se pueden llevar a cabo todos los análisis a la vez, p. ej., para evaluar qué subcultivo que es el más adaptado o tolerante al oxígeno. El método para la adaptación al oxígeno de los microorganismos anaerobios se lleva a cabo utilizando un biorreactor denominado “Simulated Human Intestinal Redox Model” (modelo redox intestinal humano simulado - SHIRM) e incluye, aunque no de forma limitativa, las siguientes etapas:
a) La inoculación de una sola colonia de bacterias en medios de cultivo de rutina, como se conoce en la técnica, incluidos mediadores redox y agentes reductores adecuados para proteger las células bacterianas frente a concentraciones letales de oxígeno y para simular el ambiente redox del intestino.
b) Cuando el cultivo alcanza la fase exponencial tardía, una parte del cultivo se usa para la inoculación en el reactor SHIRM y otra parte se guarda para el análisis.
c) La inoculación del cultivo en el reactor SHIRM que contiene los mismos medios de cultivo se usó en el aislamiento primario y el cultivo rutinario de la cepa bacteriana. El medio de cultivo ahora denominado (SBCM, “Shirm Bed Culture Medium” o medio de cultivo de lecho Shirm)
I. Se disminuye la concentración de agente reductor/antioxidante, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, cisteína, glutatión, ácido ascórbico, ditiotreitol y ácido gálico, y se equilibra con una cantidad equivalente de un “equivalente opuesto oxidado”, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, cistina, estado oxidado de glutatión, deshidroascorbato, ditiotreitol oxidado y ácido gálico oxidado.
II. Los potenciales de oxidación eléctricos aplicados se mantienen mediante tensión externa, sobre un ánodo de grafito, fieltro de grafito o fieltro de carbono o fibra de carbono mediante potenciostato. El circuito de la celda se completa conectando la cámara catódica a un brazo lateral de la cámara anódica separado por una membrana de intercambio de protones.
III. El flujo de oxígeno se controla conectando el alimentador de oxígeno hacia otro brazo lateral de la cámara anódica separada por un septo variable que tiene diferentes constantes de difusión de oxígeno. El flujo de oxígeno instantáneo se mide, por ejemplo, mediante una sonda DO de tipo Clark, ver la Figura 4A.
IV. El flujo de oxígeno se mantiene purgando el alimentador de oxígeno con oxígeno gaseoso puro o aire y se logran las concentraciones de oxígeno disuelto deseadas siguiendo la ley de Henry de la solubilidad de los gases. El oxígeno disuelto se difunde a continuación a través del alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica.
V. De forma adicional, el flujo de oxígeno se controla modificando el volumen del lecho de alimentador de oxígeno. El alimentador de oxígeno también se puede eliminar para permitir la difusión directa de oxígeno hacia la cámara anódica.
VI. La membrana de septo, entre la cámara anódica y el alimentador de oxígeno se puede recubrir además con agar de mucina para permitir una mejor difusión controlada del oxígeno desde el alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica.
VII. El SHIRM contiene SBCM, que se purga con nitrógeno exento de oxígeno para retirar el oxígeno disuelto.

VIII. Entonces el SBCM usado para la primera inoculación se puede designar como SBCM X,Y/ V_Z, donde X se refiere a la concentración de antioxidante (mM) e Y se refiere a la concentración de equivalente opuesto oxidado (mM) y "V_Z" indica la tensión aplicada frente a Ag/AgCl (V). El biorreactor SHIRM se hace funcionar hasta que el cultivo alcanza la fase estacionaria.

IX. El cultivo recuperado después de la primera incubación se pueden designar "Población P1".

d) Después se inicia la inoculación en el reactor SHIRM con menor concentración de antioxidante, mayor concentración de equivalente opuesto oxidado y un aumento de la tensión aplicada. Menos antioxidante eliminará menos oxígeno, por lo tanto habrá una mayor cantidad de oxígeno disponible y las células experimentarán más estrés oxidativo. El alimentador de oxígeno regula además el flujo de difusión de oxígeno.

e) Se continúan las reinoculaciones hasta aproximadamente el subcultivo 6, ver, p. ej., las Figuras 5 y 8 (cuando el efecto combinado de los mediadores antioxidantes/redox, el flujo de oxígeno y la tensión influyen (disminuyen) significativamente en el crecimiento).

f) Generalmente, la tensión aplicada no se aumentará por encima de 0,6 V frente a Ag/AgCl debido al sobrepotencial. Los potenciales más altos pueden causar un ensuciamiento rápido de los electrodos y, de forma adicional, oxidaciones letales de citocromos microbianos, por ejemplo, el citocromo a3 posee un potencial de reducción de alrededor de +0,385 V frente a SHE.

g) Manteniendo todas las condiciones constantes, se realizaron inoculaciones repetidas hasta aproximadamente el subcultivo 27 (ver, p. ej., la Figura 5) o hasta aproximadamente el subcultivo 10 (ver, p. ej., la Figura 8), más precisamente un número adecuado de subcultivos (para aumentar la probabilidad de adaptación) hasta que la cepa se haya adaptado a las condiciones, mientras se usaba medio fresco para cada subcultivo.

h) Después del subcultivo 27, las inoculaciones continuaron hasta aproximadamente el subcultivo 30 como se muestra en la Figura 5. Alternativamente, después del subcultivo 10, se detuvieron las inoculaciones como se muestra en la Figura 8.

i) Cuando todos los subcultivos se recuperan, se analizan para obtener metagenómicas comparativas, caracterización metabólica, cinética de crecimiento, estabilidad y tolerancia al estrés oxidativo para escoger la cepa mejor adaptada.

Se puede utilizar una o más de las etapas anteriores, según sea apropiado, en cualquiera de los métodos de la invención como se describe en la presente memoria.

En otra realización, el método para la adaptación al oxígeno de los microorganismos anaerobios se lleva a cabo utilizando un biorreactor denominado "Simulated Human Intestinal Redox Model" (modelo redox intestinal humano simulado - SHIRM) e incluye, aunque no de forma limitativa, las siguientes etapas:

a) Inoculación de una sola colonia de bacterias en medios de cultivo de rutina, como se conoce en la técnica. La cisteína se emplea para simular el potencial redox colónico del medio de cultivo y la resazurina como el indicador de redox usado.

b) Cuando el cultivo alcanza la fase exponencial tardía, una parte del cultivo se usa para la inoculación en el reactor SHIRM y otra parte se guarda para el análisis.

c) La inoculación del cultivo en el reactor SHIRM que contiene los mismos medios de cultivo se usó en el aislamiento primario y el cultivo rutinario de la cepa bacteriana. El medio de cultivo se denomina ahora medio de cultivo de lecho Shirm (SBCM)

I. La concentración de agente reductor/antioxidante, cisteína, se reduce y equilibra con una cantidad equivalente de un "equivalente opuesto oxidado", la cistina.

II. Los potenciales de oxidación eléctricos aplicados se mantienen mediante tensión externa, sobre un ánodo de grafito, fieltro de grafito o fieltro de carbono o fibra de carbono mediante potenciostato. El circuito de la celda se completa conectando la cámara catódica a un brazo lateral de la cámara anódica separado por una membrana de intercambio de protones.

III. El flujo de oxígeno se controla conectando el alimentador de oxígeno hacia otro brazo lateral de la cámara anódica separado por un septo variable que tiene diferentes constantes de difusión de oxígeno. El flujo de oxígeno instantáneo se mide, por ejemplo, mediante una sonda DO de tipo Clark, ver la Figura 4A.

IV. El flujo de oxígeno se mantiene purgando el alimentador de oxígeno con oxígeno gaseoso puro o aire y se logran las concentraciones de oxígeno disuelto deseadas siguiendo la ley de Henry de la solubilidad de los gases. El oxígeno disuelto se difunde a continuación a través del alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica.

V. De forma adicional, el flujo de oxígeno se controla modificando el volumen del lecho de alimentador de oxígeno. El alimentador de oxígeno también se puede eliminar para permitir la difusión directa de oxígeno hacia la cámara anódica.

VI. La membrana de septo, entre la cámara anódica y el alimentador de oxígeno se puede recubrir además con agar de mucina para permitir una mejor difusión controlada del oxígeno desde el alimentador de oxígeno hacia la cámara anódica.

VII. El SHIRM contiene SBCM, que se purga con nitrógeno exento de oxígeno para retirar el oxígeno disuelto.

VIII. A continuación, el SBCM utilizado para la primera inoculación, puede designarse como SBCM 8,0/ $V_{0,1}$; el primero indica la concentración de cisteína mientras que que el último indica la concentración de cistina en mM y "V" indica la tensión aplicada frente a Ag/AgCl. El biorreactor SHIRM funciona hasta que el cultivo alcanza la fase estacionaria con un potencial de oxidación de +100 mV.

IX. El cultivo recuperado después de la primera incubación puede ser designado como "Población P1".

d) Después se inicia la inoculación en el reactor SHIRM con menor concentración de cisteína, mayor concentración de cistina y una mayor tensión aplicada, ver la Figura 5 y la Figura 8. Menos antioxidante eliminará menos oxígeno, por lo tanto habrá una mayor cantidad de oxígeno disponible y las células experimentarán más estrés oxidativo. El alimentador de oxígeno regula además el flujo de difusión de oxígeno.

e) Las reinoculaciones se continúan hasta el subcultivo 6. En esta etapa, el antioxidante se reduce a 3 mM y el "equivalente opuesto oxidado" se aumenta a 5 mM mientras se eleva el potencial de oxidación a 0,6 V (frente a AgAgCl). La tensión potencial no se aumentará más allá de 0,6 V frente a AgAgCl debido a las sobretensiones. Las tensiones más altas pueden causar un deterioro rápido de los electrodos y, de forma adicional, los citocromos microbianos, por ejemplo, el citocromo a3 posee un potencial de reducción de alrededor de +0,385 V frente a SHE.

f) Manteniendo todas las condiciones constantes, se realizaron inoculaciones repetidas hasta subcultivos 27 (Figura 5) o subcultivo 10 (Figura 8), mientras se utilizaba medio fresco para cada subcultivo.

g) En el escenario mostrado en la Figura 5, tras el subcultivo 27, las inoculaciones continuaron hasta el subcultivo 30 como se muestra en la Figura 5. Alternativamente, por ejemplo, según muestra la Figura 8, después del subcultivo 10, se detuvieron las inoculaciones.

Se puede utilizar una o más de las etapas anteriores, según sea apropiado, en cualquiera de los métodos de la invención como se describe en la presente memoria.

El cambio gradual de relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox es según la ecuación de Nernst. A continuación se indica un ejemplo de par redox de cisteína/cistina:

$$E_h=E_o+RT/2F\ln([\text{cistina}] / [\text{Cys}]^2) \qquad (a)$$

Donde:
E_h= Potencial redox = V
Eo = Potencial redox estándar del par cistina/cisteína = 0,25 V a pH 7,4
R = Constante general de los gases = 8,31451 J K^{-1} mol^{-1}
F = Constante de Faraday = 96,485 C/mol
T = Temperatura absoluta (K)

Los valores de potencial redox (E_h) calculados para diversas concentraciones del par redox cisteína/cistina se presentan en la Tabla 1.

Cisteína	Cistina	E_h	
mM		mV	medio saturado en oxígeno
7,2	0,4	-223	
7,995	0,005	-283	medio de cultivo desprovisto de oxígeno preparado mediante purga con nitrógeno
7	1	-211	
6	2	-198	
5	3	-188	
4	4	-178	
3	5	-168	
2	6	-155	
1	7	-135	
0,01	8	-13	

Tabla 1

$$4R\text{-}SH + O_2 \rightarrow 2R\text{-}SS\text{-}R + H_2O \qquad (b)$$

Según la ecuación (b), 4 moles de cisteína (R-SH) reaccionan con un mol de oxígeno para producir 2 moles de cistina (R-SS-R).

La concentración de oxígeno disuelto en agua a 25 °C es de aproximadamente 200 µM y, cuando el medio de cultivo no se purgue con nitrógeno antes del experimento, aproximadamente 800 µM de cisteína reaccionarán con 200 µM de oxígeno generando 400 µM de cistina. Por lo tanto, para un medio de cultivo que tenga 8 mM de cisteína se observará un potencial redox inicial de alrededor de -223 mV. Sin embargo, la desgasificación total del oxígeno en medio de cultivo con nitrógeno libre de oxígeno proporciona un potencial redox de alrededor de -283 mV, cercano al potencial redox luminal del intestino (alrededor de -300 mV)

La presente invención proporciona además ejemplos de microorganismos adaptados que han sido preparados mediante los métodos de la presente invención.

Por lo tanto, en la presente memoria se describe también un microorganismo (microorganismo adaptado), p. ej., una cepa de microorganismos obtenida, que puede ser obtenida, preparada, producida, identificada o seleccionada mediante los métodos de la invención. Dichas cepas pueden ser un microorganismo probiótico o una cepa bacteriana. "Probiótico" como se utiliza en la presente memoria se refiere a microorganismos que proporcionan beneficios para la salud cuando se consumen. Por ejemplo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura define los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, transmiten al hospedador un beneficio para la salud". Dichos microorganismos o cepas pueden ser cepas aisladas o cultivos puros y no corresponderán a microorganismos o cepas naturales ya que se han sometido a los métodos de adaptación de la invención. Son microorganismos o cepas preferidas *F. prausnitzii*.

Los ejemplos de cepas adaptadas obtenidas, etc., mediante los métodos de adaptación de la presente invención y aspectos adicionales de la invención son cepas de *F. prausnitzii* denotadas en la presente memoria TCS1, OCS-1 y OCS-2. Estas cepas se han depositado en cumplimiento del Tratado de Budapest en DSMZ (Instituto Leibniz DSMZ - colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 12 de octubre de 2016 y se les ha dado los números de registro DSM 32380, DSM 32378 y DSM 32379, respectivamente.

Los microorganismos o cepas obtenidas, etc., mediante los métodos de la invención (p. ej., una o más de las cepas depositadas) pueden adoptar la forma de un compuesto (agente) o composición, p. ej., un compuesto o composición farmacéutica o un compuesto o composición nutricional.

Por lo tanto, también se describe en la presente memoria una composición o formulación que comprende:
(i) un microorganismo o cepa de la invención, obtenida, obtenible, preparada, producida, identificada o seleccionada por el método de la invención, o un microorganismo o cepa de la invención, según se define de cualquier otra manera en la presente memoria (p. ej., una o más de las cepas depositadas); y
(ii) al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en un vehículo, diluyente o excipiente (p. ej., un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable), un producto alimenticio o un suplemento alimenticio, o un agente terapéutico o nutricional adicional. Por consiguiente, dichas composiciones se pueden formular como composiciones farmacéuticas o como composiciones nutricionales, p. ej., como producto alimenticio.

También se proporcionan usos terapéuticos de los microorganismos, cepas, composiciones y formulaciones según se define en la presente memoria (p. ej., una o más de las cepas depositadas).

Un modo apropiado de administración y formulación de los microorganismos, cepas, composiciones, formulaciones, etc., se elige dependiendo del sitio de la enfermedad. No obstante, un modo de administración preferido es oral o rectal; sin embargo, también puede ser igualmente apropiada una inyección intravenosa o intramuscular.

Las dosis apropiadas de los microorganismos, cepas, composiciones y formulaciones según se define en la presente memoria pueden ser fácilmente seleccionadas o determinadas por una persona con experiencia en función del trastorno a tratar, el modo de administración y la formulación en cuestión. Por ejemplo, se selecciona un régimen de dosificación y de administración tal que los microorganismos, las cepas, las composiciones o las formulaciones administradas a un individuo puedan dar lugar a un beneficio terapéutico o para la salud. Por ejemplo, se pueden utilizar dosis diarias de microorganismos de 10^4 a 10^{12}, por ejemplo, de 10^5 a 10^{10}, o de 10^6 a 10^8, o de 10^8 a 10^{10} UFC totales.

Por lo tanto, se proporcionan productos o composiciones o formulaciones o kits que contienen más microorganismos anaerobios tolerantes al oxígeno obtenidos, etc., mediante los métodos de la presente invención o definidos de cualquier otra manera en la presente memoria. De forma ventajosa, estos productos tienen un período de validez mayor o un período de almacenamiento más amplio.

Los productos o composiciones preferidas comprenden bacterias congeladas, desecadas por congelación, liofilizadas o secas (ver también los ejemplos) y están preferiblemente en un formato de dosis unitaria, p. ej., una cápsula o comprimido o gel. Las dosis apropiadas (p. ej., en forma de cantidad de bacterias o UFC) para usar en dichos productos, etc., se describen en otras partes de la presente descripción y en los Ejemplos. Otros componentes también pueden incluirse en estos productos, etc., por ejemplo, conservantes (p. ej., glicerol), estabilizantes, agentes gelificantes y/o crioprotectores. En algunas realizaciones, dichos componentes adicionales son agentes no naturales.

Cuando se hace referencia a concentraciones, niveles o crecimiento menores (o reducidos), entonces preferiblemente tales disminuciones o reducciones (y, de hecho, otras reducciones o disminuciones o efectos negativos, como se menciona en otra parte de la presente memoria) son disminuciones medibles, más preferiblemente son disminuciones significativas, preferiblemente disminuciones estadísticamente significativas, por ejemplo, con un valor de probabilidad de ≤ 0,05, en comparación con un nivel o valor de control adecuado.

Cuando en la presente memoria se hace referencia a concentraciones, niveles, tensión o crecimiento aumentados (o elevados), p. ej., aumentos graduales, o aumento del estrés oxidativo, flujo (o difusión o concentración) de oxígeno, o tolerancia al oxígeno, entonces preferiblemente tales aumentos (y, de hecho, otros aumentos o efectos positivos como ya se ha mencionado en otra parte de la presente memoria) son aumentos medibles, más

preferiblemente son aumentos significativos, preferiblemente aumentos estadísticamente significativos, por ejemplo con un valor de probabilidad de ≤ 0,05, en comparación con un nivel o valor de control apropiado.

De hecho, cuando se describen cambios significativos en la presente memoria, se prefiere que dichos cambios sean cambios estadísticamente significativos, por ejemplo, con un valor de probabilidad de ≤ 0,05, en comparación con un nivel o valor de control apropiado.

Los siguientes son algunos ejemplos de la invención, los cuales no se deben considerar limitativos del uso de la presente invención, sino para mostrar ejemplos prácticos en detalle de cómo se puede utilizar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Adaptación de microorganismo anaerobio al ambiente oxidado

Se aisló una cepa de *Faecalibacterium prausnitzii* de las heces de voluntarios sanos mediante la técnica del cultivo puro microbiológico en condición anaerobia estricta (5 % H_2, 15 % CO_2 y 80 % N_2) empleada en una cámara de Coy y se denominó FBT-22 (DSM 32186). (FBT-22 se depositó en cumplimiento del Tratado de Budapest en DSMZ (Instituto Leibniz DSMZ - colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 20 de octubre de 2015 y se le dio el número de registro DSM 32186). El medio de cultivo de rutina usado para el aislamiento contiene lo siguiente (g/l); extracto de levadura: 2,5; casitona: 10; glucosa: 4,5; cloruro de sodio: 0,9; fosfato dipotásico: 0,45; dihidrogenofosfato de potasio: 0,45; sulfato de amonio: 1,32; bicarbonato de sodio: 4 g; cisteína: 1. resazurina: 0,001; hemina: 0,01. La mezcla de vitaminas contiene: 10 µg de biotina, 10 µg de cobalamina, 30 µg de ácido p-aminobenzoico, 50 µg de ácido fólico y 150 µg de piridoxamina. Las concentraciones finales de short-chain fatty acidos (ácidos grasos de cadena corta - SCFA) en el medio eran: acetato 33 mM, propionato 9 mM e isobutirato, isovalerato y valerato a una concentración de 1 mM cada uno. Todos los componentes se añadieron asépticamente mientras los tubos se lavaban con CO_2. Las vitaminas lábiles al calor se esterilizaron por filtración con filtro de 0,22 µm y se añadieron después de tratar el medio en autoclave dando una concentración final de 0,05 µg de tiamina ml^{-1} y 0,05 µg de riboflavina ml^{-1}. El pH final del medio se ajustó con NaOH 1N o HCl 1N a 7,2 ± 0,2. El medio se trató en un autoclave a 100 kPa a 121 ºC durante 15 min. Se empleó cisteína para simular el potencial redox colónico del medio de cultivo y resazurina como indicador redox. Se preparó inóculo para el biorreactor SHIRM inoculando una única colonia en 7 ml de medio de cultivo. Al cabo de 12 h-16 h de incubación a 37 ºC, el cultivo alcanzó la fase exponencial tardía (OD_{600} ~0,7). Se conservaron dos tubos de alrededor de 0,5 ml del cultivo maestro en glicerol al 20 % a -80 ºC y se designaron como FFR. Estas mezclas madre de FFR se designan FFR-M1.1 y FFR-M1.2. Se inoculó FFRM1.1 directamente en 7 ml del medio de cultivo sin descongelar. Los inóculos se incubaron de forma anaerobia durante 12 h-16 h a 37 ºC de incubación cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial tardía (OD_{600} ~0,7), se inocularon 2,5 ml de cultivo en un biorreactor SHIRM de 250 ml. La proporción de este cultivo maestro se conservó en duplicados (como se ha mencionado anteriormente) y se designó como FFR-M2.1 y FFR-M2.2. En caso de contaminación o percance el experimento se puede salvar mediante los correspondientes cultivos de FFRM. Sin embargo, la composición del medio de cultivo de lecho SHIRM (SBCM) es la misma que se usa para el aislamiento primario de la cepa FBT-22 (DSM 32186); después, la concentración de cisteína se redujo y equilibró con una cantidad equivalente de cistina. Los potenciales de oxidación eléctricos aplicados se mantuvieron mediante tensión externa sobre ánodo de grafito (8,5 cm x 0,25 cm x 2,5 cm) mediante potenciostato. El circuito de la celda se completó conectando la cámara catódica a un brazo lateral separado por una membrana de intercambio de protones. El flujo de oxígeno se controló contectando el alimentador de oxígeno a la cámara anódica separada a través del septo variable que tiene constantes de difusión de oxígeno diferentes. El flujo de oxígeno instantáneo se midió mediante una sonda de DO de tipo Clark. El flujo de oxígeno se controla purgando el alimentador de oxígeno con oxígeno puro, que se difunde en la cámara anódica mediante una membrana semipermeable. Los coeficientes de difusión (D_{Om}) y la constante de transferencia de masa (K_{Om}) de oxígeno en la membrana son $2{,}4 \times 10^{-6}$ cm^2/s y $1{,}3 \times 10^{-4}$ cm/s respectivamente. Además, el flujo de oxígeno se controló cambiando el volumen del lecho de alimentador de oxígeno, por ejemplo, 250 ml o 100 ml, tal como se muestra en la Fig. 6. El alimentador de oxígeno también se puede eliminar para permitir la difusión directa de oxígeno hacia la cámara anódica, como se muestra en la Fig. 7. El recubrimiento de mucina de agar de la membrana de septo controla, además, la difusión de oxígeno hacia la cámara anódica. La mucina de agar se preparó disolviendo y tratando en autoclave los siguientes componentes (g/l): Agar: 2; NaCl: 8; KCl: 0,2; Na_2HPO_4: 1,42; KH_2PO_4: 0,24; Mucina de tipo II: 5. El medio se trató en un autoclave a 100 kPa a 121 ºC durante 15 min. El SHIRM contiene SBCM, que se purgó con nitrógeno exento de oxígeno durante 15 min para retirar el oxígeno disuelto. La concentración celular final en el reactor SHIRM se estableció en torno a OD_{600} ~0,005.

A continuación, el SBCM usado para la primera inoculación con FFR-M2.1, se designó SBCM 8,0/ $V_{0,1}$, donde el primer número ("8") indica la concentración de cisteína (mM) y el último número ("0") la concentración de cistina (mM) y "V" indica la tensión aplicada frente a Ag/AgCl. Cada experimento comenzará con flujo de oxígeno cero y el oxígeno se difunde desde el alimentador de oxígeno a una velocidad constante predefinida. El biorreactor

SHIRM estuvo en funcionamiento durante 24 h a 37 ºC hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria bajo un potencial de oxidación de +100 mV.

El cultivo recuperado después de la primera incubación se designó "población P1" que es de alrededor de 5 generaciones. Las mezclas madre congeladas de este lote se denominaron FFR-P1.1 y FFR-P1.2. Los 2,5 ml de FFR P1.1 se inocularon en un reactor SHIRM nuevo que tenía SBCM 7,1/$V_{0,2}$. Las reinoculaciones se continuaron hasta el subcultivo 6 obteniéndose FFR-P6 y se almacenaron los correspondientes FFR-P en cada subcultivo intermedio. En esta etapa, la concentración de cisteína se redujo a 3 mM y se aumentó la cistina a 5 mM mientras se aumentaba el potencial de oxidación a 600 mV frente a AgAgCl. En esta etapa, se realizaron las inoculaciones repetidas hasta el subcultivo 27 manteniendo todas las condiciones constantes, mientras se utilizaba medio fresco para cada subcultivo. Después del subcultivo 27, las inoculaciones se continuaron hasta el subcultivo 30 como se muestra en la Figura 5.

Ejemplo 2

Selección de la cepa evolucionada adaptada a ambiente oxidante

Se analizan los diversos FFR-P del Ejemplo 1 para seleccionar una cepa adaptada al ambiente oxidante y oxígeno, que se puede usar para una producción adicional.

El análisis se basa en metagenómica comparativa, caracterización metabólica, cinética de crecimiento, estabilidad y tolerancia.

La caracterización metabólica comparativa se realiza mediante perfil de ácidos grasos, más precisamente la producción de butirato en diversos prebióticos, tales como la inulina y almidón resistente.

La cinética de crecimiento comparativa incluida la producción de biomasa y la velocidad de crecimiento se realizan en medios de cultivo normales con o sin sales biliares y prebióticos.

La estabilidad y la tolerancia comparativa se realizan en presencia de fluido gástrico simulado/fluido intestinal simulado con o sin enzimas y exposiciones a aire ambiental durante 30 min.

La test solution (solución de ensayo - TS) de fluido gástrico simulado se prepara según las directrices de la United States Pharmacopeia (Farmacopea de Estados Unidos - USP) disolviendo 2,0 g de cloruro de sodio y 3,2 g de pepsina purificada (derivada de mucosa estomacal porcina, con una actividad de 800 a 2500 unidades por mg de proteína), en 7,0 ml de ácido clorhídrico y agua hasta 1000 ml. Esta solución de prueba tiene un pH de aproximadamente 1,2.

La solución de prueba (TS) de fluido intestinal simulado USP se prepara disolviendo 6,8 g de fosfato monobásico de potasio en 250 ml de agua y añadiendo a continuación 77 ml de hidróxido de sodio 0,2 N y 500 ml de agua. Se añade 10,0 g de pancreatina y la solución resultante se ajusta con hidróxido de sodio 0,2 N o ácido clorhídrico 0,2 N a un pH de 6,8 ± 0,1 y, finalmente, se diluye a 1000 ml.

La celda de combustible microbiano y la reducción dependiente de flavina del 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato se usó para evaluar las expresiones de citocromo en poblaciones de células de FFR-M y FFR-P mientras se evaluaba la actividad de diaperasa mediante sal nitroazul de tetrazolio.

Se selecciona la cepa mejor adaptada.

Ejemplo 3

Ejemplo adicional de adaptación de microorganismo anaeróbico al ambiente oxidado

El trascurso de todas las etapas del Ejemplo 1 hasta la etapa del cultivo recuperado después de la primera incubación se designó "Población P1" que es de alrededor de cinco generaciones. Las mezclas madre congeladas de este lote se denominaron FFR-P 1.1 y FFR-P 1.2. Los 2,5 ml de FFR-P 1.1 se inocularon en un nuevo reactor SHIRM que tenía SBCM 7,1/$V_{0,2}$. Las reinoculaciones se continuaron hasta el subcultivo 6 obteniéndose FFR-P6 y se almacenaron los correspondientes FFR-P en cada subcultivo intermedio. En esta etapa, la concentración de cisteína se redujo a 3 mM y la cistina se aumentó a 5 mM mientras se aumentaba el potencial de oxidación a 600 mV frente a AgAgCl.

Pero en este Ejemplo 3 comparado con el Ejemplo 1, esta etapa de inoculaciones repetidas se llevó a cabo hasta el subcultivo 10 en total, manteniendo todas las condiciones constantes, mientras que en cada subcultivo se usó medio fresco según muestra la Figura 8.

Ejemplo 4

Selección de cepa evolucionada del ejemplo 3

Los diversos FFR-P del Ejemplo 3 se analizan para seleccionar una cepa adaptada al ambiente oxidante y al oxígeno, que se puede usar para la producción adicional.

La selección de cepas adaptadas se basa en las siguientes etapas:

a. En cada etapa mostrada en la Figura 8 se recogió una alícuota de 100 µl.

b. La muestra de la "etapa a" se diluyó en serie (hasta 10^3) en air saturated phosphate buffer saline (tampón fosfato salino saturado en aire - PBS) según muestra la Figura 9 y se incubó en viales herméticos al aire a temperatura ambiente.

c. Se llevaron los viales a la cámara anaerobia y se inoculó una alícuota de 50 µl sobre medio YCFAG (Tabla 4).

d. Las placas se incubaron anaeróbicamente durante 24-72 h

e. Después de la incubación, se evaluaron visualmente los recuentos viables.

f. En función del morfotipo de colonia, se seleccionó cualquier variante que surgiera tras el entrenamiento y se purificó mediante la técnica de cultivo puro clásica

g. Se verificó la pureza de las cepas adaptadas mediante tinción de Gram

h. Se designaron cinco cepas adaptadas seleccionadas de la etapa f como TCS1, LTCS, STCS, OCS-1 y OCS-2.

i. Los detalles completos de las cepas adaptadas aisladas, incluidas las respectivas condiciones y etapas de aislamiento se presentan en la Tabla 2.

j. Las identificaciones preliminares de cepas adaptadas se fundamentaron en tinción de Gram, fenotipado metabólico (perfiles de ácido graso de cadena corta) y PCR cuantitativa (qPCR) utilizando cebadores específicos de *F. prausnitzii*.

k. Las identificaciones de cepas se confirmaron mediante secuenciación de 16SrDNA.

l. La estabilidad de la tolerancia al oxígeno de las cepas adaptadas se evaluó como se presenta en la Fig. 10. Las respectivas cepas adaptadas se cultivaron anaeróbicamente en medio YCFAG 12 h-14 h y se diluyeron en series de 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 y/o 10^5. Se inocularon 100 µl o 50 µl de cultivos diluidos en serie en placas con medio YCFAG por duplicado. Un conjunto de placas se incubó en condiciones anaerobias y sirven como control mientras que el otro conjunto se incubó aeróbicamente durante 20 minutos. Durante 20 min de exposición al aire ambiente, el oxígeno se difunde completamente en la placa de agar adquiriendo un color rosa. El tinte indicador redox reazurina, que es incoloro en estado reducido, se vuelve rosa tras la oxidación, lo que garantiza la completa difusión de oxígeno en el medio de la placa de cultivo. Después de la exposición a los tratamientos respectivos como se representa en la Fig. 10, las placas de prueba y de control se incubaron en condiciones anaerobias durante 48 h-72 h y se evaluaron visualmente los recuentos viables.

m. Después de la confirmación de la cepa mediante secuenciación de 16SrDNA, las cepas adaptadas de *F. prausnitzii* TCS1, OCS-1 y OCS-2 se seleccionaron en función de su tolerancia al oxígeno y se han depositado en cumplimiento del Tratado de Budapest en DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) y se le dio el número de registro DSM 32380, DSM 32378 y DSM 32379, respectivamente.

n. La tolerancia al oxígeno de la cepa de tipo *F. prausnitzii*, la cepa progenitora y las cepas adaptadas se representan en la Tabla 3.

	Código de cepa	**Nombre completo**	**Condición de aislamiento**
1	TCS1	*Transluscent colonies smooth* (colonias traslúcidas lisas)	6° ciclo de 3,5/$V_{0,6}$ (1:100)
2	LTCS	*Large transluscent colonies smooth* (colonias traslúcidas grandes lisas)	10° ciclo de 3,5/$V_{0,6}$ (1:1000)
3	STCS	*Small transluscent colonies smooth* (colonias traslúcidas pequeñas lisas)	10° ciclo de 3,5/$V_{0,6}$ (1:1000)
4	OCS-1	*Opaque colonie smooth* (colonia opaca lisa)	10° ciclo de 3,5/$V_{0,6}$ (1:10)
5	OCS-2	*Opaque colonie smooth* (colonia opaca lisa)	10° ciclo de 3,5/$V_{0,6}$ (1:10)

Tabla 2: cepas adaptadas aisladas en ciclos diferentes

	Tratamientos	
	Anaeróbico	**Aeróbico**
Cepas bacterianas	**UFC/ml**	
Faecalibacterium prausnitzii A2-165 (DSM 17677)	1,0E+08	0
Faecalibacterium prausnitzii FBT-22 (DSM 32186)	1,5E+07	0
Faecalibacterium prausnitzii TCS1 (DSM 32380)	7,0E+07	1,0E+03
Faecalibacterium prausnitzii OCS1 (DSM 32378)	6,5E+07	1,0E+05
Faecalibacterium prausnitzii OCS2 (DSM32379)	7,5E+07	7,0E+05

Tabla 3: perfiles de estabilidad de las cepas adaptadas tras la exposición al aire

	g/l	
Casitona	10	Juntos en autoclave
Extracto de levadura	2,5	
NaCl	0,9	
K_2HPO_4	0,45	
KH_2PO_4	0,45	
$NaHCO_3$	4	
$CaCl_2.2H_2O$	0,12	
$MgSO_4.7H_2O$	0,09	
Glucosa	4,5	
Acetato de sodio	2,7	
Cisteína	1	
Sulfato amónico	1,32	
Resazurina	0,001	
Hemina	0,01	
Vitaminas		
	µg/l	añadir después del autoclave
Biotina (B7)	10	Esterilizar filtro
Cobalamina (B12)	10	
PABA	30	
Ácido fólico	50	
Piridoxamina	150	
Riboflavina (B2)	50	
Tiamina (B1)	50	
SCFA		
	mM	añadir después del autoclave
Propionato	9	Esterilizar filtro
Isobutirato	1	
Isovalerato	2	
Valerato	3	

Ajustar al final alrededor de pH 7,2
Tabla 4: Medio YCFAG para *F. prausnitzii*

Ejemplo 5

Caracterización genética de cepas evolucionadas

Las cepas evolucionadas generadas durante cada subcultivo en el Ejemplo 1 se caracterizan mediante next generation sequencing (secuenciación de nueva generación - NGS). Los cultivos FFR-M y todos los FFR-P se someten a NGS para su análisis genómico de profundidad para revelar las posible mutaciones que se hayan producido en la progenie de FFR-P evolucionada/adaptada. Las diferencias entre las cepas FFR-M y FFR-P se estudian también a niveles transcriptómicos mediante RNA-seq.

Ejemplo 6

Mayor producción de microorganismos anaerobios

La configuración de producción implicará las condiciones optimizadas obtenidas del Ejemplo 1. La configuración de cultivo del microorganismo del Ejemplo 2 será la misma que en el Ejemplo 1, pero implicará solamente una etapa en los estados oxidantes establecidos, incluida la tensión, par cisteína/cistina y flujo de oxígeno.

Las condiciones de fermentación optimizadas son las siguientes; un septo de membrana que tiene un coeficiente de transferencia de masa (K_{Om}) de oxígeno de $1{,}3x10^{-4}$ cm/s y la velocidad de difusión de oxígeno a la cámara anódica de alrededor de 0,2 nmoles $ml^{-1}min^{-1}$, tensión aplicada 0,6 V frente a AgAgCL, cisteína 3 mM, cistina 5 mM y potencial redox inicial del medio de cultivo SBCM de alrededor de -188 mV.

La etapa de fermentación se realiza en un recipiente eléctricamente aislado de 150 litros fabricado de material plástico con base de fluoropolímero, en una configuración de tres cámaras. Figura 4c. Se inocula usando la preparación del Ejemplo 2 anterior.

La suspensión celular de la fermentación se separa en una centrífuga continua de Alfa Laval y se mezcla con crioprotectores estándar, como es conocido en la técnica. Se realiza una etapa de lavado para evitar las reducciones del punto de congelación en el proceso de liofilización.

En el sitio de liofilización, se vierte la suspensión celular sobre cada placa en el liofilizador. La suspensión celular de *Faecalibacterium prausnitzii* tiene un contenido de materia seca de 18 % y se liofiliza durante un período de cuatro a cinco días.

Si no, la fermentación y la liofilización del microorganismo se realiza como es conocido en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la adaptación de microorganismos anaerobios y la selección de microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno, comprendiendo dicho método las etapas de cultivar dichos microorganismos con una doble inducción gradual de estrés oxidativo mediante un aumento gradual de la tensión aplicada y de la difusión de oxígeno, y una reducción gradual en la concentración de antioxidante combinada con un incremento gradual en la concentración de equivalente opuesto oxidado para cambiar la relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado para ajustar el estado redox, en donde la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantiene a una concentración subletal en la que se eliminan algunos pero no todos los microorganismos.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el equivalente opuesto antioxidante/oxidado se selecciona del grupo que consiste en cisteína/cistina, glutatión/estado oxidado de glutatión, ácido ascórbico/deshidroascorbato, ditiotreitol/ditiotreitol oxidado y ácido gálico/ácido gálico oxidado.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde las condiciones iniciales para dicho método se seleccionan de uno o más, o todos, de: flujo de oxígeno bajo o cero, tensión aplicada baja, concentración alta de antioxidante y concentración baja o concentración cero del equivalente opuesto oxidado y un medio de cultivo del cual se ha eliminado oxígeno.

4. El método de la reivindicación 3, en donde las condiciones iniciales se seleccionan de uno o más, o todos, de: cisteína 8 mM, cistina 0 mM, una tensión aplicada de 0,1 V, y un flujo de oxígeno cero o bajo.

5. El método de la reivindicación 4, en donde los cambios graduales se prolongan hasta uno o más, o todos, de: una concentración de cisteína mínima de 3 mM, una concentración de cistina máxima de 5 mM, una tensión aplicada máxima de 0,6 V, y un flujo de oxígeno alto.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la tensión aplicada no supera 0,6 V, y/o la concentración de cisteína no es inferior a 3 mM y/o la concentración de cistina no es superior a 5 mM.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde una vez han sido completados los cambios graduales, el método comprende una o más etapas adicionales de cultivo de dichos microorganismos en las condiciones finales de tensión aplicada, difusión de oxígeno y relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado alcanzada después de los cambios graduales que comprende, además, de forma opcional, etapas en las que se llevan a cabo cambios graduales adicionales.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho método o etapas adicionales implican reinoculaciones de los microorganismos anaerobios en medios de cultivo nuevos, preferiblemente en donde dichas reinoculaciones implican dichos cambios graduales en las condiciones de cultivo.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde los microorganismos son *Faecalibacterium prausnitzii.*

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho método implica una etapa adicional en donde las cepas adaptadas se analizan en términos de tolerancia al oxígeno y, opcionalmente, producción de butirato y/o evaluación de la cinética de crecimiento, con el fin de seleccionar la cepa mejor adaptada, preferiblemente con características metabólicas mantenidas.

11. Un método de producción mejorada de microorganismos anaerobios que comprende adaptar microorganismos anaerobios y seleccionar microorganismos anaerobios más tolerantes al oxígeno mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y, además, cultivar los microorganismos con una combinación de potencial oxidante/tensión aplicada constante, difusión de oxígeno y relación de concentración de equivalente opuesto antioxidante/oxidado que se ha optimizado para la producción de los microorganismos adaptados al oxígeno, en donde la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se mantiene a una concentración subletal, permitiendo por lo tanto una presión selectiva y dando lugar a un alto rendimiento de microorganismos.

12. El método de la reivindicación 11, en donde (i) dichas condiciones de cultivo comprenden cisteína 3 mM, cistina 5 mM, una tensión aplicada de 0,6 V y flujo de oxígeno de 0,2 $nmolesml^{-1}min^{-1}$; y/o (ii) dicho microorganismo es *Faecalibacterium prausnitzii*.

13. Un cepa de *Faecalibacterium prausnitzii* seleccionada del grupo que consiste en DSM 32380, DSM 32378 y DSM 32379.

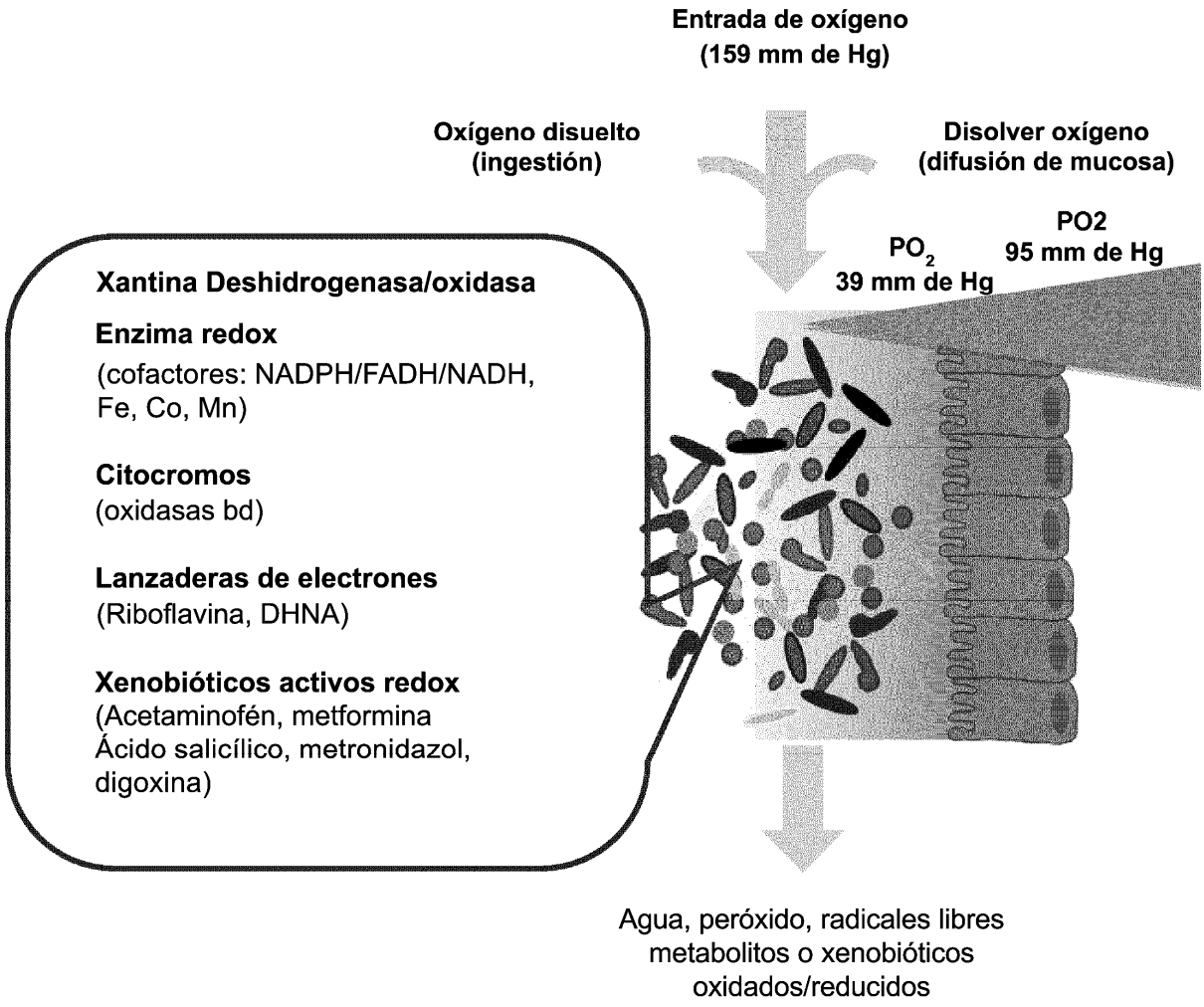
Entrada de oxígeno
(159 mm de Hg)
Oxígeno disuelto
(ingestión)
Disolver oxígeno
(difusión de mucosa)
PO2
95 mm de Hg
PO2
39 mm de Hg
Xantina Deshidrogenasa/oxidasa
Enzima redox
(cofactores: NADPH/FADH/NADH, Fe, Co, Mn)
Citocromos
(oxidasas bd)
Lanzaderas de electrones
(Riboflavina, DHNA)
Xenobióticos activos redox
(Acetaminofén, metformina Ácido salicílico, metronidazol, digoxina)
Agua, peróxido, radicales libres metabolitos o xenobióticos oxidados/reducidos

Figura 1

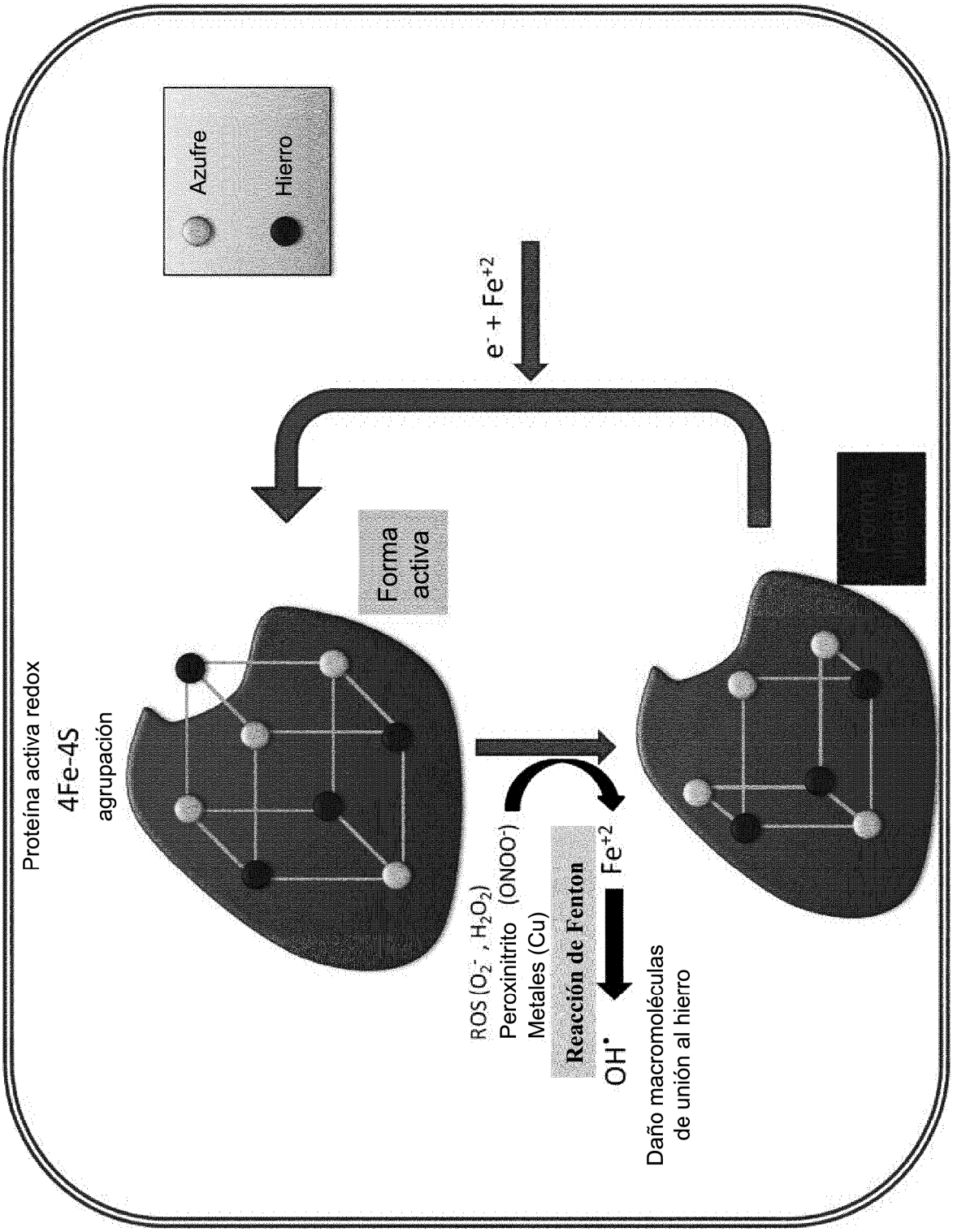
Proteína activa redox
4Fe-4S
agrupación
Forma activa
Azufre
Hierro
e⁻ + Fe+2
ROS (O2⁻ , H2O2)
Peroxinitrito (ONOO⁻)
Metales (Cu)
Reacción de Fenton
OH•
Fe+2
Daño macromoléculas de unión al hierro

Figura 2

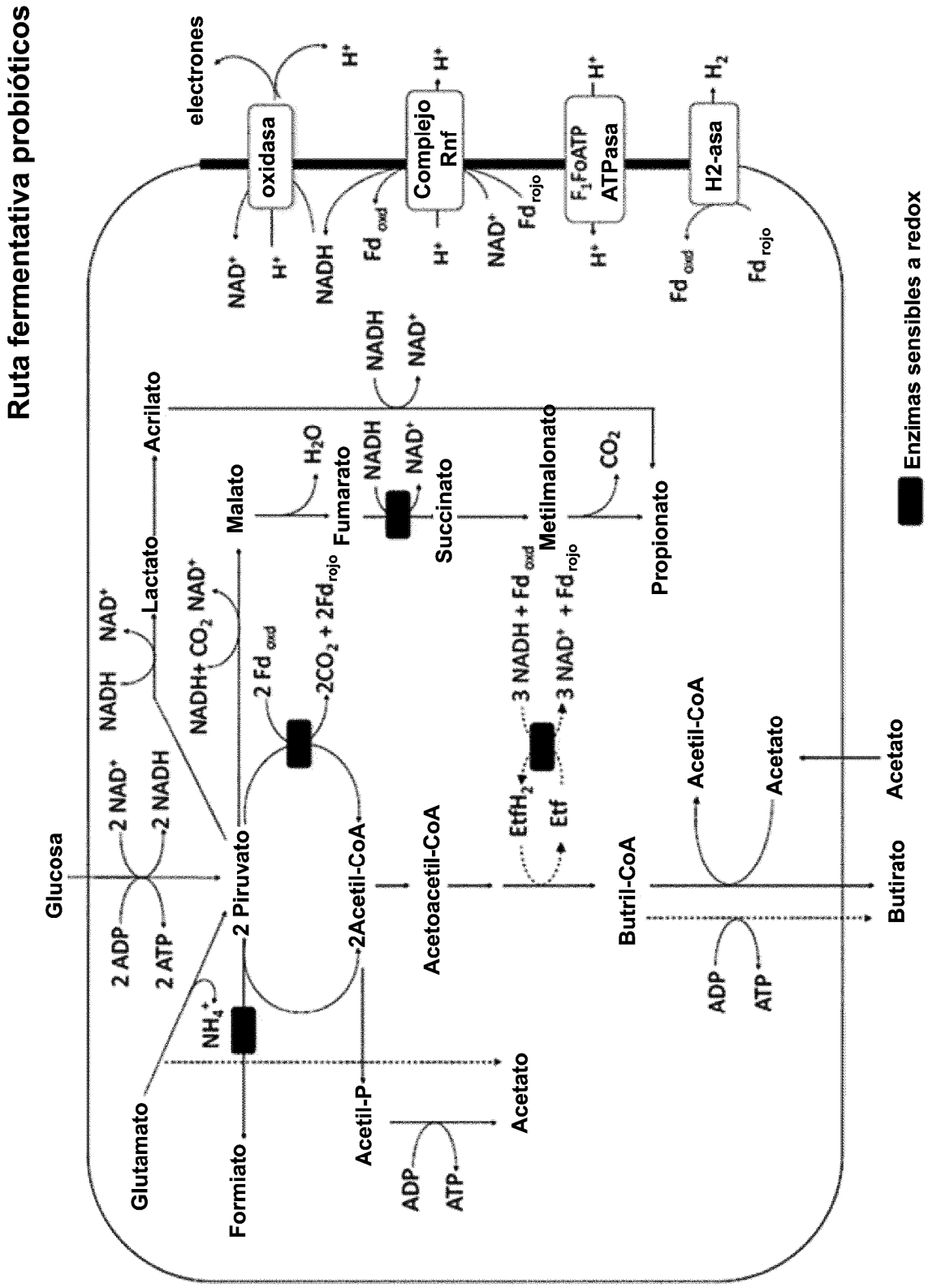
Ruta fermentativa probióticos
electrones
oxidasa
Complejo Rnf
F1FoATP ATPasa
H2-asa
H+
H2
NAD+
NADH
Fd oxd
Fd rojo
Acrilato
Lactato
Malato
Fumarato
Succinato
Metilmalonato
Propionato
H2O
CO2
NADH+ CO2 NAD+
2 Fd oxd
2CO2 + 2Fd rojo
3 NADH + Fd oxd
3 NAD+ + Fd rojo
EtfH2
Etf
Glucosa
2 NAD+
2 NADH
2 ADP
2 ATP
2 Piruvato
2Acetil-CoA
Acetoacetil-CoA
Butril-CoA
Acetil-CoA
Acetato
Butirato
NH4+
Glutamato
Formiato
Acetil-P
ADP
ATP
Enzimas sensibles a redox

Figura 3

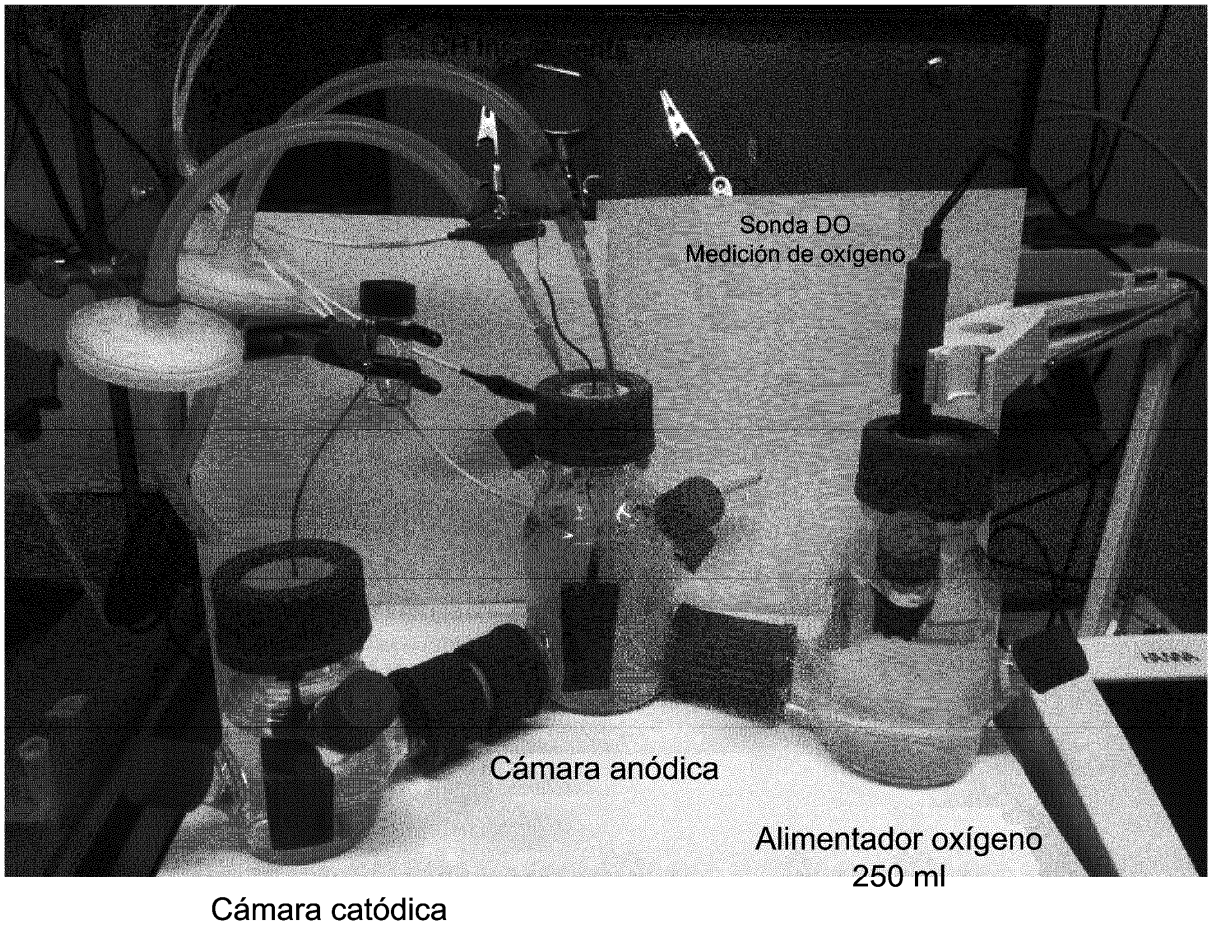
Sonda DO
Medición de oxígeno
Cámara anódica
Alimentador oxígeno
250 ml
Cámara catódica

Figura 4 a

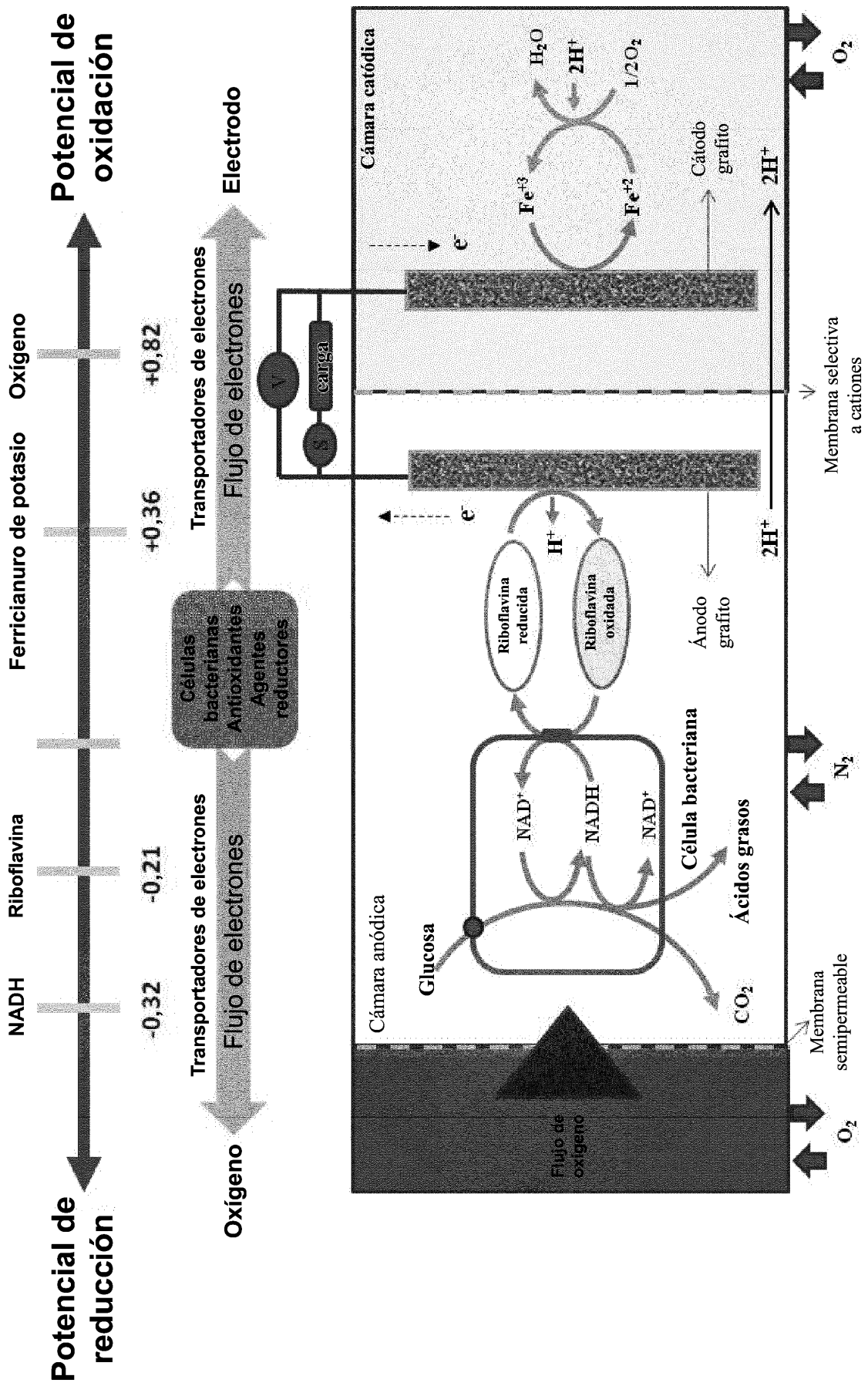
Potencial de oxidación
Potencial de reducción
NADH
Riboflavina
Ferricianuro de potasio
Oxígeno
-0,32
-0,21
+0,36
+0,82
Transportadores de electrones
Flujo de electrones
Electrodo
Oxígeno
Células bacterianas
Antioxidantes
Agentes reductores
carga
Cámara catódica
Cámara anódica
Glucosa
NAD+
NADH
NAD+
Riboflavina reducida
Riboflavina oxidada
H+
e-
e-
Fe+3
Fe+2
H2O
2H+
1/2O2
Cátodo grafito
Ánodo grafito
2H+
2H+
Célula bacteriana
Ácidos grasos
CO2
Membrana selectiva a cationes
Membrana semipermeable
Flujo de oxígeno
O2
N2
O2

Figura 4 b

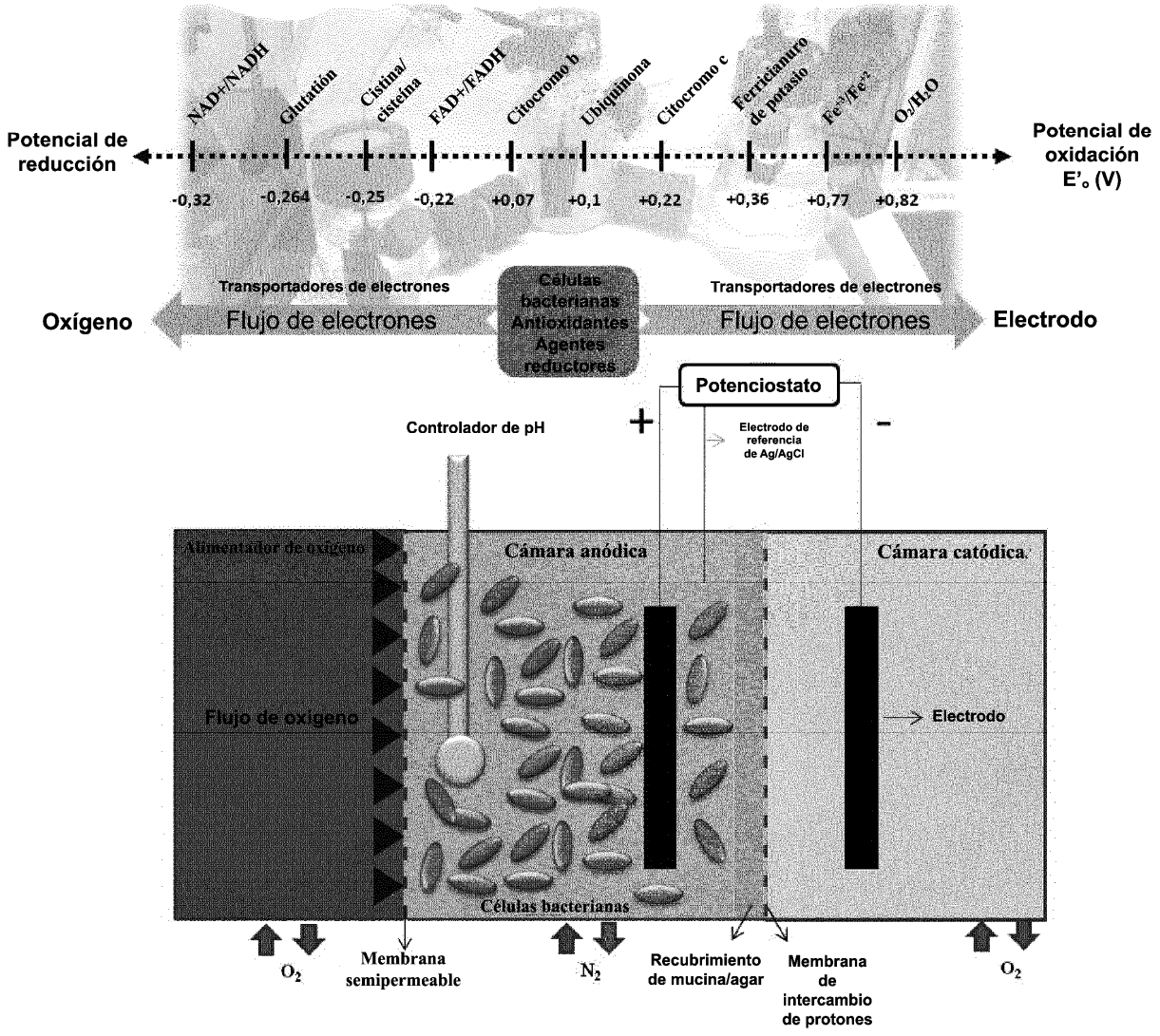
NAD+/NADH
Glutatión
Cistina/ cisteína
FAD+/FADH
Citocromo b
Ubiquinona
Citocromo c
Ferricianuro de potasio
Fe+3/Fe+2
O2/H2O
Potencial de reducción
Potencial de oxidación E'o (V)
-0,32
-0,264
-0,25
-0,22
+0,07
+0,1
+0,22
+0,36
+0,77
+0,82
Transportadores de electrones
Oxígeno
Flujo de electrones
Células bacterianas Antioxidantes Agentes reductores
Transportadores de electrones
Flujo de electrones
Electrodo
Potenciostato
Controlador de pH
+
Electrodo de referencia de Ag/AgCl
-
Alimentador de oxígeno
Cámara anódica
Cámara catódica
Flujo de oxígeno
Electrodo
Células bacterianas
O2
Membrana semipermeable
N2
Recubrimiento de mucina/agar
Membrana de intercambio de protones
O2

Figura 4 c

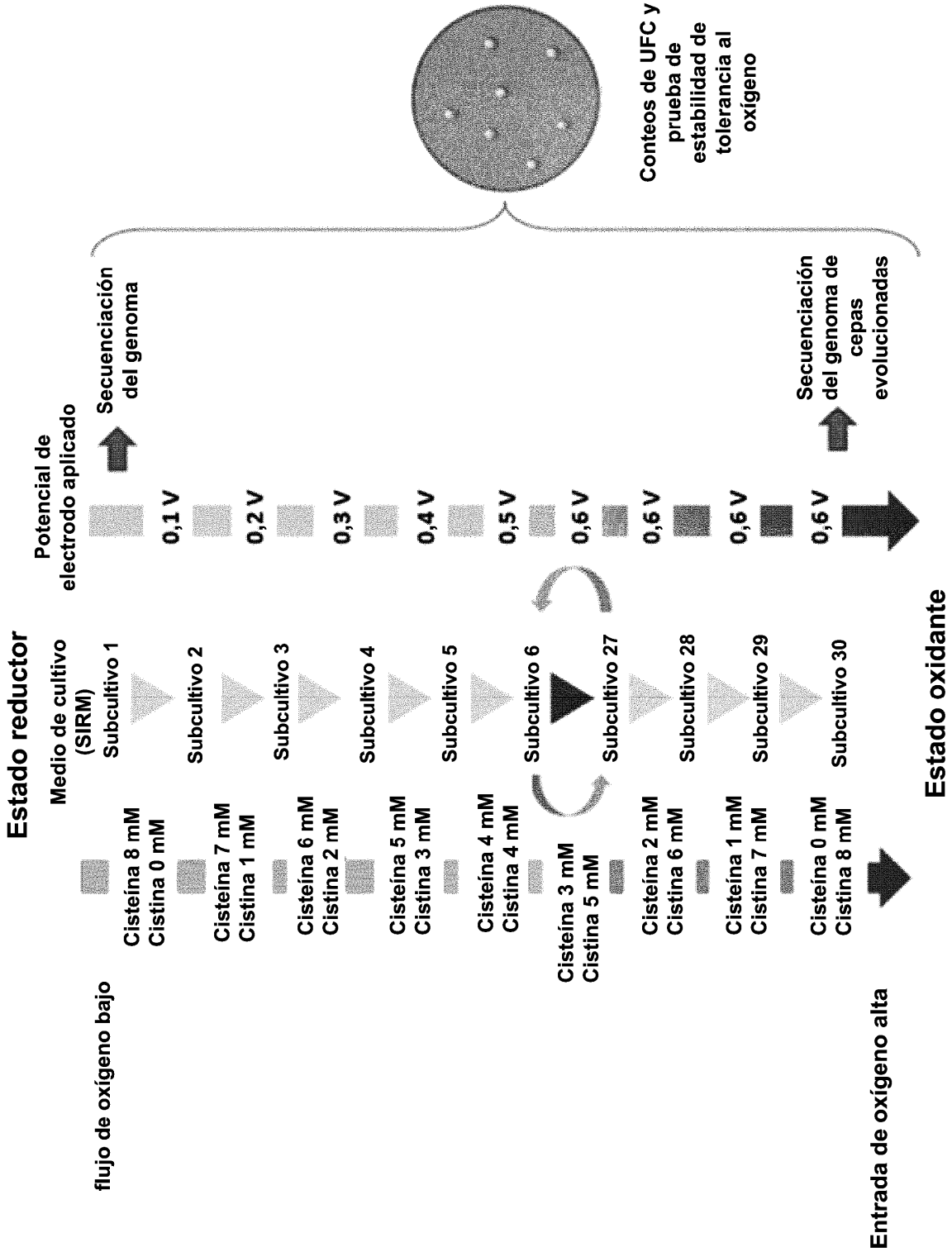
Estado reductor
flujo de oxígeno bajo
Medio de cultivo (SIRM)
Potencial de electrodo aplicado
Cisteína 8 mM
Cistina 0 mM
Subcultivo 1
0,1 V
Cisteína 7 mM
Cistina 1 mM
Subcultivo 2
0,2 V
Cisteína 6 mM
Cistina 2 mM
Subcultivo 3
0,3 V
Cisteína 5 mM
Cistina 3 mM
Subcultivo 4
0,4 V
Cisteína 4 mM
Cistina 4 mM
Subcultivo 5
0,5 V
Cisteína 3 mM
Cistina 5 mM
Subcultivo 6
0,6 V
Subcultivo 27
Cisteína 2 mM
Cistina 6 mM
0,6 V
Subcultivo 28
Cisteína 1 mM
Cistina 7 mM
0,6 V
Subcultivo 29
Cisteína 0 mM
Cistina 8 mM
0,6 V
Subcultivo 30
Entrada de oxígeno alta
Estado oxidante
Secuenciación del genoma
Conteos de UFC y prueba de estabilidad de tolerancia al oxígeno
Secuenciación del genoma de cepas evolucionadas

Figura 5

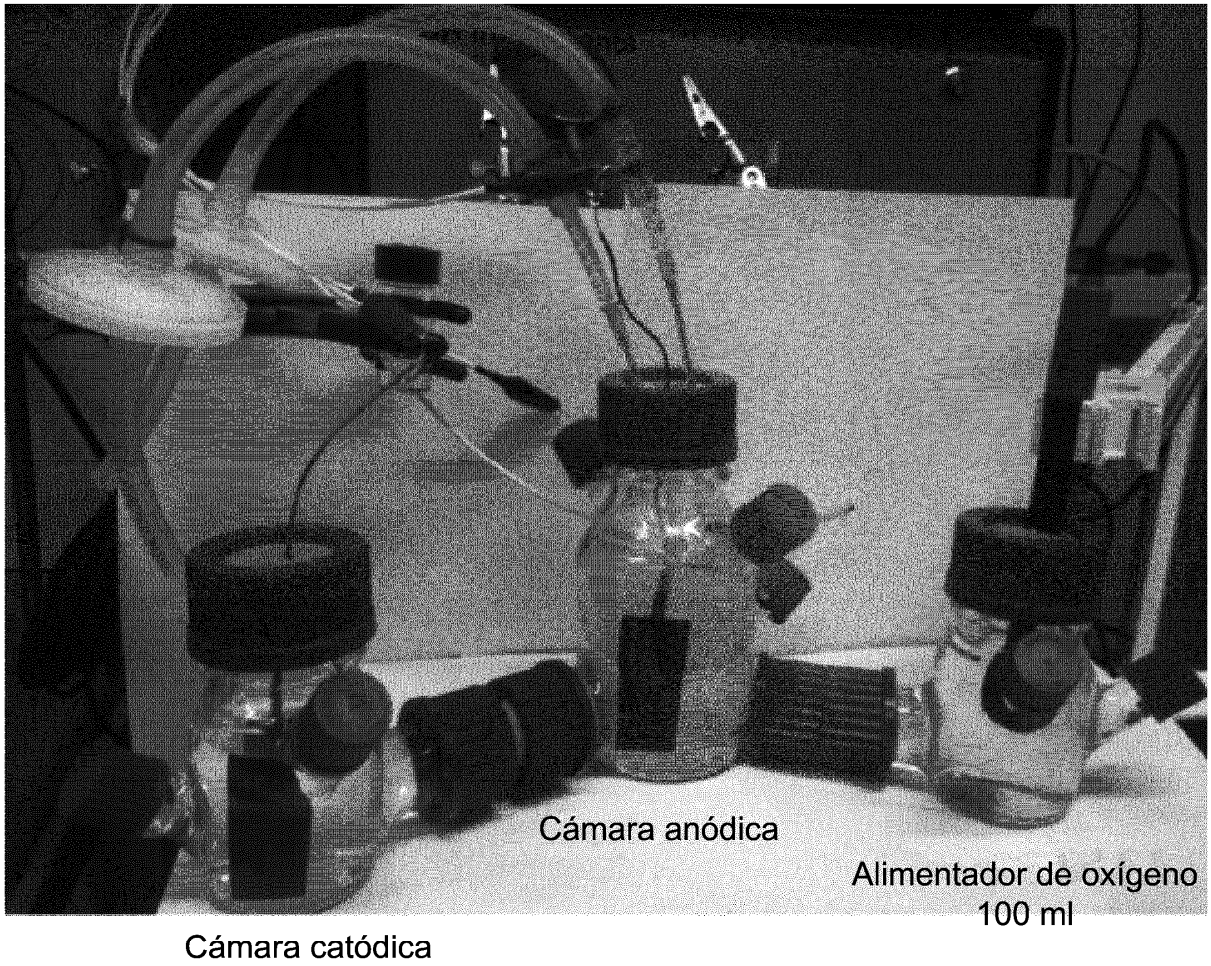
Cámara anódica
Alimentador de oxígeno
100 ml
Cámara catódica

Figura 6

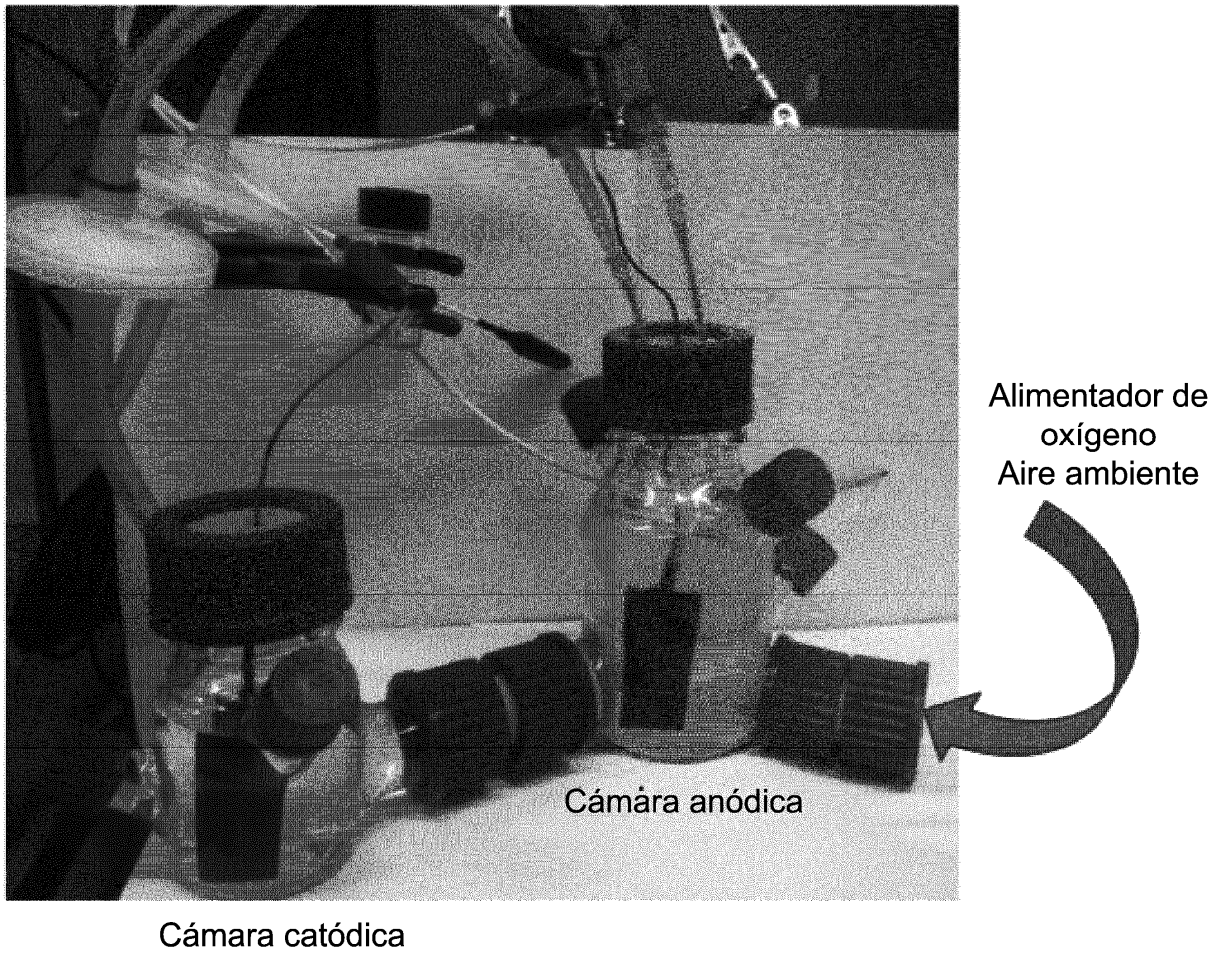
Alimentador de
oxígeno
Aire ambiente
Cámara anódica
Cámara catódica

Figura 7

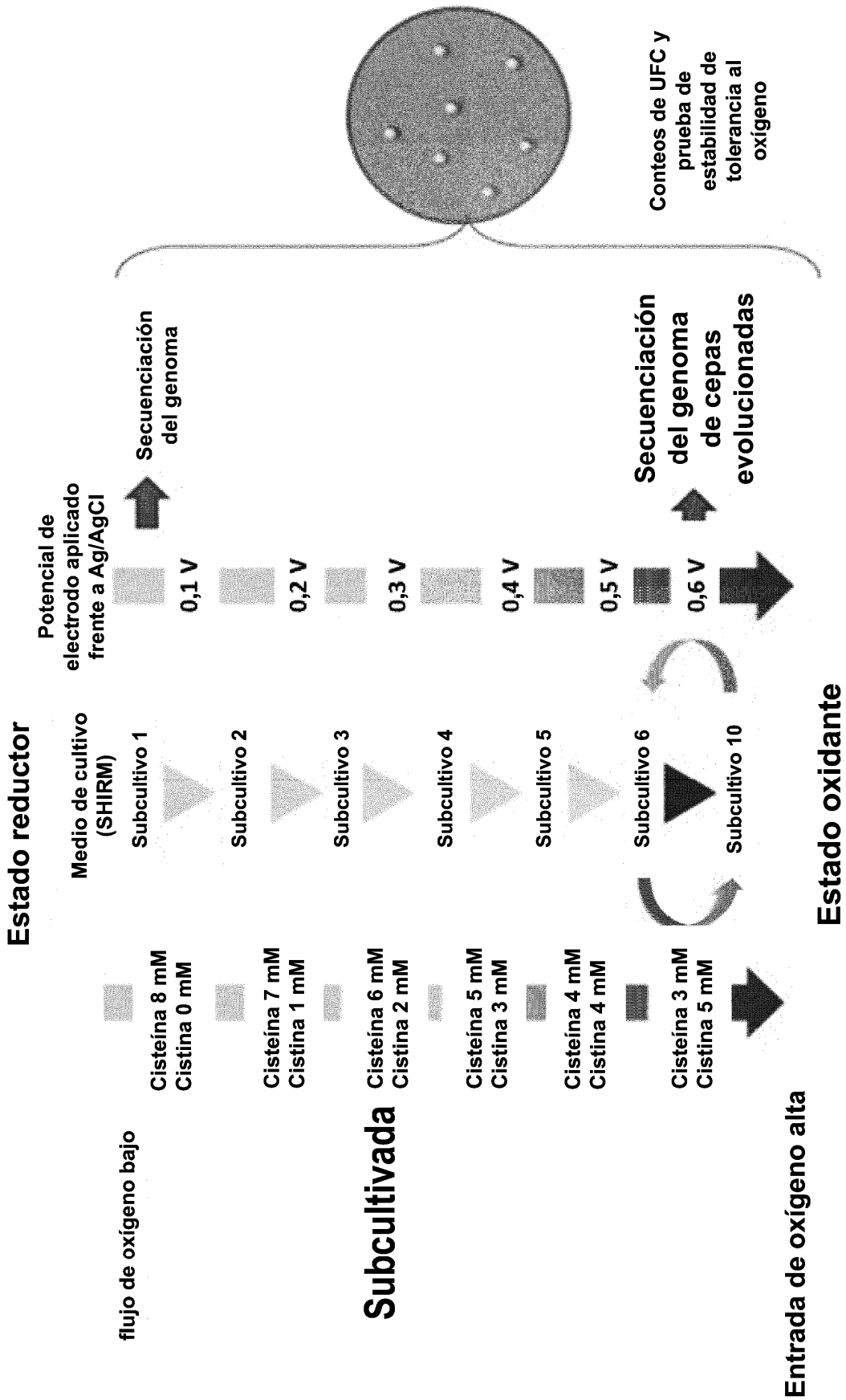
Estado reductor
Medio de cultivo (SHIRM)
Potencial de electrodo aplicado frente a Ag/AgCl
Secuenciación del genoma
Subcultivo 1
0,1 V
Subcultivo 2
0,2 V
Subcultivo 3
0,3 V
Subcultivo 4
0,4 V
Subcultivo 5
0,5 V
Subcultivo 6
0,6 V
Subcultivo 10
Secuenciación del genoma de cepas evolucionadas
Conteos de UFC y prueba de estabilidad de tolerancia al oxígeno
flujo de oxígeno bajo
Cisteína 8 mM
Cistina 0 mM
Cisteína 7 mM
Cistina 1 mM
Subcultivada
Cisteína 6 mM
Cistina 2 mM
Cisteína 5 mM
Cistina 3 mM
Cisteína 4 mM
Cistina 4 mM
Cisteína 3 mM
Cistina 5 mM
Entrada de oxígeno alta
Estado oxidante

Figura 8

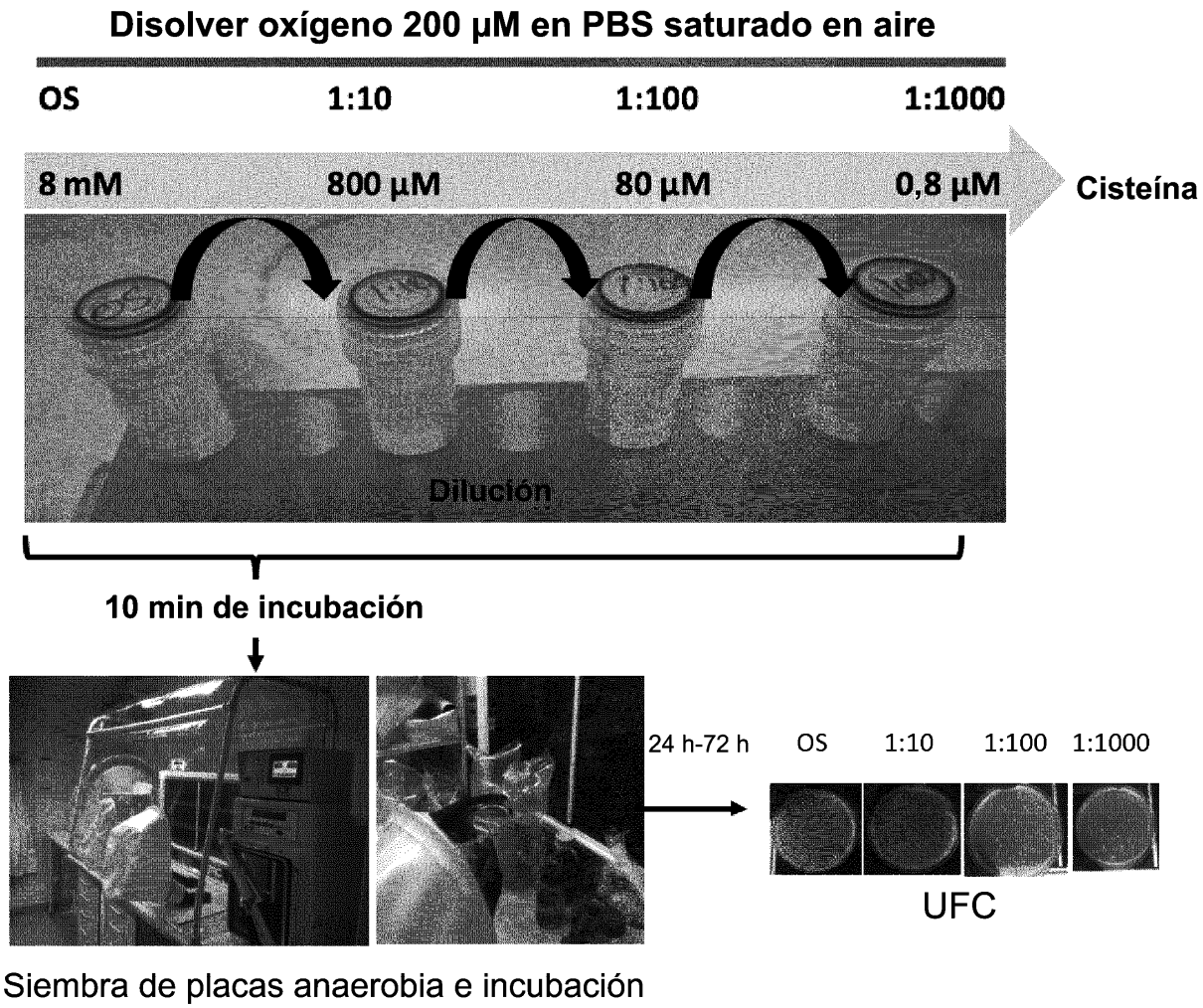
Disolver oxígeno 200 µM en PBS saturado en aire
OS
1:10
1:100
1:1000
8 mM
800 µM
80 µM
0,8 µM
Cisteína
Dilución
10 min de incubación
24 h-72 h
OS
1:10
1:100
1:1000
UFC
Siembra de placas anaerobia e incubación

Figura 9

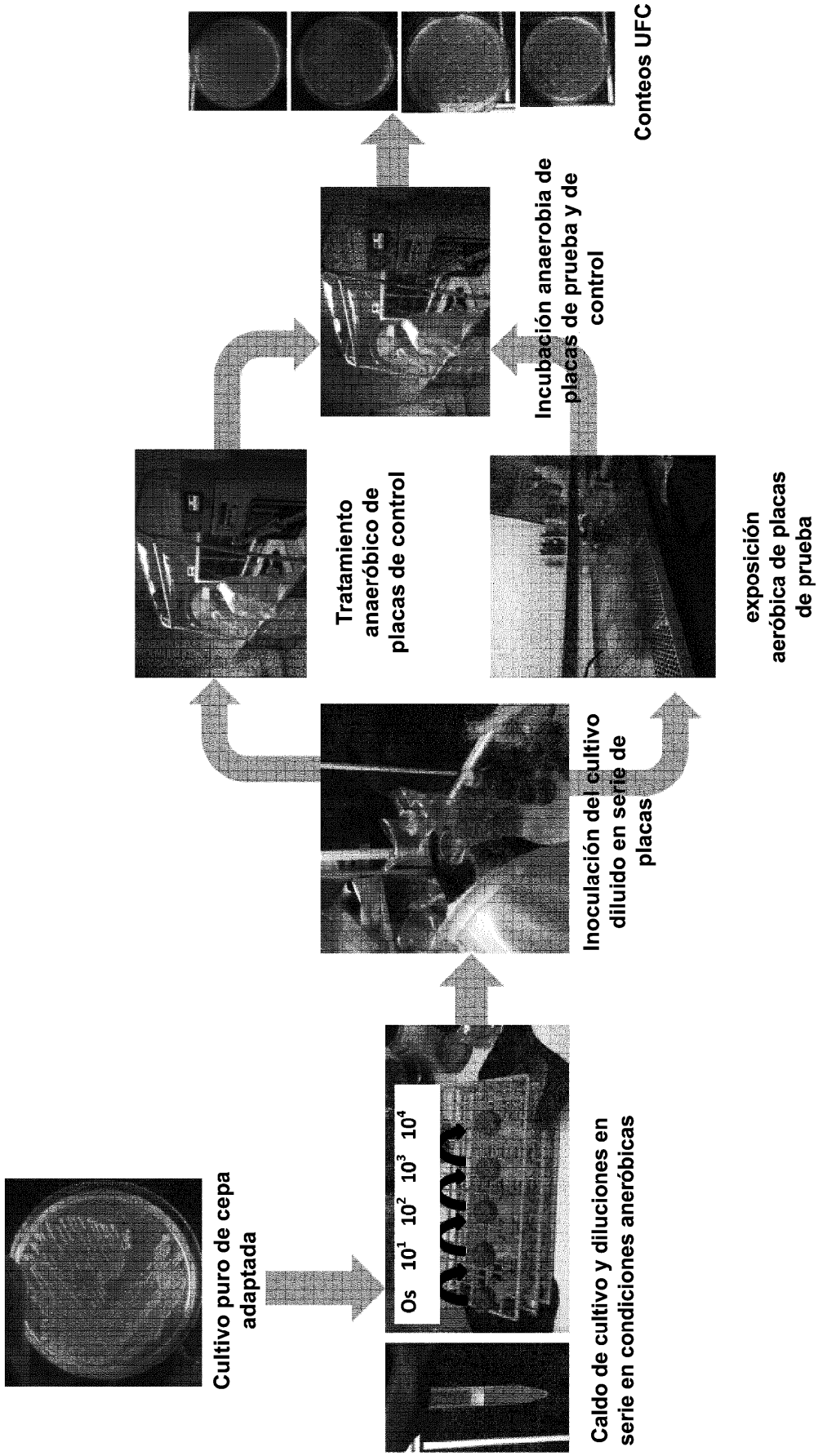
Cultivo puro de cepa adaptada
Os 10^1 10^2 10^3 10^4
Caldo de cultivo y diluciones en serie en condiciones aneróbicas
Inoculación del cultivo diluido en serie de placas
Tratamiento anaeróbico de placas de control
exposición aeróbica de placas de prueba
Incubación anaerobia de placas de prueba y de control
Conteos UFC

Figura 10