

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 099**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689	(2008.01)
C12N 15/74	(2006.01)
A23L 29/00	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A23C 9/12	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)
C12Q 1/02	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2014 PCT/JP2014/081987**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15083743**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2014 E 14867867 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3081643**

54 Título: **Método para regular la resistencia a los ácidos de microbios**

30 Prioridad:

04.12.2013 JP 2013251362

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

30.10.2019

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)
1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku
Tokyo 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUMOTO, HOSHITAKA;
MIURA, MIKA;
KIWAKI, MAYUMI y
IINO, TOHRU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 729 099 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 para regular la resistencia a los ácidos de microbios

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para regular la resistencia a los ácidos de un microorganismo, a un microorganismo modificado, y a un método de escrutinio para un microorganismo que tiene resistencia a los ácidos.

10 **Antecedentes de la invención**

En los últimos años, entre los microorganismos, han atraído la atención los microorganismos útiles que alcanzan el tracto intestinal en un estado viable y muestran efectos eficaces sobre la salud del anfitrión. Estos microorganismos útiles incluyen ciertas bacterias del género *Lactobacillus* o el género *Bifidobacterium*. Hasta ahora, se ha informado de una serie de efectos sobre la salud de bacterias del género *Lactobacillus* que incluyen, además de la regulación de las funciones intestinales, tales como la mejora del estreñimiento o la diarrea, una acción para reducir el riesgo de desarrollo de cáncer de mama (Bibliografía relacionada con patentes 1) y una capacidad para inducir la producción de interleucina-12 (Bibliografía relacionada con patentes 2), y una serie de efectos sobre la salud de bacterias del género *Bifidobacterium* que incluyen una acción inhibidora de la absorción de colesterol (Bibliografía relacionada con patentes 3) y una acción inhibidora de la actividad de la elastasa (Bibliografía relacionada con patentes 4).

Estos microorganismos útiles son necesarios para alcanzar el interior del tracto digestivo en un estado viable con el fin de actuar eficazmente en el tracto digestivo y ejercer efectos sobre la salud. Sin embargo, existe una variedad de entornos inhibidores del crecimiento o inhibidores del crecimiento tales como la temperatura, el pH, el oxígeno, la presión osmótica y un ácido hasta que los microorganismos útiles alcanzan el interior del tracto digestivo. Por lo tanto, es importante si estos microorganismos son o no resistentes a los entornos inhibidores del crecimiento o los inhibidores del crecimiento al utilizar estos microorganismos. En particular, un ácido es un factor importante para determinar si estas bacterias pueden o no alcanzar el tracto digestivo. Por lo tanto, se puede decir que la resistencia a los ácidos es una de las propiedades ventajosas para los microorganismos útiles.

Entre los microorganismos útiles, en particular, las bacterias del género *Bifidobacterium* son anaerobios obligados y vulnerables al oxígeno, el bajo pH y la acidez elevada y tienen varias dificultades de manejo, tales como la proliferación en el momento de la fabricación o la capacidad de supervivencia en el momento del almacenamiento en un alimento o bebida fermentados. Para obtener los efectos sobre la salud de las bacterias del género *Bifidobacterium*, se considera que es necesario que lleguen al intestino en un estado viable tantas bacterias como sea posible, y en particular, es un factor importante aumentar la capacidad de supervivencia de las bacterias en un alimento o bebida, es decir, la tasa de llegada de los mismos al intestino después de comer o beber. Por lo tanto, se puede decir que las bacterias del género *Bifidobacterium* que tienen una mayor resistencia a los ácidos y una mayor velocidad de llegada al intestino son muy necesarias.

Como microorganismos útiles que tienen resistencia a los ácidos, se conocen *Lactobacillus casei* YIT9029 del género *Lactobacillus* (Bibliografía relacionada con patentes 5), *Bifidobacterium breve* YIT12272 del género *Bifidobacterium* (Bibliografía relacionada con patentes 6) y similares. Estos microorganismos útiles que tienen resistencia a los ácidos están disponibles como una serie de productos comerciales en forma de diversos tipos de productos lácteos fermentados o preparaciones farmacéuticas viables. En particular, un alimento o bebida de leche fermentada tiene una excelente palatabilidad y, por lo tanto, es fácil de tomar o beber continuamente y es adecuado para la administración de estos microorganismos útiles.

Por otro lado, también es necesario debilitar la resistencia a los ácidos de los microorganismos en algunos casos, y por lo tanto, es significativamente importante regular la resistencia a los ácidos de un microorganismo de la manera deseada.

En cuanto al mecanismo de regulación de la resistencia a los ácidos de los microorganismos, se menciona el bombeo de protones al exterior de la célula bacteriana por medio de una bomba de protones dependiente de ATP. Sin embargo, se presume que el mecanismo dependiente de ATP no funciona, ya que el ATP intracelular de los microorganismos se agota cuando los microorganismos se almacenan a una temperatura baja, y por lo tanto es deseable regular la resistencia a los ácidos de los microorganismos utilizando un mecanismo de regulación de la resistencia a los ácidos que funcione incluso en un estado de baja temperatura.

El gen *fadD* es un gen que se ha confirmado que está presente en algunos microorganismos y se supone que codifica una CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga, una enzima para convertir un ácido graso en acil-CoA.

Sin embargo, la relación entre el gen *fadD* y la resistencia a los ácidos no se conocía hasta ahora.

Lista de referencias

Bibliografía relacionada con patentes

- 5 Bibliografía relacionada con patentes 1: WO-A-2011/049154
- Bibliografía relacionada con patentes 2: JP-A-2009-155221
- Bibliografía relacionada con patentes 3: WO-A-2007/029773
- Bibliografía relacionada con patentes 4: WO 2011/083738
- Bibliografía relacionada con patentes 5: JP-A-2003-219861
- 10 Bibliografía relacionada con patentes 6: WO 2011/105335

Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

- 15 La presente invención consiste en proporcionar un método para regular la resistencia a los ácidos de un microorganismo controlando la expresión del gen fadD y un método de escrutinio para un microorganismo que tiene resistencia a los ácidos utilizando el nivel de expresión del gen fadD como índice.

Medios para resolver los problemas

- 20 Los autores de la presente invención han analizado exhaustivamente los genes de una cepa concreta de Bifidobacterium breve que tiene resistencia a los ácidos y sus linajes entre las bacterias del género Bifidobacterium que son anaerobios obligados y generalmente no tienen resistencia a los ácidos, y han encontrado que el nivel de transcripción del gen fadD está significativamente suprimido en una cepa que muestra resistencia a los ácidos, que
- 25 la resistencia a los ácidos de los microorganismos se puede regular mediante el control de la expresión del gen fadD, y que los microorganismos que tienen resistencia a los ácidos se pueden seleccionar a través del escrutinio utilizando el nivel de expresión del gen fadD o similares como índice.

- 30 Específicamente, la presente invención se refiere al objeto de estudio objeto de las reivindicaciones 1 a 10, en particular a los siguientes apartados 1) a 10).

- 35 1) Un método para regular la resistencia a los ácidos de un microorganismo, que comprende controlar la expresión del gen fadD presente en el microorganismo.
- 2) El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con el apartado 1), en donde la resistencia a los ácidos es la resistencia a los ácidos que mantiene una función en un estado de baja temperatura.
- 3) El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con los apartados 1) o 2), en donde la resistencia a los ácidos se mejora inhibiendo o suprimiendo la expresión del gen fadD.
- 4) El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con el apartado 3), en donde un nivel de transcripción relativo es de 1% o menos.
- 40 5) El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con los apartados 3) o 4), en donde un nivel de transcripción relativo es de 0,1% o menos.
- 6) El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con los apartados 1) a 5), en donde el microorganismo es una bacteria del género Bifidobacterium.
- 45 7) El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con los apartados 1) a 6), en donde el microorganismo es Bifidobacterium breve.
- 8) Un microorganismo modificado, en donde la resistencia a los ácidos está regulada por el método de acuerdo con el apartado 7), en donde se modifica la secuencia de un promotor que controla la transcripción del gen fadD, y en donde, en el promotor que controla la transcripción del gen fadD, una secuencia de bases 68 pb aguas arriba de una base del codón de inicio se muta de timina (T) a citosina (C).
- 50 9) Un alimento o bebida, o un producto farmacéutico, que comprende el microorganismo modificado de acuerdo con el apartado 8).
- 10) Un método de escrutinio para seleccionar un microorganismo que tiene resistencia a los ácidos, comprendiendo el método medir la presencia o ausencia y/o el nivel de expresión del gen fadD y/o un
- 55 producto de expresión del mismo.

Efectos de la invención

- 60 De acuerdo con la presente invención, es posible producir fácilmente un microorganismo modificado que tenga una mayor resistencia a los ácidos sin adquirir una cepa mutante que tenga resistencia a los ácidos mediante la mejora de la especie. La resistencia a los ácidos obtenida en la presente memoria se adquiere mediante la regulación de la expresión del gen fadD y es diferente de la resistencia a los ácidos que depende de ATP después del cultivo de los microorganismos y, por lo tanto, la función se ejerce incluso en un estado de baja temperatura. Además, el microorganismo modificado presenta una mayor capacidad de supervivencia in vivo y, por lo tanto, puede ejercer de

manera más confiable los efectos sobre la salud que tienen los microorganismos. Además, el microorganismo modificado presenta una mayor capacidad de supervivencia en el almacenamiento a baja temperatura, y por lo tanto es posible prolongar el período de almacenamiento del producto. Además, es posible cultivar el microorganismo en un estado que tenga una mayor acidez en el momento de fabricar el producto y, por lo tanto, es posible aumentar el número de microorganismos en el cultivo inicial y recuperar del cultivo una gran cantidad de microorganismos de una sola vez.

Además, de acuerdo con la presente invención, es posible producir fácilmente un microorganismo modificado que muestra un debilitamiento de la resistencia a los ácidos. Un gran número de tales microorganismos modificados son eliminados por el ácido gástrico y, por lo tanto, se pueden utilizar como un microorganismo que no ejerce los efectos sobre la salud que tienen los microorganismos en el estómago.

Además, de acuerdo con el método de escrutinio de la presente invención, es posible seleccionar simplemente un microorganismo que tenga resistencia a los ácidos a través del escrutinio.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama para comparar las secuencias de bases en la región de un promotor que controla la transcripción del gen *fadD* en *Bifidobacterium*. El número de la base 1 pb aguas arriba de la base del codón de inicio se indica como -1. La porción rodeada por un cuadrado es el sitio en el que está presente la mutación.

La Fig. 2 es un gráfico que ilustra los niveles de transcripción relativos del gen *fadD* (con respecto a la cepa YIT 4008).

La Fig. 3 es un diagrama para producir un ADN plasmídico para la expresión del gen *fadD*.

La Fig. 4 es un gráfico que ilustra los niveles de transcripción relativos del gen *fadD* (con respecto a la cepa YIT 4008) de transformantes.

La Fig. 5 son gráficos que ilustran la tasa de supervivencia después del tratamiento continuo con ácido-biliar.

Modos de llevar a cabo la invención

La secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) del gen *fadD* en la presente invención y una pluralidad de secuencias de nucleótidos que tienen una alta homología con esta se registran en la base de datos del NCBI, y se supone que el gen *fadD* codifica una CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga, que es una enzima que convierte un ácido graso en acil-CoA.

En la presente invención, controlar la expresión del gen *fadD* incluye inhibir o suprimir la expresión del gen *fadD* o potenciar o introducir de nuevo la expresión del gen *fadD*. Es posible potenciar la resistencia a los ácidos mediante la inhibición o la supresión de la expresión del gen *fadD*, y es posible debilitar la resistencia a los ácidos aumentando o introduciendo nuevamente la expresión del gen *fadD*.

En la presente invención, el microorganismo diana en el que se controla la expresión del gen *fadD* no está particularmente limitado. Sin embargo, los ejemplos de los mismos pueden incluir adecuadamente bacterias gram positivas, bacterias gram negativas y levaduras útiles cuya resistencia a los ácidos se desea potenciar. Entre ellos, son preferibles las bacterias gram positivas, y en particular, son preferibles las bacterias del género *Lactobacillus* y las bacterias del género *Bifidobacterium* cuya seguridad para el organismo vivo ha sido confirmada.

En cuanto a las bacterias del género *Lactobacillus*, es preferible utilizar bacterias pertenecientes al grupo de *Lactobacillus casei*, tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* y *Lactobacillus rhamnosus*, y es posible utilizar *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* en particular.

Además, los ejemplos de las bacterias del género *Bifidobacterium* pueden incluir *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, y *Bifidobacterium angulatum*, y es posible utilizar adecuadamente *Bifidobacterium breve* en particular.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* que muestran efectos fisiológicos útiles para el ser humano son adecuadas como diana de aplicación de la presente invención, ya que son anaerobios obligados y vulnerables al oxígeno, el pH bajo y la alta acidez y tienen varias dificultades en el manejo, tales como la proliferación en el momento de la fabricación o la capacidad de supervivencia en el momento del almacenamiento.

En la presente invención, la inhibición o supresión del gen *fadD* incluyen típicamente (i) inhibir o suprimir la transcripción del gen *fadD* al ARNm de *fadD* y (ii) inhibir o suprimir la traducción del ARNm de *fadD* en la proteína *fadD*. Sin embargo, no se limita a esto.

Para la inhibición de la expresión del gen *fadD*, el gen se puede desorganizar o eliminar a través del método de inactivación por inserción en el que un fragmento de ADN completamente diferente de un gen diana se inserta en el gen, o el método de doble entrecruzamiento por etapas en el que la totalidad o una porción de un gen diana se elimina mediante recombinación homóloga por etapas. Particularmente, el método de doble entrecruzamiento por etapas se emplea de manera preferible.

Específicamente, cuando se elimina la totalidad o una porción del gen *fadD*, dos regiones que forman un sándwich con la región de delección se separan del ADN cromosómico o se separan después de la amplificación por PCR, y los dos fragmentos de ADN se clonan en un vector plasmídico (p. ej., pYSSE3) que puede replicar en *Escherichia coli* pero no en un microorganismo de interés, de modo que los fragmentos estén alineados en la misma dirección que la dirección original. Posteriormente, el ADN plasmídico recombinante resultante se introduce, mediante electroporación o una técnica similar, en un microorganismo en el que se hace que se produzca la delección. A través de la PCR o una técnica similar, se selecciona, a partir de los clones resistentes a los antibióticos resultantes, un clon en el que el plásmido ha sido insertado en el cromosoma mediante recombinación en una región homóloga a la región clonada anterior aguas arriba o aguas abajo de la región de delección diana. El clon obtenido de este modo se subcultiva repetidamente en un medio que no contiene antibióticos, para seleccionar de ese modo los clones que han perdido resistencia a los antibióticos mediante la eliminación del plásmido del cromosoma por recombinación entre regiones homólogas flanqueantes y por la desaparición del plásmido en el crecimiento bacteriano. A través de la PCR o una técnica similar, se puede seleccionar, entre los clones así obtenidos, un clon en el que se haya eliminado la región del gen *fadD*.

La supresión de la expresión del gen *fadD* se puede llevar a cabo a través del llamado método de interferencia de ARN, en el que se sintetiza un fragmento corto de ARN complementario de la región del extremo 5' del ARNm del gen, o un método en el que un gen regulador o una región para controlar la expresión del gen se interrumpen o se eliminan. Particularmente, se prefiere la modificación de una región para controlar la expresión del gen. Específicamente, el nivel de transcripción del gen *fadD* en ARNm se puede aumentar o reducir modificando la secuencia de un promotor para controlar la transcripción del gen *fadD*. Como se emplea en la presente memoria, reducir el nivel de transcripción del gen *fadD* en ARNm se refiere a que el nivel de transcripción relativo se reduce 1% o menos y preferiblemente 0,1% o menos. El nivel relativo de transcripción se refiere a aquél que se obtiene al dividir el nivel de expresión del gen *fadD* en un microorganismo que tiene un gen *fadD* de tipo modificado por el nivel de expresión (por ejemplo, nivel de expresión de ARNm) del gen *fadD* en un microorganismo que tiene un gen *fadD* de tipo salvaje entre los microorganismos de la misma especie. Como se emplea en la presente memoria, el microorganismo que tiene un gen *fadD* de tipo salvaje se refiere a un microorganismo en el que la secuencia de bases del gen *fadD* o su promotor no está mutada y la expresión del gen *fadD* no está potenciada o introducida o inhibida o suprimida, y un microorganismo que tiene un gen *fadD* de tipo modificado se refiere a un microorganismo en el que la expresión del gen *fadD* se potencia, introduce o inhibe o suprime mediante la modificación o similar de la secuencia de bases del gen *fadD* o su promotor.

Además, como se usa emplea en la presente memoria, modificar la secuencia del promotor se refiere a un caso en el que una porción de las bases (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 20 bases, preferiblemente de 1 a 10 bases, y más preferiblemente de 1 a 5 bases) que constituyen el fragmento de ADN en la región promotora se ha sustituido o eliminado o un caso en el que se añaden o insertan de 1 a varias bases (por ejemplo, de 1 a 10 bases y preferiblemente de 1 a 5 bases). Por ejemplo, en el promotor del gen *fadD*, se refiere a que la secuencia de bases de 68 pb aguas arriba de una base del codón de inicio está sustituida de timina (T) a citosina (C).

Mientras tanto, la potenciación de la expresión del gen *fadD* se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un método en el que un plásmido recombinante que porta el gen se introduce en un microorganismo de interés; un método en el que el gen se integra en otro sitio del cromosoma a través de recombinación específica del sitio, para aumentar así el número de copias del gen en un microorganismo; o un método en el que el nivel de expresión del gen se incrementa modificando una región promotora del gen e incrementando el nivel de transcripción del gen a ARNm. Es particularmente preferido un método para incrementar el número de copias del gen.

La introducción del gen *fadD* en otro microorganismo se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el método de competición que utiliza la capacidad de absorción de ADN, el método de PEG con protoplastos que utiliza un protoplasto, o la electroporación mediante pulsos de alto voltaje. Además, la integración del gen *fadD* en el cromosoma de un microorganismo se puede llevar a cabo mediante recombinación homóloga o integración específica del sitio.

Adicionalmente, como un método específico para aumentar el número de copias del gen *fadD*, se puede mencionar un método en el cual el gen *fadD* (que incluye la secuencia promotora original y el sitio de unión al ribosoma del gen) o el polinucleótido (preparado ligando solamente una región codificante de polipéptido del gen aguas abajo de un promotor y un sitio de unión al ribosoma que se ha separado de otro gen o se ha sintetizado químicamente) se clona en un plásmido que tiene una pluralidad de copias por célula microbiana, y se introduce el plásmido en células microbianas a través de electroporación o una técnica similar. Mediante el uso del método, se puede incrementar el

número de copias del gen en las células microbianas.

En la presente invención, se puede emplear un microorganismo modificado que ha sido regulado para mostrar una mayor resistencia a los ácidos mediante el control de la expresión del gen *fadD* para producir un alimento, bebida o producto farmacéutico que muestran eficazmente varios efectos fisiológicos que son intrínsecos al microorganismo, ya que la resistencia a los ácidos del mismo se ha potenciado. Además, se puede emplear un microorganismo modificado que ha sido regulado para mostrar una débil resistencia a los ácidos, por ejemplo, un microorganismo que muestra varios efectos fisiológicos que son intrínsecos al microorganismo antes de que llegue al estómago y que no actúa en el estómago.

Como se emplea en la presente memoria, resistencia a los ácidos significa resistencia a todos los ácidos que tiene un microorganismo de interés, en particular, ácidos gástricos o ácidos biliares, y más específicamente, se refiere a la resistencia a los ácidos que funciona incluso en un estado de baja temperatura. Es decir, la resistencia a los ácidos es claramente diferente de la resistencia a los ácidos dependiente de ATP que se supone que no funciona en un estado de baja temperatura.

Como se emplea en la presente memoria, el estado de baja temperatura significa estar en un estado de 0 a 10°C. Específicamente, se menciona el almacenamiento en un estado de baja temperatura (almacenamiento a baja temperatura), y sus ejemplos incluyen el almacenamiento a 10°C o menos durante 7 días o más, el almacenamiento a 5°C o menos durante 14 días o más, y el almacenamiento a 4°C o menos durante 14 días o más.

La potenciación de la resistencia a los ácidos significa que la resistencia a los ácidos del microorganismo modificado se potencia en comparación con el microorganismo antes de modificarse, ya que la expresión del gen *fadD* se inhibe o se suprime modificando el gen *fadD* o su promotor del microorganismo. Más específicamente, se menciona la propiedad que consiste en que la tasa de supervivencia (la proporción del número de bacterias vivas después de un tratamiento con ácido gástrico con respecto al número de bacterias vivas antes del tratamiento con ácido gástrico) del microorganismo modificado es 5 o más veces y preferiblemente 10 o más veces mayor en comparación con la tasa de supervivencia del microorganismo antes de ser modificado cuando el microorganismo modificado que ha sido cultivado a 1×10^8 células/mL o más se almacena a baja temperatura en condiciones de 4°C durante 7 días y a continuación se trata con ácido gástrico a 37°C durante 60 minutos. Alternativamente, se menciona la propiedad que consiste en que la tasa de supervivencia es 30 o más veces y preferiblemente 50 o más veces mayor cuando se almacena en condiciones de 4°C durante 14 días o que la tasa de supervivencia es 100 o más veces y preferiblemente 150 o más veces más alta cuando se almacena en condiciones de 4°C durante 19 días. Además, se menciona la propiedad que consiste en que la tasa de supervivencia (la proporción del número de bacterias vivas después de un tratamiento continuo de ácido gástrico-ácido biliar con respecto al número de bacterias vivas antes del tratamiento continuo de ácido gástrico-ácido biliar) del microorganismo modificado es 10 o más veces y preferiblemente 30 o más veces más alta en comparación con la tasa de supervivencia del microorganismo antes de ser modificado cuando el microorganismo modificado que ha sido cultivado a 1×10^8 células/mL o más se almacena a una temperatura baja en condiciones de 4°C durante 7 días, a continuación se trata con ácido gástrico a 37°C durante 60 minutos y se trata adicionalmente con ácido biliar a 37°C durante 60 minutos, o se menciona la propiedad que consiste en que la tasa de supervivencia es 100 o más veces y preferiblemente 200 o más veces más alta cuando se almacena en condiciones de 4°C durante 14 días. Como se emplea en la presente memoria, como ácido gástrico y ácido biliar, por ejemplo, se pueden emplear jugo gástrico artificial (pH: 3,3) y bilis artificial (bilis bovina al 1,0% (Oxgall)) descritos en el documento WO 2011/105335.

Cuando el microorganismo modificado de la presente invención se incorpora a un alimento o bebida o en un producto farmacéutico, se pueden emplear células vivas, células calentadas (células muertas) o células liofilizadas del microorganismo. Alternativamente, se puede emplear un producto cultivado que contiene el microorganismo, o se pueden emplear células procesadas del microorganismo. Preferiblemente, se emplean células vivas del microorganismo.

Cuando el microorganismo modificado de la presente invención se emplea en un producto farmacéutico, el microorganismo se puede mezclar con un portador no tóxico farmacéutico sólido o líquido, y la mezcla se puede administrar en forma de un producto farmacéutico convencional. Los ejemplos de tal producto farmacéutico incluyen productos sólidos tales como comprimidos, gránulos, polvo y cápsulas; productos líquidos tales como soluciones, suspensiones y emulsiones; y productos liofilizados. Tal producto farmacéutico se puede preparar mediante una técnica habitual para la producción farmacéutica. Los ejemplos del portador no tóxico farmacéutico mencionado anteriormente incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, dextrina, glicérido de ácido graso, polietilenglicol, hidroxietilalmidón, etilenglicol, éster de ácido graso de polioxietileno sorbitán, aminoácidos, gelatina, albúmina, agua y solución salina. Si fuera necesario, el producto farmacéutico puede contener adecuadamente un aditivo convencional tal como un estabilizador, un humectante, un emulsionante, un aglutinante, un agente osmótico o un excipiente.

El microorganismo modificado de la presente invención también se puede incorporar a un alimento o bebida además

del producto farmacéutico mencionado anteriormente. Cuando el microorganismo se incorpora a un alimento o bebida, el microorganismo se puede emplear tal cual o mezclar con diversos ingredientes nutricionales. El alimento o bebida resultante se puede emplear para producir un alimento saludable o material alimentario que exhibe eficazmente diversos efectos fisiológicos que son intrínsecos al microorganismo, ya que la resistencia a los ácidos se ha regulado de una manera deseada. Específicamente, cuando el microorganismo modificado obtenido a través del método de la presente invención se incorpora a un alimento o bebida, el microorganismo se puede mezclar apropiadamente con un aditivo que se puede emplear en un alimento o bebida, y la mezcla se puede preparar, por medios convencionales, en una forma adecuada para uso comestible; por ejemplo, gránulos, partículas, comprimidos, cápsulas o pasta. El microorganismo se puede añadir a una variedad de alimentos; por ejemplo, productos cárnicos procesados (p. ej., jamón y salchichas), productos pesqueros procesados (p. ej., kamaboko y chikuwa), pan, confitería, mantequilla y leche en polvo. Alternativamente, el microorganismo se puede añadir a bebidas tales como agua, zumo de frutas, leche, bebidas refrescantes y bebidas de té. Como se emplea en la presente memoria, el alimento o bebida abarca alimentos para animales.

Los ejemplos de los alimentos o bebidas de la presente invención incluyen alimentos y bebidas fermentados producidos por el uso del microorganismo de la presente invención, tales como leche fermentada, bebidas con bacterias de ácido láctico, leche de soja fermentada, zumo de fruta fermentada y extracto de plantas fermentadas. Tal comida o bebida fermentada se puede producir a través de un método habitual. Por ejemplo, un producto lácteo fermentado se puede producir a través del siguiente procedimiento. En primer lugar, solo el microorganismo modificado de la presente invención se inocula en un medio de leche esterilizado, o el microorganismo modificado y otro microorganismo se inoculan simultáneamente al medio, seguido de cultivo, y el producto cultivado se homogeneiza para producir así una base de leche fermentada. Posteriormente, se añade un jarabe preparado por separado y se mezcla con la base de leche fermentada, y la mezcla se homogeneiza por medio de, por ejemplo, un homogeneizador, seguido de la adición de un sabor a la mezcla resultante, para así producir un producto final. El producto lácteo fermentado producido de este modo puede estar en cualquier forma, tal como un producto de tipo plano que no contiene jarabe (edulcorante), un producto de tipo blando, un producto de tipo de sabor a fruta, un producto sólido o un producto líquido.

El microorganismo producido a través del método de la presente invención y regulado para exhibir una mayor resistencia a los ácidos exhibe una alta resistencia a los ácidos incluso en un estado de baja temperatura, y por lo tanto exhibe una alta capacidad de supervivencia en un producto que contiene ácido. Por lo tanto, la reducción del número de células vivas o el aumento en la tasa de muerte celular se suprimen durante el almacenamiento a baja temperatura del producto. Además, la especificación del producto se mantiene fácilmente, y el producto exhibe eficazmente efectos fisiológicos generales (p. ej., regulación de las funciones intestinales) de un microorganismo (p. ej., una bacteria del género *Lactobacillus*). Cuando la resistencia a los ácidos de una cepa bacteriana del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* que originalmente tiene un efecto fisiológico específico (p. ej., el efecto anticanceroso o el efecto de erradicación de *Helicobacter pylori*) se potencia a través del método de la presente invención, la cepa bacteriana se puede aplicar a varios alimentos y bebidas, y el efecto fisiológico de la cepa bacteriana se puede potenciar en virtud de la mejora de la capacidad de supervivencia de la cepa bacteriana.

Además, el microorganismo producido a través del método de la presente invención y regulado para exhibir una resistencia a los ácidos debilitada es destruido principalmente por el ácido gástrico. Por lo tanto, el microorganismo puede ser utilizado como un microorganismo que exhibe varios efectos fisiológicos que son intrínsecos al microorganismo antes de llegar al estómago y no actúa en el estómago.

Como se describió anteriormente, la resistencia a los ácidos de los microorganismos aumenta cuando se inhibe o suprime la expresión del gen *fadD*. Por lo tanto, se puede seleccionar un microorganismo que exhibe resistencia a los ácidos a través del escrutinio utilizando el nivel de expresión del gen *fadD* y/o un producto de expresión del mismo como índice. Es decir, el microorganismo que exhibe resistencia a los ácidos se puede seleccionar a través de escrutinio midiendo la presencia o ausencia y/o el nivel de expresión del gen *fadD* y/o un producto de expresión del mismo. Los ejemplos de un producto de expresión de un gen pueden incluir ARNm y un polipéptido, y los ejemplos del polipéptido pueden incluir un polipéptido de una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 9.

Para la medición del nivel de expresión del gen *fadD* y/o un producto de expresión del mismo, la presencia o ausencia del gen *fadD* en un microorganismo, el número de copias del gen o el nivel de expresión del mismo se determina mediante hibridación de Southern, hibridación Northern, micromatrices de ADN o RT-PCR mediante el uso de una sonda o cebador que pueda detectar el gen *fadD* o el ARNm derivados de allí. Alternativamente, la cantidad de un polipéptido se determina mediante el método de absorción ultravioleta, espectrofotometría tal como el método BCA (método del ácido bicinonínico) o el método de Lowry, o la electroforesis. Un microorganismo de interés (microorganismo que tiene resistencia a los ácidos) se selecciona basándose en la presencia o ausencia del gen *fadD* o un producto de expresión del mismo o el nivel de expresión del mismo.

Con el fin de realizar con eficacia la modificación mencionada anteriormente del gen o el escrutinio de

microorganismos, preferiblemente, se emplea un vector recombinante que contiene el polinucleótido de SEC ID NO: 1 o una porción del mismo, un cebador para PCR o RT-PCR que contiene una porción (fragmento) del polinucleótido de SEQ ID NO: 1, un cebador para PCR o RT-PCR que puede amplificar el polinucleótido de SEQ ID NO: 1 o una porción del mismo, o un fragmento de ácido nucleico para hibridación que contiene un polinucleótido que hibrida específicamente con el polinucleótido de SEQ ID NO: 1 o una porción del polinucleótido.

El fragmento de ácido nucleico (por ejemplo, cebador) que se puede emplear en la presente invención es generalmente, por ejemplo, un nucleótido sintetizado químicamente sobre la base de la información sobre la secuencia de nucleótidos del gen de la presente invención. Preferiblemente, dicho nucleótido tiene una secuencia parcial de nucleótidos correspondiente a la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO: 1, e incluye de 10 a 50 nucleótidos consecutivos (preferiblemente de 15 a 35 nucleótidos consecutivos).

La presente invención se describirá a continuación con más detalle por medio de los Ejemplos.

15 Ejemplos

Ejemplo 1 Confirmación del sitio de mutación en la región promotora del gen fadD

Las secuencias de bases en la vecindad del gen fadD de Bifidobacterium breve YIT 12272 (FERM BP-1132 0) que tienen resistencia a los ácidos y Bifidobacterium breve YIT 4008 (FERM BP-4538) y Bifidobacterium breve YIT 4065 (FERM BP-6223) que fueron sus linajes se determinaron mediante el método del terminador con colorante de acuerdo con el método convencional y se compararon entre sí. Como resultado, se ha considerado que existe la posibilidad de que la secuencia de bases de 68 pb aguas arriba de la base del codón de inicio en el promotor del gen fadD en YIT 12272 haya sido mutada de timina (T) a citosina (C), lo que da como resultado un cambio en el nivel de transcripción del gen fadD. El sitio de mutación en el promotor del gen fadD se ilustra en la Fig. 1.

Ejemplo 2 Análisis del nivel de transcripción del gen fadD

Bifidobacterium breve YIT 12272 con resistencia a los ácidos y Bifidobacterium breve YIT 4008 y Bifidobacterium breve YIT 4065, que eran sus linajes, se cultivaron anaerobiamente a 37°C utilizando medio MILS (Iwata y Morishita, Letter in Applied Microbiology, vol. 9, 165-168, 1989). Para el cultivo anaerobio, la fase gaseosa se reemplazó por gas nitrógeno, el cierre se realizó con un tapón de butilo, seguido de un cultivo estático.

El ARN total se extrajo de cada cepa en la fase de crecimiento logarítmico utilizando el RNeasy Mini Kit (fabricado por QIAGEN). A continuación, se preparó una solución de ADNc utilizando 1 µg de ARN y el Kit de Síntesis de ADNc de la 1ª hebra PrimeScript (fabricado por TAKARA BIO INC.). Se realizó una PCR en tiempo real (95°C durante 30 segundos, seguida de 40 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 34 segundos) utilizando la solución de ADNc preparada a partir de cada cepa como molde, la SYBR Premix Ex Taq. (fabricada por TAKARA BIO INC.) y los cebadores mostrados en la Tabla 1 con el ABI PRISM 7500 (fabricado por Applied Biosystems por Thermo Fisher Scientific Inc.), para medir así los niveles de transcripción del gen fadD y el gen de ARN 16S. Cabe señalar que la corrección entre muestras se realizó utilizando el nivel de transcripción del gen de ARN 16S como un patrón interno.

[Tabla 1]

Diana	Directo	Inverso
fadD	CACCTCCTATGACTGGGATCTGAC (SEC ID NO: 2)	TGACGATATTGCGGATTTGTTC (SEC ID NO: 3)
16rRNA	ATCGGGCTTTGCTTGGTG (SEC ID NO: 4)	GAGCATCCGGCATTACCAC (SEC ID NO: 5)

El nivel de transcripción del gen fadD en cada cepa se ilustra en la Fig. 2 como un valor relativo con respecto a YIT 4008 que tiene un gen fadD de tipo salvaje. El nivel de transcripción del gen fadD en YIT 4065 fue comparable al de YIT 4008. Sin embargo, el nivel de transcripción se redujo en gran medida en YIT 12272 en el que se produjo una mutación aguas arriba del gen fadD, y el nivel de transcripción relativo del mismo fue de 0,1% o menos en comparación con el de YIT 4008 y fue de 0,1% o menos incluso en comparación con el de YIT 4065.

Ejemplo 3 Producción de transformante con un gen fadD de tipo salvaje introducido y nivel de transcripción relativo del gen fadD en el transformante

Para examinar la influencia del gen fadD sobre la resistencia a los ácidos, se preparó una cepa HM0102 transformante obtenida introduciendo el promotor del gen fadD y el gen fadD derivado de YIT 4008 en YIT 12272.

Primero, se realizó la PCR (30 ciclos de 96°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 150 segundos) utilizando el ADN genómico de YIT 4008 como molde, el KOD-Plus- (TOYOBO CO., LTD.) Y los cebadores mostrados en la Tabla 2 con el iCycler (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.), para amplificar así un

fragmento de ADN (SEQ ID NO: 6) que contiene el gen fadD completo, 300 pb aguas arriba del mismo, y 100 pb aguas abajo del mismo.

[Tabla 2]

Nombre	Secuencia
fadD-u300-Eco-Fw	CGGAATTCAGGCGGAACAATCGGGGCAAA (SEC ID NO: 7)
fadD-d100-Eco-Rv	CGGAATTC AAGCAACTAGAACGCCTCGGCT (SEC ID NO: 8)

5 La porción subrayada indica la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción.

10 El fragmento de ADN amplificado y el vector pBEΔ4 descritos en JP-A-H10-262670 fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI de acuerdo con el método convencional descrito en la misma bibliografía. Los fragmentos digeridos resultantes se ligaron utilizando el kit de ligación de ADN Ver. 2.1 (fabricado por TAKARA BIO INC.), para producir así un ADN plasmídico para la expresión del gen fadD bajo el control del promotor original. El diagrama de preparación del ADN plasmídico se ilustra en la Fig. 3.

15 El ADN plasmídico se introdujo en *Bifidobacterium breve* YIT 12272 mediante el método de electroporación. La electroporación se realizó utilizando el GENE PULSER II (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) en las condiciones de 200, 25 µF y 18 kv/cm. Posteriormente, la solución de reacción de electroporación se extendió sobre el medio de agar MILS con un suplemento de 3 µg/mL de eritromicina y se cultivó anaerobiamente a 37°C durante 72 horas utilizando el AnaeroPack (fabricado por MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.). La colonia así producida se obtuvo como la cepa HM0102 transformante, el ADN plasmídico se extrajo por el método alcalino de acuerdo con el método convencional, y se confirmó que el ADN plasmídico introducido se retuvo.

20 Mientras tanto, como control de la cepa HM0102, la cepa HM0101 se produjo introduciendo el vector pBEΔ4 solo en YIT 12272 de una manera similar.

25 El nivel de expresión del gen fadD se midió para las tres cepas de YIT 12272, la cepa HM0101 y la cepa HM0102 por medio del método descrito en el Ejemplo 2. Se debe observar que el cultivo de la cepa HM0101 y la cepa HM0102 que fueron los transformantes se realizaron utilizando el medio Y-MILS obtenido ajustando la concentración de extracto de levadura del medio MILS a 1,5% y añadiendo eritromicina para obtener una concentración final de 3 µg/mL.

30 Como resultado de la medición del nivel de transcripción del gen fadD de cada cepa, se encontró que el nivel de transcripción del gen fadD es alto en la cepa HM0102 en la que se han introducido un promotor del gen fadD de tipo salvaje y el gen fadD en comparación con YIT 12272 y la cepa HM0101. El nivel de transcripción del gen fadD en cada cepa se ilustra en la Fig. 4 como un valor relativo con respecto al nivel de transcripción del gen fadD en YIT 4008.

35 Ejemplo 4 Medición de la resistencia a los ácidos del transformante.

40 La resistencia al ácido después del almacenamiento a baja temperatura se midió para confirmar más claramente la resistencia al ácido del transformante. Cada solución de cultivo de la cepa HM0101 (número de bacterias después del cultivo: $8,5 \times 10^8$ células/mL) y la cepa HM0102 (número de bacterias después del cultivo: $8,8 \times 10^8$ células/mL) que habían sido cultivadas anaerobiamente durante una noche a 1×10^6 células/mL o más se almacenaron anaerobiamente y estáticamente a 4°C en el medio descrito en el Ejemplo 3 anterior. Las soluciones de cultivo se sometieron al tratamiento continuo con ácido gástrico-ácido biliar los días 0, 7, 14, 19 y 29 después del inicio del almacenamiento, y se comparó la resistencia a los ácidos de ambas cepas entre sí.

45 El tratamiento continuo con ácido gástrico/ácido biliar se realizó de la siguiente manera utilizando jugo gástrico artificial y bilis artificial descritos en la Bibliografía Relacionada con Patentes 6. En primer lugar, se añadieron 0,5 mL de la solución de cultivo que se había almacenado a 4°C a 10 mL del jugo gástrico artificial (pH 3,3) que se había mantenido caliente a 37°C de antemano, y la mezcla se agitó para realizar el tratamiento con ácido gástrico a 37°C durante 60 minutos. A continuación, se añadieron 1 mL de bilis artificial (1,0% de Oxgall) y 5 mL de un tampón de reacción (solución de tampón que contenía 0,5% de cloruro de sodio, 0,1% de cloruro de potasio y 0,3% de hidrógeno de sodio y que tenía un pH de 8,0) a 2 mL de la solución después de haber sido sometida al tratamiento con ácido gástrico, y la mezcla se agitó para realizar continuamente el tratamiento con ácido biliar a 37°C durante 60 minutos. Un mililitro de cada una de las soluciones tratadas a los 0 minutos y 60 minutos después del tratamiento con ácido gástrico y 120 minutos después de que el ácido gástrico y el tratamiento continuo con ácido biliar se diluyeran adecuadamente, se aplicaron mediante frotis en el medio de agar con ácido propiónico TOS (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.), y se cultivó anaerobiamente con el AnaeroPack (fabricado por MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) a 37°C durante 72 horas. El número de colonias formadas se multiplicó por el factor de dilución total para determinar el número de bacterias vivas por 1 mL de la solución de

cultivo y la proporción del número de bacterias vivas después de cada tratamiento con respecto al número de bacterias vivas a los 0 minutos después del tratamiento con ácido se adoptó como la tasa de supervivencia.

5 Aquí, la cepa HM0102 tiene un gen *fadD* de tipo salvaje, la cepa HM0101 tiene un gen *fadD* de tipo mutante, y los genes distintos del gen *fadD* son exactamente iguales en ambas cepas, por lo que la cepa HM0102 corresponde a un microorganismo antes de ser sometido a la modificación del gen *fadD* y la cepa HM0101 corresponden a un microorganismo modificado con el gen *fadD*.

10 Los resultados de la medición del número de bacterias vivas y la tasa de supervivencia de ambas cepas después del tratamiento con ácido gástrico y después del tratamiento continuo con ácido gástrico y ácido biliar se ilustran en la Fig. 5, y la razón de la tasa de supervivencia de la cepa HM0101 con respecto a la de la cepa HM0102 se muestra en la Tabla 3. Como resultado, la tasa de supervivencia después del tratamiento con ácido gástrico y el tratamiento continuo con ácido gástrico y ácido biliar se redujo significativamente en la cepa HM0102 en la que se había introducido un promotor del gen *fadD* de tipo salvaje a medida que pasaban los días de almacenamiento a baja temperatura. Sin embargo, la amplitud de una reducción en la tasa de supervivencia era pequeña en la cepa HM0101 y la resistencia a los ácidos de la misma se había mejorado en comparación con la de la cepa HM0102. También se indicó mediante la razón de la tasa de supervivencia que la resistencia a los ácidos de la cepa HM0101 se había mejorado. La mejora de la resistencia a los ácidos se observó notablemente en el caso de estar en un estado de baja temperatura.

[Tabla 3]

Número de días de almacenamiento	Razón de la tasa de supervivencia después del tratamiento con ácido gástrico	Razón de la tasa de supervivencia después del tratamiento continuo con ácido gástrico y ácido biliar
Día 7	10,5	30,7
Día 14	76,8	232
Día 19	187	*
Día 29	*	*

Razón de la tasa de supervivencia = tasa de supervivencia de la cepa HM0101/tasa de supervivencia de la cepa HM0102.
 * No es posible calcular la razón ya que el número de bacterias de la cepa HM0102 está por debajo del límite de detección.

25 A partir de los resultados anteriores, se ha revelado que un aumento en la transcripción del gen *fadD* actúa reduciendo la resistencia a los ácidos de un microorganismo, en particular, *Bifidobacterium breve*, por el contrario, la inhibición o supresión de la transcripción del gen *fadD* actúa mejorando la resistencia a los ácidos de un microorganismo, en particular, *Bifidobacterium breve*. Por lo tanto, se considera que la reducción del nivel de transcripción del gen *fadD* se puede utilizar para mejorar la resistencia a los ácidos de un microorganismo sin depender del contenido de ATP intracelular después del cultivo.

30 LISTA DE SECUENCIAS

<110> KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA

<120> MÉTODO PARA REGULAR LA RESISTENCIA A LOS ÁCIDOS DE BACTERIAS

35 <130> YK0078

<150> JP 2013-251362
 <151> 2013-12-04

40 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1
 <211> 2034
 <212> ADN
 <213> *Bifidobacterium breve*

ES 2 729 099 T3

<400> 1

ttgtcggtta tcaattcctt tacgcagcac accatcaatc tgacccgcaa ggcactcagg	60
ttgggatccg acttoggttca cccggttcac gacgacactc cggacgagcc cgattatctg	120
tccaatgccg atgtgccgca ggaagccaac atcgaactgc cgcacagcga cgattgggat	180
gacggccatc tgaccgtcac cgacatcgac ccgaaaaccg gactgctcac cacgtccact	240
gccggcaatc cgcctctgga cgacggcacg tccatctacg acctgtatgc ggatcgcgcc	300
aagcgcatgg gtgacgaacc gctgtatacc tacaagtccg acaacgaatg ggtgaccgtc	360
accgccaatg agttcctcgc cgaagtgcgt gccgtggcca agggcctgct gcactacggc	420
atcaagaagg gcgacggcgt ggcgttcacg tgccgcacct cctatgactg ggatctgacc	480
gatgcggcca tcatggcctg cggcggcgtg ctggccacca tctacgacac cgactcggcc	540
gaacaaatcc gcaatatcgt caacaattct gacgcgcgtc tgctcatcgt gcaggattcc	600
gccatgcgag agaaggcgga aggcgccgtg gaggaatgcc cctcactcga gcgcatccta	660
tgcatcgaga ccggcgtctt tgatgagatc aaggcctatg gtgccggcat ctcggacgag	720
gaactggatg agcgcattga ttcggtaag aaaaccgatc tgtgctccat tgtgtacacc	780
tctggttoca ccgcccggcc gaagggcgtg gagatgacct acgagcacta ctgccagacc	840
gcgctgaacc tgcccggacta catgcccggag ctgctgcaca acaagaagaa caccatcctg	900
ctgttctcgc cgcaggccca ctcccttgcc cgcgccatca attacatcgt cgtggcctcg	960
aatatgcata tctacatcgc cgccggcatc aagacgctga ttagtgattt gcaggtggtc	1020
aagccgtcca tcatgattgt ggtgccgcgt gtgctggaga aggtgtacaa cgccgcctcc	1080
cagaaggccg gccatggccc caagggcgtg gtgttcgctt ccgccgtggt ggctgcccag	1140
aactacatga aggaaatctc cgccaacggc aaggccagtg cattgacctg tgcccgcgc	1200
gcggccttcg atccgattgt ctactcctca ctgcgtgagg tgctgggtgg acgcatgaag	1260
tggattgtgg ccggcggcgc gccgcttgac cctgaactgc ttgcgttctt ccgcccgcga	1320
agcgtgcccg tctacgaggg ctatggtctg accgaaacca ccgcacctg cgcgttcaac	1380
ccgctgggaa ccccgttcca cgccgggtcc gtgggcgtcg cgttccccgg cttctcgtg	1440
cgtattgccg aggacggcga gatccaggtc aagggtogcg ccgtgttccc gcgttatcac	1500
aagaacgatg aggccaccga gctgtcgttc accgaagatg gctggtatgc caccggagat	1560
ttgggccgta tcgacaacga tggcttctg tacattaccg gccgcaagaa ggatctcatc	1620
atcaccgcag gtggcaagaa tgtggcgcgg ggtccgattg aagaggccat tcagcgttgc	1680
gagttcgtgt cccaggcact ggtgctgggc gacaagcgtc cgttcatctc cgcgctgatt	1740
acgctggacg aggagtcttt gcgtccttgg ctggccgcca agggattgga cgagaacatg	1800
tctctggagg acgcctctca gaacgccgcc gtacgcgctg aggtccagaa gtggatcgat	1860
caggccaacg aaggcgtttc ccgcccga tccgtgcgta agttcatcat cctgcctgag	1920
gagttcacac aggagaacgg cctgatgacc gcctccatga aggtcatccg cccaaggtc	1980
5 atcaagcgct actccaccct cctcaacacc cagatgtaca ccaagaagaa gtaa	2034

<210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 10 <400> 2

 cacctcctat gactgggatc tgac 24

 <210> 3
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 3

 tgacgatatt gcggattgt tc 22
 25
 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 4
 35
 atcgggcttt gcttggtg 18

 <210> 5
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 5
 45
 gagcatccgg cattaccac 19

 <210> 6
 50 <211> 2434
 <212> ADN
 <213> Bifidobacterium breve

 <400> 6
 55

ES 2 729 099 T3

aggcggaaaca atcggggcaa aagacccgca ttttctgtct tcgcatccct gctgcgtcaa	60
ctcgattgga tgacatctag gcagtagtgc aacgatctcc aaccactatc ggcagtctgt	120
taccaacaaca tcagagcgcc agtgtccatc caccacatag aacctcccaa aacctacggt	180
tgcgtaggct tttcctacgg ttgcgtaagg tgacgagttc gatgtgaacg attacaatct	240
aaggtttgag agcgttcggc ttatgctcga acggcactga aaggtttaca ggagcaagag	300
ttgtcggtta tcaattcctt tacgcagcac accatcaatc tgacccgcaa ggcactcagg	360
ttgggatccg acttoggttca cccggttcac gacgacactc cggacgagcc cgattatctg	420
tccaatgccg atgtgccgca ggaagccaac atcgaactgc cgcacagcga cgattgggat	480
gacggccatc tgaccgtcac cgacatcgac ccggaacccg gactgctcac cacgtccact	540
gccggcaatc cgctctgga cgacggcacg tccatctacg acctgtatgc ggatcgcgcc	600
aagcgcatgg gtgacgaacc gctgtatacc tacaagtccg acaacgaatg ggtgaccgtc	660
accgccaatg agttoctcgc cgaagtgcgt gccgtggcca agggcctgct gcactacggc	720
atcaagaagg gcgacggcgt ggcgttcattg tgccgcacct cctatgactg ggatctgacc	780
gatgcggcca tcatggcctg cggcggcgtg ctggccacca tctacgacac cgactcggcc	840
gaacaaatcc gcaatatcgt caacaattct gacgcgcgtc tgctcatcgt gcaggattcc	900
gccatcgcgag agaaggcgga aggcgccgtg gaggaatgcc cctcactcga gcgcatccta	960
tgcatcgaga ccggcgctct tgatgagatc aaggcctatg gtgccggcat ctcggacgag	1020
gaactggatg agcgcattga ttcggtaag aaaaccgatc tgtgctccat tgtgtacacc	1080
tctggttcca ccgccgcgcc gaagggcgtg gagatgacct acgagcacta ctgccagacc	1140
gcgctgaacc tgccggacta catgcccgag ctgctgcaca acaagaagaa caccatcctg	1200
ctgttcctgc cgcaggccca ctcctttgcc cgcgccatca attacatcgt cgtggcctcg	1260
aatatgcata tctacatcgc cgccggcatc aagacgctga ttagtgattt gcaggtggct	1320
aagccgtcca tcatgattgt ggtgccgcgt gtgctggaga aggtgtacaa cgccgcctcc	1380

ES 2 729 099 T3

cagaaggccg gccatggccc caagggcgtg gtgttcgcct ccgccgtggt ggctgccag 1440
aactacatga aggaaatctc cgccaacggc aaggccagtg cattgacccg tgcccgcgc 1500
gcggccttcg atccgattgt ctactcctca ctgctgagg tgctgggtgg acgcatgaag 1560
tggattgtgg ccggcggcgc gccgcttgac cctgaactgc ttgcttctt ccgcggcgca 1620
agcgtgcccg tctacgagg ctatggtctg accgaaacca ccgcaccatg cgcgttcaac 1680
ccgctgggaa ccccgttcca cgccgggtcc gtggcgctg cgttccccg cttctcgtg 1740
cgtattgccg aggacggcga gatccaggtc aagggtcgcg ccgtgttccc gcgttatcac 1800
aagaacgatg aggccaccga gctgtcgttc accgaagatg gctggtatgc caccggagat 1860
ttgggcccga tgcacaacga tggcttcctg tacattaccg gccgcaagaa ggatctcatc 1920
atcaccgcag gtggcaagaa tgtggcgcg ggtccgattg aagaggccat tcagcgttgc 1980
gagttcgtgt cccaggcact ggtgctgggc gacaagcgtc cgttcatctc cgcgctgatt 2040
acgctggacg aggagtcttt gcgtccttgg ctggccgcca agggattgga cgagaacatg 2100
tctctggagg acgcctctca gaacgccgcc gtacgcgctg aggtccagaa gtggatcgat 2160
caggccaacg aaggcgtttc ccgcccga tccgtgcgta agttcatcat cctgcctgag 2220
gagttcacac aggagaacgg cctgatgacc gcctccatga aggtcatccg cccaaggtc 2280
atcaagcgtc actccaccct cctcaacacc cagatgtaca ccaagaagaa gtaagcagag 2340
ctcgagtaca gaaaaggga gattccaatg gaatctccct ttgttataac cggtcgaagg 2400
ccgattccta gaagccgagg cgttctagtt gctt 2434

<210> 7

<211> 29

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

10

<400> 7

cggaattcag gcggaacaat cggggcaaa 29

15 <210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 8

25 cggaattcaa gcaactagaa cgctcggct 30

<210> 9

<211> 677

<212> PRT

30 <213> Bifidobacterium breve

<400> 9

ES 2 729 099 T3

Leu Ser Val Ile Asn Ser Phe Thr Gln His Thr Ile Asn Leu Thr Arg
 1 5 10 15
 Lys Ala Leu Arg Leu Gly Ser Asp Phe Val His Pro Val His Asp Asp
 20 25 30
 Thr Pro Asp Glu Pro Asp Tyr Leu Ser Asn Ala Asp Val Pro Gln Glu
 35 40 45
 Ala Asn Ile Glu Leu Pro His Ser Asp Asp Trp Asp Asp Gly His Leu
 50 55 60
 Thr Val Thr Asp Ile Asp Pro Glu Thr Gly Leu Leu Thr Thr Ser Thr
 65 70 75 80
 Ala Gly Asn Pro Pro Leu Asp Asp Gly Thr Ser Ile Tyr Asp Leu Tyr
 85 90 95
 Ala Asp Arg Ala Lys Arg Met Gly Asp Glu Pro Leu Tyr Thr Tyr Lys
 100 105 110
 Ser Asp Asn Glu Trp Val Thr Val Thr Ala Asn Glu Phe Leu Ala Glu
 115 120 125
 Val Arg Ala Val Ala Lys Gly Leu Leu His Tyr Gly Ile Lys Lys Gly
 130 135 140
 Asp Gly Val Ala Phe Met Cys Arg Thr Ser Tyr Asp Trp Asp Leu Thr
 145 150 155 160
 Asp Ala Ala Ile Met Ala Cys Gly Gly Val Leu Ala Thr Ile Tyr Asp
 165 170 175
 Thr Asp Ser Ala Glu Gln Ile Arg Asn Ile Val Asn Asn Ser Asp Ala
 180 185 190
 Arg Leu Leu Ile Val Gln Asp Ser Ala Met Arg Glu Lys Ala Glu Gly
 195 200 205
 Ala Val Glu Glu Cys Pro Ser Leu Glu Arg Ile Leu Cys Ile Glu Thr
 210 215 220
 Gly Ala Leu Asp Glu Ile Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Ile Ser Asp Glu

ES 2 729 099 T3

Arg Ile Ala Glu Asp Gly Glu Ile Gln Val Lys Gly Arg Ala Val Phe
 485 490 495

Pro Arg Tyr His Lys Asn Asp Glu Ala Thr Glu Leu Ser Phe Thr Glu
 500 505 510

Asp Gly Trp Tyr Ala Thr Gly Asp Leu Gly Arg Ile Asp Asn Asp Gly
 515 520 525

Phe Leu Tyr Ile Thr Gly Arg Lys Lys Asp Leu Ile Ile Thr Ala Gly
 530 535 540

Gly Lys Asn Val Ala Pro Gly Pro Ile Glu Glu Ala Ile Gln Arg Cys
 545 550 555 560

Glu Phe Val Ser Gln Ala Leu Val Leu Gly Asp Lys Arg Pro Phe Ile
 565 570 575

Ser Ala Leu Ile Thr Leu Asp Glu Glu Ser Leu Arg Pro Trp Leu Ala
 580 585 590

Ala Lys Gly Leu Asp Glu Asn Met Ser Leu Glu Asp Ala Ser Gln Asn
 595 600 605

Ala Ala Val Arg Ala Glu Val Gln Lys Trp Ile Asp Gln Ala Asn Glu
 610 615 620

Gly Val Ser Arg Ala Glu Ser Val Arg Lys Phe Ile Ile Leu Pro Glu
 625 630 635 640

Glu Phe Thr Gln Glu Asn Gly Leu Met Thr Ala Ser Met Lys Val Ile
 645 650 655

Arg Pro Lys Val Ile Lys Arg Tyr Ser Thr Leu Leu Asn Thr Gln Met
 660 665 670

Tyr Thr Lys Lys Lys
 675

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para regular la resistencia a los ácidos de un microorganismo, que comprende controlar la expresión del gen fadD presente en el microorganismo.
2. El método para regular la resistencia a los ácidos según la reivindicación 1, en donde la resistencia a los ácidos es una resistencia a los ácidos que mantiene una función en un estado de baja temperatura.
- 10 3. El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la resistencia a los ácidos se potencia inhibiendo o suprimiendo la expresión del gen fadD.
4. El método para regular la resistencia al ácido según la reivindicación 3, en donde un nivel de transcripción relativo es de 1% o menos.
- 15 5. El método para regular la resistencia al ácido de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde un nivel de transcripción relativo es de 0,1% o menos.
- 20 6. El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el microorganismo es una bacteria del género Bifidobacterium.
7. El método para regular la resistencia a los ácidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el microorganismo es Bifidobacterium breve.
- 25 8. Un microorganismo modificado, en donde la resistencia a los ácidos se regula mediante el método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde una secuencia de un promotor que controla la transcripción del gen fadD se modifica, y en donde, en el promotor que controla la transcripción del gen fadD, una secuencia de bases de 68 pb aguas arriba de una base de codón de inicio se muta de timina (T) a citosina (C).
- 30 9. Un alimento, bebida o producto farmacéutico, que comprende el microorganismo modificado de acuerdo con la reivindicación 8.
- 35 10. Un método de selección para seleccionar un microorganismo que tiene resistencia a los ácidos, comprendiendo el método medir la presencia o ausencia y/o el nivel de expresión del gen fadD y/o un producto de expresión del mismo.

Fig. 1

YIT 4008	-300	AGGCGGAACA	ATCGGGGCAA	AAGACCCGCA	TTTTTCGTCT	TCGCATCCCT	GGTGCCTCAA
YIT 4065	-300	AGGCGGAACA	ATCGGGGCAA	AAGACCCGCA	TTTTTCGTCT	TCGCATCCCT	GCTGCCTCAA
YIT 12272	-300	AGGCGGAACA	ATCGGGGCAA	AAGACCCGCA	TTTTTCGTCT	TCGCATCCCT	GCTGCCTCAA
YIT 4008	-240	CTCGATTGGA	TGACATCTAG	GCAGTAGTCG	AACGATCTCC	AACCACTATC	GGCAGTCTGT
YIT 4065	-240	CTCGATTGGA	TGACATCTAG	GCAGTAGTCG	AACGATCTCC	AACCACTATC	GGCAGTCTGT
YIT 12272	-240	CTCGATTGGA	TGACATCTAG	GCAGTAGTCG	AACGATCTCC	AACCACTATC	GGCAGTCTGT
YIT 4008	-180	TACCCAACAA	TCAGAGCGCC	AGTGTCCATC	CACCACATAG	AACCTCCCAA	AACCTACGGT
YIT 4065	-180	TACCCAACAA	TCAGAGCGCC	AGTGTCCATC	CACCACATAG	AACCTCCCAA	AACCTACGGT
YIT 12272	-180	TACCCAACAA	TCAGAGCGCC	AGTGTCCATC	CACCACATAG	AACCTCCCAA	AACCTACGGT
YIT 4008	-120	TGCGTAGGCT	TTTCCTACGG	TTGCGTAAGG	TGACGAGTTC	GATGTGAACG	ATTACAATCT
YIT 4065	-120	TGCGTAGGCT	TTTCCTACGG	TTGCGTAAGG	TGACGAGTTC	GATGTGAACG	ATTACAATCT
YIT 12272	-120	TGCGTAGGCT	TTTCCTACGG	TTGCGTAAGG	TGACGAGTTC	GATGTGAACG	ATTACAATCT
YIT 4008	-60	AAGGTTTGA	AGCGTTCGGC	TTATGCTCGA	ACGGCACTGA	AAGGTTTACA	GGAGCAAGAG
YIT 4065	-60	AAGGTTTGA	AGCGTTCGGC	TTATGCTCGA	ACGGCACTGA	AAGGTTTACA	GGAGCAAGAG
YIT 12272	-60	AAGGTTTGA	AGCGTTCGGC	TTATGCTCGA	ACGGCACTGA	AAGGTTTACA	GGAGCAAGAG

Fig. 2

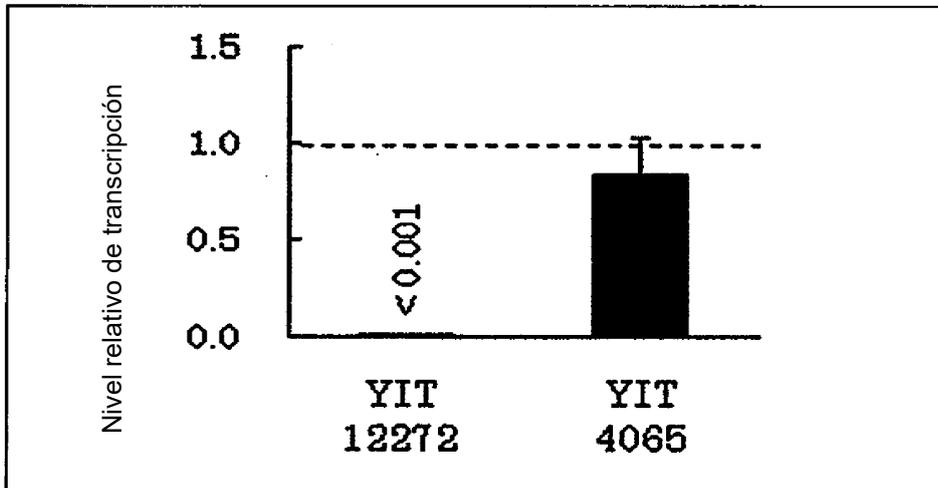


Fig. 3

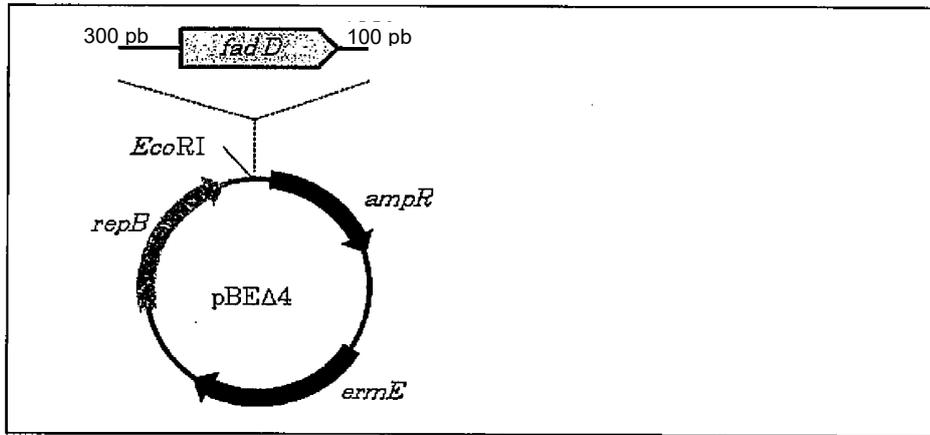


Fig. 4

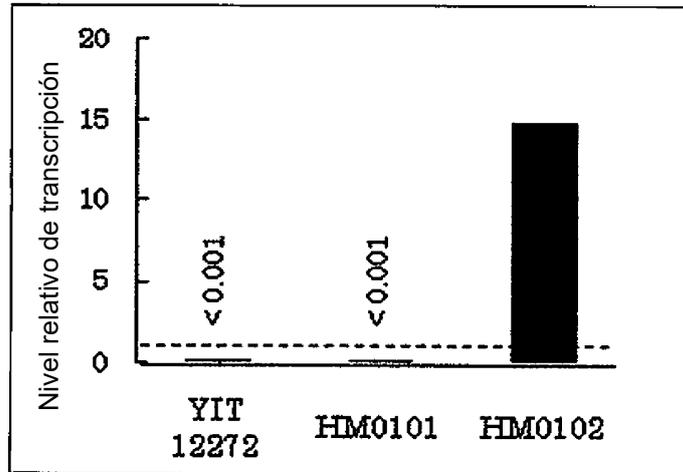


Fig. 5

