



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 028**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04743163 .0**

86 Fecha de presentación : **30.06.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1644482**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54

Título: **Nueva composición de galactooligosacárido y la preparación de la misma.**

30

Prioridad: **30.06.2003 GB 0315266**
29.10.2003 GB 0325224
16.03.2004 GB 0405837

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73

Titular/es: **Clasado Inc.**
Edificio Banco do Brazil
c/ Elvira Méndez, 10 - Apartado 5246
Panamá 5, PA

72

Inventor/es: **Wynne, Anthony, Graham;**
Gibson, Glenn;
Slupinski, Jacek, Witold y
Tzortzis, Georgios

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 284 028 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

Nueva composición de galactooligosacárido y la preparación de la misma.

5 La presente invención se refiere a nuevas cepas de *Bifidobacterium bifidum* que producen una nueva actividad de la enzima galactosidasa capaz de convertir la lactosa en una nueva mezcla de galactooligosacáridos. Los galactooligosacáridos son carbohidratos no digeribles, que son resistentes a las enzimas digestivas gastrointestinales de los mamíferos, pero que son fermentados por bacterias colónicas específicas. La invención también se refiere al uso de una cepa bifidobacteriana para producir una nueva composición de galactooligosacáridos que es capaz de estimular el crecimiento de bifidobacterias en el tracto intestinal. También se refiere a una nueva composición de productos de galactooligosacáridos.

15 La flora intestinal humana comprende géneros microbianos patógenos, benignos y beneficiosos. Un predominio de los primeros puede conducir a trastornos intestinales que pueden ser tanto agudos (por ejemplo, gastroenteritis) y crónicos (por ejemplo, la enfermedad inflamatoria del intestino, el síndrome del intestino irritable y algunos cánceres intestinales). Se han hecho tentativas para influir en el equilibrio de la flora intestinal a favor de microorganismos beneficiosos, tales como las bifidobacterias, añadiendo una o varias de tales cepas microbianas a un vehículo de alimenticio apropiado. Tal suplemento alimenticio microbiano vivo se llama probiótico. Sin embargo, es difícil garantizar la supervivencia de bacterias vivas en los productos de alimentación y también después de la digestión.

20 Un enfoque alternativo a la manipulación dietética de la microflora intestinal es el uso de un prebiótico, que se define como un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, causando así una mejora de la salud del huésped.

25 La enorme microflora intestinal humana es adquirida en el nacimiento. El lactante alimentado con leche materna tiene una preponderancia de bifidobacterias, que compiten fácilmente con otros géneros. Esto es porque los componentes de la leche materna son estimuladores. Al contrario, el lactante alimentado con leche artificial tiene una flora más compleja que imita al tracto gastrointestinal adulto porque bacteroides, clostridia, bifidobacterias, lactobacilli, cocci gram positivo, coliformes y otros grupos están representados todos en proporciones prácticamente iguales. Las bifidobacterias generalmente son consideradas como protectores con respecto a las grandes infecciones intestinales y esta diferencia probablemente explica la mucho menor incidencia de infecciones en lactantes alimentados con el pecho comparado con los que se alimentan con leche artificial.

35 Ciertos componentes de la flora intestinal han sido implicados en la etiología de la enfermedad intestinal. Por ejemplo, las micobacterias se asocian a la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa puede ser provocada por bacterias reductoras de sulfato y puede haber participación bacteriana en el desarrollo del cáncer de intestino. Claramente, sería ventajoso si se pudiera potenciar el crecimiento selectivo de bacterias intestinales beneficiosas propias por la ingestión de un prebiótico. Esto tendría el efecto consiguiente de que la microflora patógena sería deprimida.

40 Un grupo de compuestos que es clasificado como prebióticos es el de los galactooligosacáridos, que son oligosacáridos que contienen galactosa de la forma $\text{Glc } \alpha 1-4[\beta \text{ Gal } 1-6]_n$ donde $n=2-5$, y que son producidos a partir de jarabe de lactosa usando la actividad de transgalactosilasa de la enzima β -galactosidasa (Crittenden, (1999) *Probiotics: A Critical Review*. Tannock, G. (ed) Horizon Scientific Press, Wymondham, págs. 141-156). Tres productos están actualmente disponibles en el comercio que tienen composiciones ligeramente diferentes. El primero de estos, los oligosacáridos transgalactosilados (TOS), es producido usando la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Tanaka *et al.*, (1983) *Bifidobacteria Microflora*, **2**, 17-24), y consiste en tri-, tetra-, penta- y hexa-galacto-oligosacáridos. El segundo es Oligomate 55, que se prepara usando β -galactosidasa de *A. oryzae* y *Streptococcus thermophilus* (Ito *et al.*, (1990), *Microbial Ecology in Health and Disease*, **3**, 285-292) y contiene el 36% de tri-, tetra-, penta- y hexa-galacto-oligosacáridos, 16% de disacáridos galactosil-glucosa y galactosil-galactosa, 38% de monosacáridos y 10% de lactosa. Finalmente, una preparación del disacárido transgalactosilado (TD) es producida usando la β -galactosidasa de *S. thermophilus* (Ito *et al.*, (1993), *J. Nutritional Science and Vitaminology*, **39**, 279-288).

55 Se sabe que los miembros de las bifidobacterias producen las enzimas β -galactosidasa que están implicadas en el metabolismo bacteriano de lactosa. Moller, P. L. *et al.* en *Appl. & Environ. Microbiol.*, (2001), **62**, (5), 2276-2283 describen el aislamiento y la caracterización de tres genes de β -galactosidasa a partir de una cepa de *Bifidobacterium bifidum*.

60 La publicación de patente de EE.UU. N° US 2002/0086358 describe una nueva β -galactosidasa de *Bifidobacterium bifidum*, en particular una versión truncada de la enzima que tiene una alta actividad transgalactosilante. Aunque se ha demostrado que la incubación con lactosa podría ocurrir en presencia del 0,5-60% de lactosa, el máximo rendimiento ejemplificado del galactooligosacárido producido en reacciones de transgalactosilación fue del 44% (mg de oligosacárido producido por mg de lactosa añadida). Además, a partir de la definición de oligosacárido en esta publicación de la patente estadounidense es evidente que el producto consiste en al menos tres moléculas de azúcar unidas.

65 Dumortier *et al.* en *Carbohydrate Research*, **201**, (1990), 115-123 describen la formación de oligosacáridos por una reacción de transgalactosilación durante la hidrólisis de lactosa con *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456. Su análisis de la estructura de la mezcla de oligosacáridos producidos mostró que los enlaces eran enlaces β -(1→3), β -

ES 2 284 028 T3

(1→6) y β -(1→4)-D-galactosilo. Dumortier sugiere que los compuestos producidos por *Bifidobacterium bifidum* están implicados en la adhesión de bacterias en el intestino grueso.

En la actualidad se han encontrado cepas de *bifidobacterium* que no sólo son capaces de producir una actividad de la enzima galactosidasa que convierte la lactosa en una mezcla de galactooligosacáridos, sino que también produce una mezcla de galactooligosacáridos que contiene hasta el 35% del disacárido galabiosa (Gal(α 1-6) - Gal). El último se conoce (véase Paton, J. C. & Paton, A. W. (1989), *Clin. Microbiol. Revs.*, **11**, 450-479; Carlsson, K. A. (1989), *Ann. Reviews Biochem.*, **58**, 309-350.) porque es un antiadhesivo capaz de prevenir la adhesión de toxinas, por ejemplo, la toxina Shiga, y patógenos, tales como *E. coli*, a la pared del intestino.

De acuerdo con la invención se proporciona una cepa de *Bifidobacterium bifidum* que produce una actividad de la enzima galactosidasa que convierta la lactosa en una mezcla de galactooligosacáridos que comprende el disacárido Gal (α 1-6)-Gal, al menos un trisacárido seleccionado a partir de Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc y Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc, el tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal(β 1-4)-Glc y el pentasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal(β 1-4)-Glc. Preferiblemente la mezcla comprende de 20 a 35% en p/v del disacárido, de 20 a 35% en p/v del trisacárido, de 15 a 25% en p/v del tetrasacárido y del 10 al 20% en p/v del pentasacárido.

El término “actividad de la enzima”, como se usa en relación con la actividad de la enzima galactosidasa de la presente invención, es la actividad que es el resultado de al menos una enzima galactosidasa.

Una cepa de *Bifidobacterium bifidum* capaz de producir una actividad de la enzima galactosidasa que convierte la lactosa en la mezcla de galactooligosacáridos como se define anteriormente se ha depositado con el número de entrada NCIMB 41171 en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas, Aberdeen el 31 de marzo de 2003.

Una tal cepa depositada de *Bifidobacterium bifidum*, o su equivalente biológicamente funcional, puede ser usada para producir la mezcla de galactooligosacáridos como se define anteriormente. La mezcla de galactooligosacáridos puede formar parte de un producto que mejore la salud del intestino promoviendo el crecimiento de bifidobacterias en el intestino, específicamente la cepa productora de origen. Tal producto puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste en productos lácteos (por ejemplo, leche líquida, leche en polvo tal como leche entera en polvo, leche desnatada en polvo, leche en polvo con grasa añadida, polvos de suero, leche materna, helado, yogur, queso, productos lácteos fermentados), bebidas, productos de alimentación infantil, cereales, pan, bizcochos, repostería, tortas, suplementos de alimentos, suplementos dietéticos, piensos, alimentación de volatería o de hecho cualquier otro alimento o bebida.

La mezcla de oligosacáridos también puede ser usada para la preparación de un medicamento para prevenir la adhesión de patógenos o toxinas producidas por patógenos a la pared intestinal. La mezcla puede ser administrada a un paciente después de un curso de tratamiento con antibióticos, que a menudo cambia o hasta destruye la flora intestinal sana normal, o después de cirugía del intestino, para “sembrar de nuevo” o reestablecer en el intestino la flora normal de un intestino sano. La mezcla de galactooligosacáridos puede ser usada en combinación con la cepa de *Bifidobacterium bifidum* mencionada anteriormente o un equivalente biológicamente funcional.

La expresión “equivalente biológicamente funcional” se interpreta que significa una cepa de *Bifidobacterium bifidum* que es capaz de producir una actividad de la enzima galactosidasa que convierte a la lactosa en la mezcla de galactooligosacáridos que se define anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona una composición de galactooligosacáridos que promueve el crecimiento de bifidobacterias que comprende como constituyentes eficaces la mezcla de galactooligosacáridos que se describe más arriba.

Preferiblemente la composición de galactooligosacáridos comprende de 20 a 35% p/v del disacárido, del 20 al 35% en p/v del(de los) trisacárido(s), del 15 al 25% en p/v del tetrasacárido y del 10 al 20% en p/v del pentasacárido.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención se proporciona un método para la fabricación de una sustancia que estimule el crecimiento de bifidobacterias caracterizado porque la lactosa o un material que contiene lactosa es tratado con una cepa de *Bifidobacterium bifidum* como se define anteriormente.

El material que contiene lactosa adecuado puede ser seleccionado a partir de lactosa disponible en el comercio, leche entera, leche semidesnatada, leche desnatada, suero y leche con grasa añadida. Tales productos lácteos pueden ser obtenidos a partir de vacas, búfalos, ovejas o cabras. La leche con grasa añadida se define como leche entera que ha sido desnatada para eliminar la grasa de la leche, que posteriormente es sustituida por la adición de grasa vegetal o aceite.

En la utilización de otros medios de crecimiento suplementados con sustratos carbohidratos distintos a la lactosa se ha encontrado que para *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con la invención se puede utilizar maltosa, rafinosa, xilano y fructosa. El cultivo de bacterias en el medio suplementado con uno de estos carbohidratos indujo la expresión de α -glucosidasa, α -galactosidasa, xilosidasa y (β -fructofuranosidasa respectivamente y causándose así la producción de α -glucooligosacáridos, α -galactooligosacáridos, xilooligosacáridos y fructooligosacáridos, respectivamente.

ES 2 284 028 T3

En una investigación que conduce a la presente invención, fue seleccionada una bacteria derivada del intestino para los que fueron capaces de producir galactosidasa y que tenían así el potencial más alto para producir galactooligosacárido(s). Por consiguiente, se ha encontrado que ciertas bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*, en particular *Bifidobacterium bifidum*, no sólo fueron capaces de producir una actividad de la enzima galactosidasa, sino que también que la enzima podía convertir la lactosa en una mezcla de galactooligosacáridos que comprende del 20 al 35% en p/v de un disacárido, del 20 al 35% en p/v de un trisacárido, del 15 al 25% en p/v de un tetrasacárido, del 10 al 20% en p/v de un pentasacárido. Un ejemplo específico de *Bifidobacterium bifidum* fue depositado el 31 de marzo de 2003 con NCIMB, Aberdeen con el número de entrada 41171.

Para cultivar estas bacterias, puede ser utilizada cualquier fuente nutritiva a condición de que pueda ser asimilada por la bacteria. El medio de cultivo apropiado puede ser formulado con, por ejemplo, carbohidratos tales como lactosa, sacarosa o glucosa; fuentes nutritivas inorgánicas que contienen nitrógeno u orgánicas tales como extracto de levadura, triptona, extracto de carne (Laboratorios Lemco) y similares; fuentes nutritivas inorgánicas tales como fosfatos, potasio y otros similares. Para cultivar, el pH del medio nutritivo debe estar dentro del intervalo de 6,0 a 8,0, preferiblemente 7,0 y el cultivo se lleva a cabo anaeróbicamente en el intervalo de temperaturas de 35 a 40°C, preferiblemente 37°C de 40 a 64 horas, preferiblemente 50 horas.

La cepa puede ser cultivada por cualquiera de los métodos de cultivo conocidos tales como cultivo en fase estacionaria, cultivo sumergido anaerobio o cultivo en agitación. Las células bacterianas son cultivadas por centrifugación o filtración y pueden ser usadas células tal cual como el catalizador de la reacción sin más tratamiento. Como una alternativa, las células pueden ser usadas en un estado inmovilizado según un procedimiento de inmovilización apropiado.

La *Bifidobacterium bifidum* de la invención puede ser usada para convertir la lactosa en sí misma o la lactosa contenida en un producto lácteo en la nueva composición de galactooligosacáridos de la invención. Después de la conversión las células bacterianas pueden ser eliminadas por centrifugación. Cualquier monosacárido presente puede ser eliminado usando, por ejemplo, incubación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La mezcla entonces puede ser sometida posteriormente a centrifugación y microfiltración. La solución GOS resultante entonces puede ser secada por pulverización para producir un polvo.

La leche que contiene la composición de galactooligosacáridos de la invención producida de este modo puede ser administrada directamente a niños, adultos o animales. De forma alternativa, puede ser usada para producir productos tales como pan, repostería o similares, tal que la estabilidad de los galactooligosacáridos en condiciones ácidas y a altas temperaturas permite que se usen sin descomposición. De forma alternativa, puede ser añadido polvo GOS a un producto como se menciona anteriormente.

El polvo GOS puede ser administrado a pacientes que sufren de trastornos intestinales tales como la enfermedad inflamatoria del intestino y el síndrome del intestino irritable, en cuyo caso el paciente pueda ingerir una dosis diaria de 2 a 20 g, preferiblemente de 5 a 10 g, más preferiblemente 7 g, tomada en dos dosis separadas.

De forma alternativa, la composición de galactooligosacáridos de la invención puede ser mezclada con un cultivo de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con la invención para producir una mezcla para mejorar la salud intestinal. Tal mezcla es clasificada como un simbiótico, que es definido como una mezcla de probióticos y prebióticos lo que afecta beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia y la implantación del suplemento dietético microbiano vivo en el tracto gastrointestinal (véase Gibson y Roberfroid, 1995, "Dietary modulation of the human microbiota: introducing the concept of prebiotics". *Journal of Nutrition* **125**,1401-1412). Tal combinación realza la supervivencia del probiótico en el ambiente hostil del colon ofreciendo un sustrato selectivo disponible. El probiótico bacteriano puede ser microencapsulado en el prebiótico galactooligosacárido para producir, por ejemplo, un polvo, que entonces puede ser añadido a productos lácteos, tal como el yogur, o ser usado como un suplemento dietético.

La ventaja de ingerir leche u otros productos que contienen la composición de galactooligosacáridos de la invención es que se promueve un aumento de los niveles de bifidobacterias beneficiosos en el intestino, a costa de otras bacterias presente menos deseables en la microflora del intestino, tal como la clostridia. Así, hay una disminución en ciertas bacterias autóctonas que podrían tener un efecto deletéreo sobre la salud del individuo. Esto entonces causaría una reducción de las infecciones del intestino. Esto ayuda a prevenir o a tratar la colitis, acorta los incidentes diarreicos y reduce el riesgo de enfermedades intestinales crónicas tales como la colitis ulcerativa y el cáncer. También puede ayudar a aliviar los síntomas del síndrome del intestino irritable.

Los animales domésticos alimentados con una dieta suplementada con la composición de galactooligosacáridos de la invención en, por ejemplo, la forma en polvo, pueden mostrar una mejor conversión de peso de su alimentación.

La presente invención además será descrita mediante la referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

1 L de medio (pH 7,0) que contenía 10,0 g/l de triptona, 5,0 g/l de Lab-LEMCO (extracto de carne), 5,0 g/l de extracto de levadura, 3,0 g/l de KHPO, 0,05 g/l de cisteína HCl, 10 g/l de lactosa y 1 ml/l de Tween 80 fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Después de la esterilización el medio fue inoculado con 1,0% (v/v) de un cultivo de *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 reciente y fue incubado en condiciones anaerobias a 37°C durante

ES 2 284 028 T3

50 h. Las células bacterianas fueron cultivadas por centrifugación (30000 g durante 20 minutos). Después del lavado dos veces con tampón fosfato (0,02M, pH 7,0) las células estaban listas para ser usadas en reacciones de síntesis de oligosacáridos.

5 Las células bacterianas (40 unidades de actividad de β -galactosidasa) fueron resuspendidas en 100 ml de tampón fosfato (0,02M, pH 7,0) conteniendo 50 g de lactosa. Se permitió a la reacción proceder a 40°C y después de 7 h la mezcla consistió en 35% (p/v) de productos de hidrólisis (glucosa, galactosa), 37% (p/v) de lactosa y 18% (p/v) de galactooligosacáridos con un grado de polimerización entre 2-5. Después de eliminar las células bacterianas por centrifugación (3000 g durante 20 minutos), los monosacáridos (glucosa y galactosa) fueron eliminados por la incubación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura posteriormente fue eliminada por centrifugación (10000 g durante 10 minutos) y la mezcla entonces fue filtrada por un filtro de microfiltración de 0,1 μ m para asegurar la calidad microbiológica del producto. La solución de azúcar entonces fue secada por pulverización para obtener la forma en polvo. Los productos fueron analizados cuantitativamente por cromatografía líquida de alta resolución usando un sistema LaChrom de Merck-Hitachi (Merck, Poole, Dorset, Reino Unido) equipado con una columna Carbohydrate de APEX (Cromatografía Jones, Mid Glamorgan, Reino Unido) y un detector de IR LaChrom de Merck-Hitachi. Fue usado acetonitrilo del 70% (v/v) como un eluyente a 25°C y con un caudal de 0,8 ml/min. La mezcla de galactooligosacáridos comprendió 25% de Gal-Gal, 35% de Gal-Gal-Glc, 24% de Gal-Gal-Gal-Glc y 16% de Gal-Gal-Gal-Gal-Glc.

20 Ejemplo 2

Fueron preparadas células NCIMB 41171 de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con el Ejemplo 1 y fueron añadidas a 500 ml de leche desnatada en un tanque agitado, fueron añadidas (300 unidades de actividad de galactosidasa). Se permitió a la conversión de lactosa proceder a 40°C. Después de 8h la concentración de galactooligosacáridos era del 22% (p/v) y la mezcla comprendió 28% de Gal-Gal, 32% de Gal-Gal-Glc, 21 % de Gal-Gal-Gal-Glc y 19% de Gal-Gal-Gal-Gal-Glc.

Ejemplo 3

30 *Modelo intestinal in vitro*

Las condiciones en el colon fueron simuladas en una cuba de fermentación continua de tres etapas (Macfarlane *et al.*, 1998, *Microbial Ecology*, **35**, 180-187) inoculada con homogeneizado fecal del 10% (phi) de voluntarios humanos sanos en un medio de crecimiento sin y con 1% (p/v) de la mezcla de GOS preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 (Tabla 2). El modelo consistió en tres recipientes, V1, V2 y V3, con volúmenes respectivos de operación de 270, 300 y 300 ml. La temperatura fue puesta a 37°C y junto con el pH fue controlada automáticamente. El pH del cultivo en los tres recipientes fue mantenido en 5,5, 6,2 y 6,8, respectivamente. Cada cuba de fermentación fue agitada magnéticamente y fue mantenida en condiciones anaerobias agitando continuamente con O₂-libre de N₂ (15 ml/min). El medio de crecimiento contenía los siguientes ingredientes: 8 g/l de almidón, 4 g/l de mucina, 3 g/l de caseína, 5 g/l de agua de peptona, 5 g/l de agua de triptona, 0,4 g/l de bilis N°3, 4,5 g/l de levadura, 0,005 g/l de FeSO₄, 4,5 g/l de NaCl, 4,5 g/l de KCl, 0,5 g/l de KH₂PO₄, 1,25 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0,15 g/l de CaCl₂·6H₂O, 1,5 g/l de NaHCO₃, 1 ml de Tween 80, 0,05 g/l de Hemina, 0,8 g/l de Cisteína·HCl. El medio fue alimentado a V1 por una bomba peristáltica y V1 secuencialmente suministró a V2 y V3 a través de una serie de tubos. El sistema fue operado a un tiempo de retención de aproximadamente 36 horas. El modelo intestinal fue dejado de la noche a la mañana para equilibrarlo antes de que la bomba media fuera encendida y fue activada durante al menos 10 días antes de que el medio que contenía el sustrato de ensayo fuera introducido y entonces fue dejado durante 10 días más. Las muestras fueron tomadas al principio y al final de cada ciclo. El volumen de la muestra eliminado fue 5 ml y esta cantidad fue usada para la enumeración del grupo bacteriano.

50 *Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)*

Las diferencias de las poblaciones bacterianas fueron evaluadas mediante el uso de FISH con sondas de oligonucleótidos diseñadas para modificar regiones diagnósticas de 16S rRNA. Estos fueron sintetizados comercialmente y marcados con el marcador fluorescente Cy3 (proporcionado por Eurogentec Ltd del Reino Unido). Las sondas moleculares utilizadas se presentan en la Tabla 1. Para el recuento total bacteriano fue usado el ácido nucleico 4,6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Las muestras obtenidas a partir de los recipientes de fermentación fueron diluidas en paraformaldehído del 4% (p/v) y fueron fijadas de la noche a la mañana a 4°C. Las células entonces fueron centrifugadas a 1500 x g durante 5 minutos, fueron lavadas dos veces con solución salina tamponada de fosfato (PBS; 0,1 M, pH 7,0), fueron resuspendidas en una mezcla de PBS/etanol 99% (1:1 p/v) y fueron almacenados a - 20°C durante al menos 1 hora. La suspensión de células entonces fue añadida a la mezcla de hibridación y fue dejada de la noche a la mañana para hibridarse a la temperatura apropiada para cada sonda. La mezcla hibridada fue filtrada al vacío usando un filtro de membrana de 0,2, μ m de Isopore (Corporación Millipore, Herts, Reino Unido). El filtro fue eliminado, colocado en un portaobjetos con SlowFade (Sondas Moleculares, Egan, OR, EE.UU.) y fue examinado con un microscopio fluorescente (Eclipse Nikon, E400). Las células marcadas con DAPI fueron examinadas bajo luz UV y las células hibridadas fueron vistas usando un filtro de DM510. Para cada diapositiva fueron contados al menos 15 campos visuales diferentes.

ES 2 284 028 T3

TABLA 1

Sondas de oligonucleotidos usadas para la caracterización de la microflora intestinal usando FISH

Sonda	Secuencia	Género objetivo	Temperatura	Referencia
Bac 303	5'-CCAATGTGGGGGACCTT-3'	<i>Bacteroides</i> spp.	45°C	Langendijk <i>et al.</i> (1995) <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 61 , 3069-3075.
Bif 164	5'-CATCCGGCATTACCACCC-3'	<i>Bifidobacterium</i> spp.	50°C	Manz <i>et al.</i> (1996) <i>Microbiology</i> , 142 , 1097-1106.
Chis 150	5'-AAAGGAAGAUUAAUACCGCAUA-3'	Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	50°C	Franks <i>et al.</i> (1998) <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 64 , 3336-3345.
Lab 158	5'-GGTATTAGCA(T/C)CTGTTTCCA-3'	<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> spp.	45°C	Hamsen <i>et al.</i> (1999) <i>Microbiol. Ecol. Health Dis.</i> , 11 , 3-12.

Resultados

TABLA 2

Poblaciones bacterianas según se determinan por FISH en un modelo intestinal in vitro cuando fue usado GOS comercial (Vivinal (RTM)) como sustrato a 7 g por día

Tiempo (días)	V1			V2			V3		
	1	10,5	21	1	10,5	21	1	10,5	21
Bacteria Total (log no.)	9,5	9,5	9,6	9,5	9,4	9,5	9,5	9,4	9,6
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,0	7,9	8,3	8,0	8,0	8,3	8,0	8,0	8,2
<i>Lactobacillus</i> spp	7,2	7,2	7,1	7,0	7,0	7,1	7,0	7,0	6,9
<i>Bacteroides</i> spp	8,1	8,1	7,5	8,0	8,2	7,5	8,0	8,1	7,9
Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	6,8	6,9	7,1	6,9	6,8	7,0	6,9	6,8	7,0

TABLA 3

Poblaciones bacterianas según se determina por FISH en un modelo intestinal in vitro cuando el GOS sintetizado de la presente invención fue usado como un sustrato a 7 g por día

Tiempo (días)	V1			V2			V3		
	1	10,5	21	1	10,5	21	1	10,5	21
Bacteria Total (log no.)	9,4	9,7	9,6	9,4	9,5	9,6	9,6	9,5	9,5
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,1	8,0	8,9	8,0	8,0	8,7	8,2	8,2	8,4
<i>Lactobacillus</i> spp	7,4	7,6	7,6	7,3	7,3	7,5	7,4	7,3	7,3
<i>Bacteroides</i> spp	8,0	8,2	8,2	8,0	8,1	8,1	7,8	7,8	7,8
Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	6,9	7,0	6,8	6,8	6,8	6,7	7,0	7,0	6,9

Conclusión

A partir de la Tabla 3, puede observarse que la mezcla GOS de la presente invención muestra mejores propiedades prebióticas, (es decir, un aumento mayor de las Bifidobacterias, así como una disminución en bacteroides que el GOS comercial equivalente (véase la Tabla 2). El efecto prebiótico era más fuerte en el recipiente 1 (V1) y 2 (V2), lo que se explica por el hecho de que el GOS de la presente invención consiste en oligosacáridos de peso moleculares bajos.

Ejemplo 4

10 *Análisis de metilación*

Los productos de síntesis de galactooligosacáridos preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 fueron purificados por filtración en gel en una columna de Biogel P2 (Pharmacia) eluido con 3 mlmin⁻¹ de agua.

15 Las posiciones del enlace para las preparaciones de galacto-oligosacáridos respectivos fueron determinadas por análisis de metilación. Las muestras liofilizadas (5-6 mg) fueron dispersadas en dimetilsulfóxido seco (DMSO) a 20°C durante 16 h después de insuflar argón. Fueron metilados por la adición secuencial de hidróxido de sodio pulverizado (0,5 g) y yodometano (4 ml) (Ciucanu y Kerek, 1984; MacCormick *et al.*, 1993). Después de la extracción con elución con un cartucho C18-unido (Sep-Pak, Waters, Wafford, Reino Unido), los carbohidratos metilados fueron secados, extraídos en CHCl₃/CH₃OH (1:1, v:v), y fueron evaporados hasta sequedad. Las muestras fueron hidrolizadas usando ácido trifluoroacético (Blakeney *et al.*, 1983), y fueron convertidas a acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA) por la reducción con NaBD₄ y la acetilación con anhídrido acético y N-metilimidazol (Albersheim *et al.*, 1967).

25 Los PMAA fueron analizados por CG en una columna de 50% de cianopropil-metilo- 50% de fenil-metil-polisiloxano reticulado-unido (Chromatography Thames, Maidenhead, Reino Unido) utilizando un detector de ionización de llama y un programa de temperaturas: 55°C (2 minutos), +45°C min⁻¹ (1,9 minutos), 140°C (2 minutos), +2°C min⁻¹ (35 minutos), 210°C (40 minutos). Los PMAA fueron identificados midiendo sus tiempos de retención en relación con hexaacetato de *mio*-inositol, y comparando los tiempos de retención relativos con los de los estándares externos. Una mezcla de estándares para cada azúcar fue preparada por metilación calculada de metil-glicósidos (Doares *et al.*, 1991). Las áreas de los picos fueron representadas como cantidades molares relativas usando factores de respuesta de carbono eficaces (Sweet *et al.*, 1975).

35 Las identidades de PMAA fueron confirmadas por sus espectros de masa de su electro-ionización. (Carpita y Shia, 1989). El análisis de CG-MS fue realizado en un CG idéntico en serie con un espectrómetro de masas 1 S Analytical Trio de Fisons, usando una fuente de temperatura de 200°C y un potencial de ionización de 70 eV.

40 Para determinar la configuración anomérica del producto de síntesis, los oligosacáridos fueron tratados con α -Galactosidasa o β -Galactosidasa (Melibiase; Sigma) en las condiciones óptimas sugeridas durante 30 minutos. Los productos de reacción fueron analizados por HPLC.

Resultados

45 A partir del análisis anterior la estructura del oligosacárido fue estimada que era para la fracción del tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6) - Gal (β 1-4)-Glc, la fracción del trisacárido Gal (β 1-6) - Gal (β 1-4)-Glc; Gal (β 1-3)- Gal (β 1-4)-Glc y la fracción del disacárido Gal (β 1-4)-Glc (sustrato de lactosa); Gal (β 1-3)-Glc; Gal (β 1-3)-Gal; Gal (β 1-6)-Gal; Gal (α 1-6)-Gal (galabiosa).

Gal: galactosa, Glc: glucosa.

50

Referencias

1. Albersheim P. D., D. J. Nevins, P. D. English, y A. Karr. 1967. A method for the analysis of sugars on plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res.*, **5**: 340-345.

55

2. Blakeney A. B., P. J. Harris, R. J. Henry y B. A. Stone. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr Res.*, **113**: 291-299.

3. Carpita N. C., y E. M. Shia. 1989. "Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) for partially methylated alditol acetates", pág. 157-216. En C. J. Biermann y G. D. McGinnis (ed.), "Analysis of carbohydrates by gas-liquid chromatography and mass spectroscopy". CRC Press Poca Raton, Fla.

60

4. Ciucanu I., y F. Kerek. 1984. A simple and rapid method for thepermethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res.*, **131**: 209-217.

65

5. Doares S. H., P. Albersheim, y A. G. Darvill. 1991. An improved method for the preparation of standards for the glycosyl-linkage analysis of complex carbohydrates. *Carbohydr Res.*, **210**: 311-317.

ES 2 284 028 T3

6. **MacCormick C. A., J. E. Harri, A. P. Cuning, y V. J. Morris.** 1993. Characterization of a variant of polysaccharide acetan produced by a mutan of *Acetobacter xylinum* strain CR 1/4. *J Appl Bacteriol.*, **74**: 196-199.

7. **Sweet D. P., R. Shapiro, y P. Albersheim.** 1975. Quantitative analysis by various GLC response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr Res.*, **40**: 217-225.

Ejemplo 5

Materiales y Métodos

10 La línea celular HT29 fue obtenida a partir de la Colección Europea de Cultivos de Células para Microbiología Aplicada e Investigación. Las soluciones madre de células fueron cultivadas a 37°C en CO₂ del 5% humedecido en un medio estándar que contenía medio Eagle modificado de Dulbecco con alta concentración de glucosa (DMEM) suplementado con el 5% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), penicilina 100 mM, estreptomycin 0,1 M, aminoácidos no esenciales (NEAA x 100) y a-glutamina 200 mM. Las células fueron alimentadas de nuevo cada 48 h y fueron pasadas antes de que la confluencia fuera alcanzada.

Ensayo de sensibilidad de oligosacáridos

20 Fue usado medio estándar de suero (1% v/v) suplementado con diferentes concentraciones de oligosacáridos (0,01, 0,1, 1, 10, 100 mM) para el ensayo de sensibilidad de oligosacárido de acuerdo con Olano-Martin *et al.*, 2003). Las células fueron alimentadas de nuevo el medio experimental (que contenía el oligosacárido de interés) a diario, y la medida de células adherentes fue realizada por la eliminación del medio experimental y lavando las células con solución salina tamponada de fosfato libre de Ca⁺⁺ (pH 7,9, 6 gL⁻¹). Las células adherentes fueron entonces tripsinizadas y fueron neutralizadas con un volumen igual de medio de suero estándar. La suspensión de las células fue diluida en Isoton II y las células fueron introducidas en un Contador Coulter. El porcentaje de supervivencia de las células fue calculado como sigue (Figura 1).

30
$$\% \text{ de supervivencia} = (\text{absorbancia media de células tratadas} / \text{absorbancia media de control}) \times 100$$

Ensayo de adhesión

35 Fueron cultivadas células HT29 en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos hasta una confluencia > del 90% usando medio estándar. Para la última alimentación de las células antes de la realización del ensayo, fue usado medio sin antibiótico.

40 Fueron cultivados patógenos anaeróticamente en medio de cultivo de células sin antibiótico para al menos tres subcultivos. El día del ensayo, el medio de cultivo de tejido reciente pre-reducido fue inoculado con 10% de un cultivo patógeno de noche y fue incubado durante 4 h antes del ensayo.

La solución madre de los oligosacáridos de ensayo fue preparada a una concentración de 5 M en solución salina de tampón fosfato y fue esterilizada con filtro.

45 Una dilución 1/1000 del cultivo patógeno de 4 h, fue preparada en PBS y fue enumerada por recuento de placa. El medio fue aspirado de la placa de cultivo de tejido y las células fueron lavadas una vez en PBS (1 ml).

50 Para cada oligosacárido de ensayo, una solución de 0,5 ml de oligosacárido (5 M) fue añadida a tres pocillos. La solución salina tamponada de fosfato (PBS) sin ningún oligosacárido fue incluida como control. 0,5 ml de suspensión de cultivo fueron añadidos a todos los pocillos, la placa fue mezclada fuertemente y fue incubada aeróticamente a 37°C durante 2 h.

55 El cultivo fue aspirado, y todos los pocillos fueron lavados tres veces en PBS estéril (1 ml por pocillo). Después del lavado final, el PBS fue aspirado y fueron añadidos 70 µl de una solución de tripsina/EDTA a cada pocillo, fue mezclado y se dejó sedimentar 5 minutos a 37°C.

1 ml de PBS fue añadido por pocillo y se mezcló con la pipeta para asegurarse de que todas las células fueran eliminadas del fondo del pocillo y de que los grumos fueran rotos.

60 1 ml de la suspensión de células fue pipeteada en una botella universal de MRD (Diluyente de Recuperación Máximo) y luego se diluyó como es apropiado. Las diluciones fueron puestas en placas en agar de recuento en placa (PCA) y fueron incubadas a 37°C durante 24 h.

65 Después de la incubación, las colonias fueron enumeradas y la inhibición de adhesión fue calculada como la relación de bacterias (c.f.u ml⁻¹) presentes en la muestra respecto al control (PBS) (Figura 2).

Conclusión

Los resultados mostrados en la Figura 2 indican una fuerte inhibición de la adhesión de *E. coli* EPEC y *S. typhimurium* en presencia de la fracción de disacáridos, cuya inhibición está también presente en la mezcla de GOS. Hay un efecto de antiadhesión inferior en presencia de la fracción más alta que del trisacárido (> tri) de la mezcla frente a *S. typhimurium*.

El ensayo de sensibilidad del oligosacárido se realiza para asegurarse de que la mezcla de oligosacáridos no es tóxica para las células HT29 (Figura 1).

Referencias

Olano-Martin E., Williams M. R., Gibson G. R., Rastall RA. 2003. Pectins and pecticoligosaccharides inhibit *Escherichia coli* 0157: H7 Shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiol Letters* **218** (1): 101-105.

Figura 1. Capacidad de supervivencia celular al ser afectada por la adición de diferentes concentraciones de oligosacáridos (0,01-100 mM) después de 24 y 48 h de incubación.

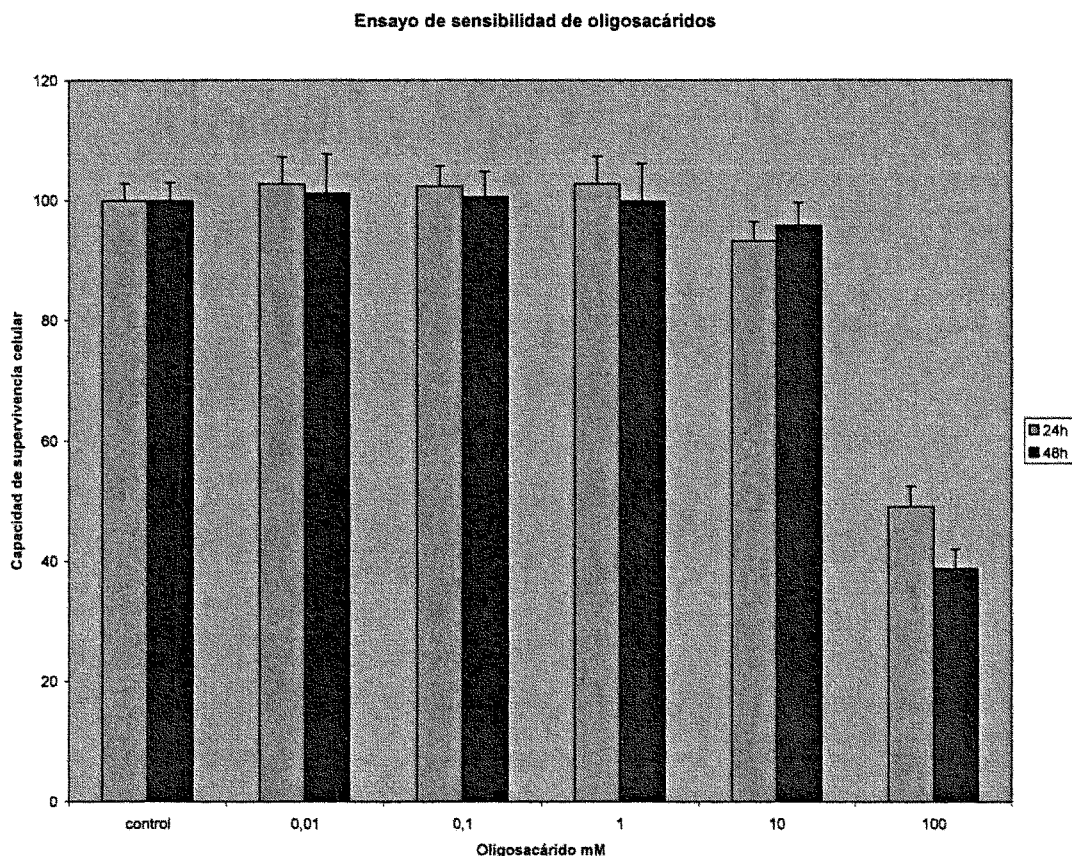
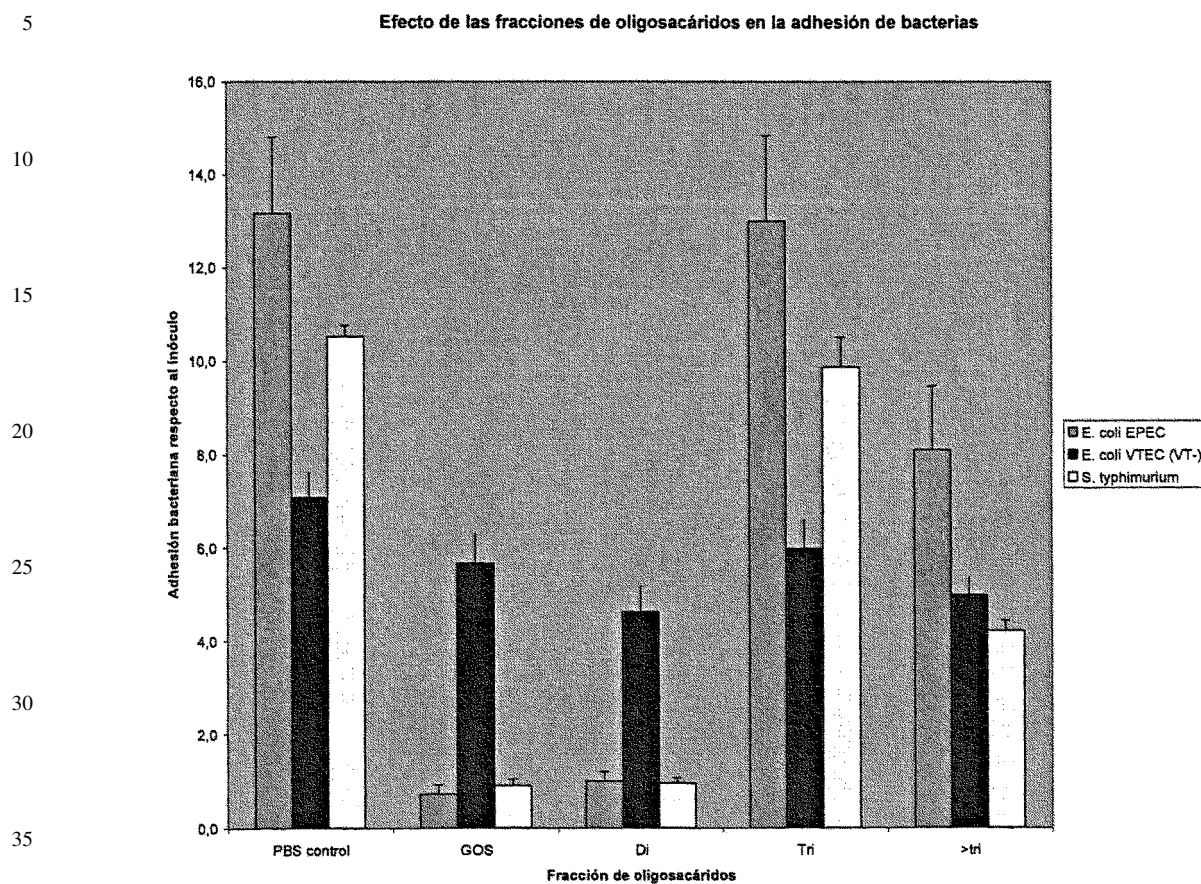


Figura 2. Efecto de la mezcla de oligosacáridos (TODOS) y de las diferentes fracciones de la mezcla sobre la adhesión de *E. coli* EPEC, *E. coli* VTEC y *Salmonella typhimurium* respecto a células HT29.



40 **Ejemplo 6**

El producto GOS usado en este examen fue fabricado como se describe antes (Ejemplo 1) y la inulina fue obtenida de Orafiti (Bélgica).

45 Cuarenta cerdos machos destetados fueron comprados en JSR Genetics Ltd, Southburn, Driffield, Yorkshire. YO25 9ED.

A la llegada de los cerdos de la Universidad de Reading fueron alojados en grupos en cuatro grupos de diez cerdos durante un periodo de siete días después de su transporte para dar tiempo a que los cerdos se aclimatasen a la unidad y a la dieta. El peso promedio de los cerdos en su suministro fue de 14,70 kg.

50 Después de un período de aclimatación de siete días los cerdos fueron transferidos a un lecho individual, dentro de la misma unidad. El peso promedio de los cerdos en el lecho individual fue de 17,46 kg.

55 Los cerdos fueron identificados por un único marcaje en la oreja, también fueron enumerados individualmente usando un marcador de reserva impermeable. Cada pluma individual fue enumerada con el mismo número de identificación que el usado para marcar cada cerdo.

60 A diez cerdos se les asignó una de cuatro dietas, una dieta control (NEG), una dieta suplementada con 1,6% (p/p) de GOS preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 respecto a la dieta control, dieta suplementada con 4% (p/p) de GOS frente a la dieta control o dieta suplementada con 1,6% (p/p) de inulina respecto a la dieta control.

Los cerdos fueron acostados sobre aserrín en todo el estudio, también les fue proporcionada paja como un enriquecimiento ambiental ya que era un juguete que ayudaba a aliviar el aburrimiento.

65 En todo el estudio los cerdos recibieron peletes de Deltawean 15 NGP (ABN, ABN House, Apto. de correos 250, Oundle Rd, Woodston, Peterborough. PE 9QF) una alimentación completa suficiente para alimentar *ad libitum* a cerdos en edad de crecimiento.

ES 2 284 028 T3

Composición nutritiva/mineral de Deltawean 15NGP

Nutriente	Inclusión
Aceite	3,3%
Proteínas	19,2%
Fibra	2,8%
Ceniza	4,8%
Humedad	13,8%
Vitamina A	9500 u.i./kg
Vitamina E, α -tocoferol	100 u.i./kg
Vitamina D3	1850 u.i./kg
Selenita de sodio, selenio	0,30 mg/kg
Lisina	1,32%
Sulfato de cúprico, cobre	170 mg/kg

El alimento de los cerdos también contenía antioxidantes permitidos, HidroxiAnisol Butilado (BHA), hidroxiTolueno Butilado (BHT) y Etoxiquina.

Los cerdos fueron asignados al azar para el tratamiento aunque dos o tres cerdos fueron colocados con el mismo tratamiento dietético individualmente dentro del misma área de pluma de grupo. Los cerdos fueron agrupados de este modo para evitar confundir tratamientos debido a la fuga de cerdos de un grupo individual, es decir, que se pudieran robar el alimento que contenía el tratamiento de la dieta correcto para aquel cerdo particular. Los cerdos individualmente colocados, en los grupos de dos o tres, con el mismo tratamiento, fueron asignados al azar en toda la unidad.

Fueron recogidas muestras fecales de cada cerdo al principio y después de cuatro semanas de alimentación con las dietas de ensayo, y las poblaciones microbianas fecales fueron determinadas usando FISH (Tabla 4) como se describe antes (Ejemplo 3). Al final del experimento, los cerdos fueron sacrificados para obtener muestras del contenido del colon proximal y distal. el valor del pH (Tabla 5), ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (Tabla 6) y las poblaciones microbianas (Tabla 7) fueron determinadas en el contenido del colon proximal y distal. Se muestran los datos como el promedio \pm desviación típica. Las diferencias fueron analizadas por la prueba t-Student. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0,05$.

TABLA 4

Efecto del tratamiento prebiótico y de la dieta sobre la población microbiana en heces de cerdos al principio y después de cuatro semanas del período experimental

	Tiempo 0*	Tiempo 4 semanas			
		NEG [†]	1,6% GOS [†]	4% GOS [†]	Inulina [†]
Bacteria Total	8,75 \pm 0,22	8,97 \pm 0,24	8,99 \pm 0,23	8,97 \pm 0,28	8,95 \pm 0,28
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,48 \pm 0,29	6,91 \pm 0,25 ^o	7,07 \pm 0,23 ^o	7,34 \pm 0,21 ^{a,o}	7,45 \pm 0,24 ^{a,b,o}
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,33 \pm 0,25	6,55 \pm 0,23	6,93 \pm 0,16 ^o	7,17 \pm 0,24 ^{a,o}	6,94 \pm 0,26 ^{a,o}
<i>Bacteroides</i> spp.	7,27 \pm 0,23	7,75 \pm 0,24 ^o	7,84 \pm 0,27 ^o	7,85 \pm 0,22 ^o	8,04 \pm 0,18 ^o
Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	7,43 \pm 0,33	8,04 \pm 0,24 ^o	8,14 \pm 0,25 ^o	8,33 \pm 0,28 ^o	8,22 \pm 0,23 ^o

Cfu log₁₀/g de heces; Cada valor es el promedio \pm SD, * n=40, † n=10; las diferencias fueron analizadas por la prueba t-Student. El promedio en una fila con superíndices significan diferente ($P < 0,05$)

^a de NEG, ^b de GOS 1,6%, ^o a partir del tiempo 0.

TABLA 5

Efecto del tratamiento prebiótico y de la dieta en el pH de muestras del colon proximal y distal

	NEG	1,6% GOS	4% GOS	Inulina
Colon proximal	5,71 \pm 0,16	5,65 \pm 0,11	5,49 \pm 0,14 ^{a,b,c}	5,90 \pm 0,27
Colon distal	7,16 \pm 0,04	7,16 \pm 0,03	7,16 \pm 0,04	7,12 \pm 0,02

Cada valor es el promedio \pm SD, n=10. Las diferencias fueron analizadas por la prueba t-Student. El promedio en una fila con superíndices significan diferente ($P < 0,05$)^a de NEG, ^b de GOS 1,6%, ^c de inulina.

Tabla 6. Efecto del tratamiento prebiótico y de la dieta sobre las concentraciones de SCFA de muestras de colon proximal y distal*.

	Colon proximal				Colon distal			
	NEG	1,6% GOS	4% GOS	Inulina	NEG	1,6% GOS	4% GOS	Inulina
Ácido láctico	2,62±0,73	6,62±1,67 ^a	4,41±0,77 ^{a,b}	3,07±1,12 ^b	ND	ND	ND	ND
Ácido acético	41,43±6,53	44,45±2,81	51,85±2,68 ^{a,b,c}	44,58±3,31	31,61±5,50	30,68±2,32	33,57±2,21	38,54±3,66 ^{a,b,c}
Ácido propiónico	35,68±5,1	27,52±2,87 ^a	32,99±8,39	30,63±3,61	15,36±3,46	15,27±1,92	16,75±3,88	17,36±2,16
Ácido butírico	10,51±1,42	10,57±1,56	11,19±3,24	10,86±3,99	4,81±1,18	4,48±0,73	5,13±1,09	6,11±1,42

Cada valor es el promedio \pm SD, n=10. Las diferencias fueron analizadas por la prueba t-Student. Los promedios en una fila con superíndices significa diferente (P <0,05)

^a de NEG, ^b de GOS 1,6%, ^c de inulina. ND no detectado; * $\mu\text{mol/g}$ en base a la materia húmeda.

Tabla 7. Efecto del tratamiento prebiótico y de la dieta sobre la población microbiana en muestras de colon proximal y distal.

	Colon proximal				Colon distal			
	NEG	1,6% GOS	4% GOS	Inulina	NEG	1,6% GOS	4% GOS	Inulina
Bacteria Total	8,61±0,24	8,68±0,22	8,62±0,21	8,67±0,25	8,83±0,28	8,81±0,21	8,80±0,22	8,80±0,29
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,13±0,25	7,30±0,26	7,87±0,26 ^{a,b,c}	7,37±0,32	7,03±0,25	7,05±0,26	7,41±0,27 ^a	7,58±0,32 ^{a,b}
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,94±0,23	7,17±0,26	7,38±0,24 ^a	7,19±0,24	6,60±0,34	6,96±0,21	7,16±0,35 ^a	7,05±0,30
<i>Bacteroides</i> spp.	7,57±0,21	7,76±0,21	7,65±0,33	7,97±0,24 ^a	7,77±0,27	7,88±0,24	7,82±0,26	8,04±0,32
Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	8,12±0,23	8,08±0,25	8,13±0,28	8,07±0,27	8,05±0,41	8,15±0,15	8,29±0,19	8,18±0,23

Cfu log₁₀/g en una base húmeda; Cada valor es el promedio \pm SD, n=10. Las diferencias fueron analizadas por la prueba t-Student.

Los promedios en una fila con superíndices significan diferente (P <0,05)

^a de NEG, ^b de GOS 1,6%, ^c de inulina.

Conclusión

5 Tabla 5: hay una caída en el pH del colon proximal en presencia de GOS (para 1,6% y especialmente para 4%) que en combinación con los datos de SCFA (Tabla 6) sugiere que el producto GOS alcanza el colon proximal (los productos de fermentación han aumentado).

10 Tabla 7: la presencia de GOS (4%) muestra un aumento significativo de los números de población de bacterias beneficiosas (bifidobacterias, lactobacilli) en el colon proximal. Este aumento de los números de población es inferior en la parte distal y en las muestras fecales, que pueden ser explicadas por el hecho de que el producto GOS parece ser fermentado principalmente en el colon proximal. El tratamiento con GOS 1,6% mostró tendencias similares.

15 En el colon proximal puede observarse un aumento del número población de bifidobacterias así como un aumento de la producción de ácido acético (el producto de fermentación principal de la bifidobacteria). Esto sugiere que el producto de GOS es muy selectivo respecto a la especie bifidobacteria.

Ejemplo 7

Estudios de casos

20 Estudio del caso 1

Enfermedad inflamatoria del intestino (IBD)

25 Un paciente femenino de 43 años con colitis ulcerativa diagnosticada (una de las dos formas principales de la IBD) es citado como un estudio del caso sobre los efectos del producto de GOS, preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.

30 El paciente había sufrido la colitis ulcerativa durante 5 años y estuvo sin medicación previa, y durante, el período de prueba. El agente antiinflamatorio sulfasalazina se había usado antes, pero sin el efecto positivo. El paciente tenía dificultad en la digestión de productos de alimentación, estaba bajo una dieta estándar, sufrida de náuseas, diarrea y dolor abdominal. Este provenía del intestino grueso del lado izquierdo, lo que se correlacionó con el diagnóstico de colitis basada en la inflamación del colon descendente.

35 Una dosis de GOS de 7 g/día total a diario (en 2 dosis separadas) fue ingerida. A los 4 días de la toma, los síntomas comenzaron mejorar. El paciente fue capaz de digerir su dieta mejor, los dolores intestinales comenzaron a aliviarse y se redujeron las náuseas. No se realizó ningún análisis clínico por endoscopia, pero sin embargo la sensación de bienestar del paciente fue mejorada notablemente. El único cambio en la dieta fue la adición de GOS. Seis semanas más tarde, este efecto había sido mantenido.

40 Aunque no hubo un estudio con placebo controlado, múltiples pacientes, este caso del estudio proporciona pruebas fundamentadas respecto a los efectos positivos de los prebióticos GOS en la forma del IBD principal.

Caso del estudio 2

Síndrome del intestino irritable (IBS)

45 Un varón de 27 años que había sufrido de IBS durante 3 años estuvo ingiriendo durante 3 semanas 7 g/día de GOS preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 en dos dosis separadas. Antes de este período él experimentó flatulencias, estreñimiento, dolor intestinal y cansancio. Estos son los síntomas clásicos asociados con el IBS. El paciente no había ingerido antibióticos durante 6 meses y estaba bajo una dieta de trigo/gluten y libre de azúcar.

50 Después del aporte prebiótico, un alivio marcado de estos síntomas ocurrió a los 3 días y se ha mantenido. El sujeto relata una mejora dramática de su bienestar global y de su salud intestinal, dijo: "Estoy ahora listo para correr un maratón". El es capaz de ingerir una dieta normal sin dificultades.

55 Este informe no es un ensayo controlado, pero actúa realmente como pruebas fundamentadas mostrando lo que GOS puede mejorar la condición del IBS y restaurar al paciente una mejor calidad de vida.

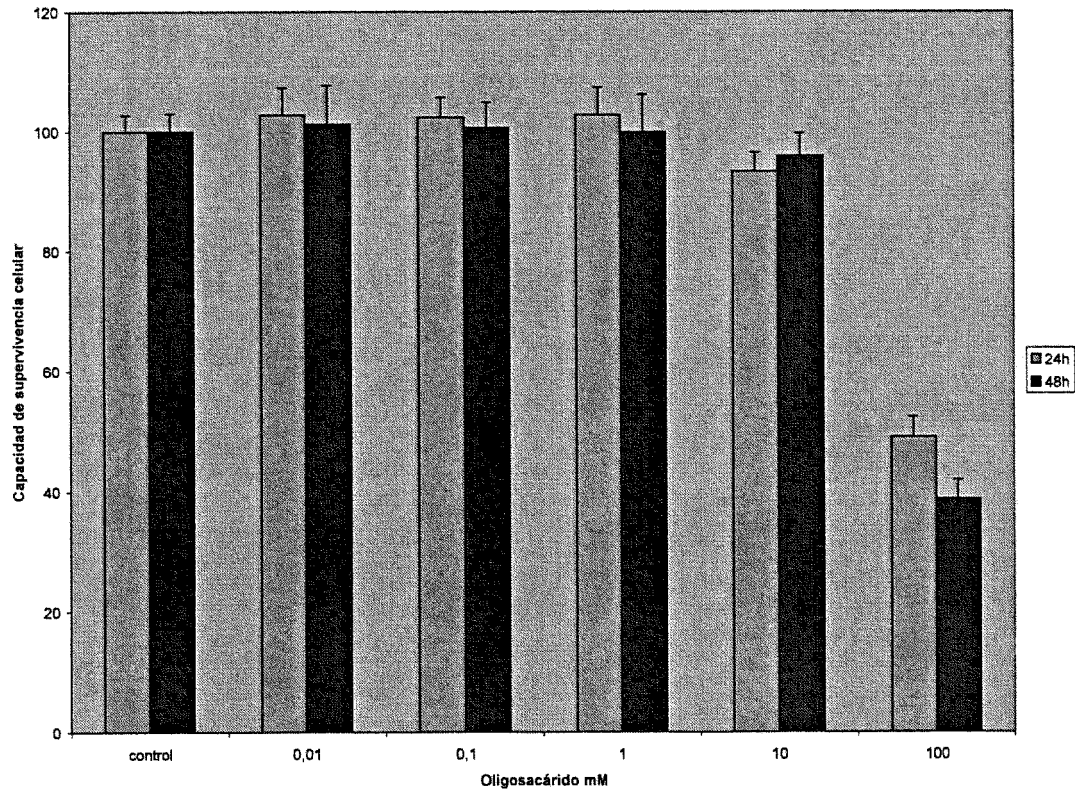
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Bifidobacterium bifidum* depositada con el número de entrada NCIMB 41171 en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marítimas, Aberdeen, Reino Unido el 31 de marzo de 2003 que produce una actividad de la enzima galactosidasa que convierte a la lactosa en una mezcla de galactooligosacáridos que comprende el disacárido Gal (α 1-6)-Gal, al menos un trisacárido seleccionado a partir de Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc y Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc, el tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal(β 1-4)-Glc y el pentasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal(β 1-4)-Glc.
- 10 2. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la mezcla de galactooligosacáridos comprende del 20 al 35% en p/v del disacárido, del 20 al 35% en p/v del trisacárido, del 15 al 25% en p/v del tetrasacárido y del 10 al 20% en p/v del pentasacárido.
- 15 3. Una composición de galactooligosacáridos para estimular el crecimiento específico de bifidobacterias que comprende, como constituyentes eficaces, una mezcla que comprende el disacárido Gal (α 1-6)-Gal, al menos un trisacárido seleccionado a partir de Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc y Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc, el tetrasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal(β 1-4)-Glc y el pentasacárido Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal(β 1-4)-Glc.
- 20 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende del 20 al 35% en p/v del disacárido, 20-35% en p/v del trisacárido, 15-25% en p/v del tetrasacárido y 10-20% en p/v del pentasacárido.
- 25 5. Una composición para mejorar la salud intestinal que comprende un cultivo de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en combinación con la composición de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4.
- 30 6. Una composición para estimular el crecimiento de bifidobacterias de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, para uso en un método de tratamiento de un ser humano o animal mediante terapia.
- 35 7. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en la preparación de un medicamento para prevenir la adhesión de patógenos o toxinas producidas por patógenos a la pared intestinal.
- 40 8. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la preparación de un medicamento para reestablecer una flora intestinal normal después del tratamiento con antibióticos o cirugía.
- 45 9. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en la preparación de un medicamento para tratar trastornos intestinales, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria del intestino o el síndrome del intestino irritable.
- 50 10. El uso de una cepa de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para producir la mezcla de galactooligosacáridos que se define en la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 55 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la mezcla de galactooligosacáridos es parte de un producto para mejorar la salud intestinal.
- 60 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el producto es seleccionado a partir del grupo que consiste en productos lácteos, bebidas, productos de alimentación infantil, cereales, bizcochos, repostería, tortas, suplementos alimenticios, suplementos dietéticos, piensos, alimentación de volatería o cualquier otro alimento o bebida.
- 65 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el producto lácteo es seleccionado a partir del grupo que consiste en leche líquida, leche en polvo, leche entera en polvo, leche desnatada en polvo, leche en polvo con grasa añadida, polvo de suero, leche para bebés, helado, yogur, queso y productos lácteos fermentados.
14. Un método para la fabricación de una sustancia para estimular el crecimiento de bifidobacterias **caracterizado** porque la lactosa o un material que contiene lactosa es tratado con una cepa de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el material que contiene lactosa es seleccionado a partir del grupo que consiste en lactosa disponible en el comercio, leche entera, leche semidesnatada, leche desnatada, suero y leche con grasa añadida.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la leche es obtenida a partir de ganado, búfalos, ovejas o cabras.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que después de la eliminación de las células de *Bifidobacterium bifidum* la sustancia se seca por pulverización para producir un polvo.

Ensayo de sensibilidad de oligosacáridos



Efecto de las fracciones de oligosacáridos en la adhesión de bacterias

