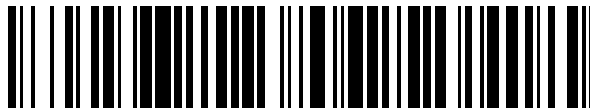


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 854**

51 Int. Cl.:

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08168763 .4**

96 Fecha de presentación: **10.11.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2183984**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

54 Título: **Bacterias que producen ácido siálico**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
**NESTEC S.A.
AVENUE NESTLÉ 55
1800 VEVEY, CH**

72 Inventor/es:
**Colarow, Ladislav;
Jankovic, Ivana;
Sprenger, Norbert;
Schmitt, Jeroen y
Debeche-Boukhit, Takoua**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 378 854 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

Bacterias que producen ácido siálico.

La presente invención se refiere en general al campo de los ácidos siálicos, en particular al campo de los productos alimenticios con un contenido rico en ácido siálico y a sus usos. Una configuración de la presente invención se refiere a un producto alimenticio enriquecido con bacterias que producen ácido siálico y/o a una fracción del mismo.

5 Los ácidos siálicos (SiAc) son una familia de monosacáridos de nueve carbonos cargados, derivada del ácido neuramínico (NeuAc). El NeuAc es el único ácido siálico que se forma normalmente en los seres humanos. En otros vertebrados, por ejemplo, también están presentes los ácidos N-glicolilneuramínicos.

10 Los SiAc son indispensables para las principales funciones celulares en los vertebrados. Como componente estructural y funcional de los gangliósidos, se sintetizan en todos los tejidos de los mamíferos. Sin embargo, las células y los tejidos de crecimiento rápido sometidos a elevadas velocidades de renovación y de apoptosis o muerte celular podrían necesitar NeuAc adicional, a través de la dieta por ejemplo.

15 De ahí que actualmente se utilicen ácidos siálicos, especialmente en el campo de la nutrición infantil. Por ejemplo, una posible implicación del SiAc en el desarrollo cognitivo de los niños es un tema abarcado por Wang (Wang, B. y Brand-Miller, J(2003)Eur.J.Clin.Nutr.Nov;57(11):1351-69). Brevemente, los estudios que comparan niños que se alimentan con leche materna con niños que se alimentan con alguna fórmula demuestran que un contenido mayor de NeuAc en la leche materna comparado con una fórmula normal infantil se correlaciona con un contenido elevado de NeuAc en la saliva y el cerebro de los niños. Sin embargo, no se dispone de datos sobre los efectos en el comportamiento del suplemento de NeuAc en los seres humanos. No obstante, se ha especulado que el suplemento de NeuAc en la leche de las vacas daría lugar a una leche con atributos de leche humana, lo que tendría un impacto en el desarrollo de los niños.

20 Las fuentes naturales ricas en SiAc, por ejemplo NeuAc, son por ejemplo la leche humana, la leche de elefante, la leche de búfalo indio, la carne, los huevos y el pescado. Sin embargo, estas fuentes son o bien insuficientes o no apropiadas y/o demasiado caras, por ejemplo, para el suplemento de productos lácteos con SiAc en la industria actual alimenticia.

25 Por consiguiente, el objetivo de la presente invención consistía en determinar una fuente de SiAc, fácil de utilizar en entornos industriales, relativamente económica y que permitiera aislar el SiAc en una forma pura o bien como una fracción que se pueda emplear en un producto alimenticio.

Los inventores se quedaron realmente sorprendidos al lograr este objetivo a partir de las reivindicaciones independientes.

30 Los inventores descubrieron que el SiAc se puede obtener fácilmente en fuentes bacterianas en una forma adecuada para productos alimenticios.

35 Los SiAc son componentes superficiales de ciertos patógenos que actúan como factores virulentos. Se cree que actúan como una molécula anti-reconocimiento o anti-identificación permitiendo el enmascaramiento de los microorganismos sialilados y evadiendo con ello mecanismos inmunes anfitriones. No obstante, el ácido siálico que se obtiene de los organismos patógenos no es nada apropiado para los productos alimenticios, en particular para los productos alimenticios empleados en la nutrición infantil.

Sorprendentemente, los presentes inventores han identificado ahora microorganismos de tipo alimenticio que sintetizan SiAc, por ejemplo NeuAc, en particular cuando crecen en un medio estándar.

40 Como consecuencia de ello, una manifestación de la presente invención es el uso de ácido siálico de origen natural que produce bacterias aptas para uso alimentario con el objetivo de fortalecer un producto alimenticio con ácido siálico.

El producto alimenticio puede verse enriquecido por bacterias aptas para uso alimentario productoras de ácido siálico, inactivadas o vivas, y/o con una fracción de las bacterias y/o de su cultivo de crecimiento.

Las bacterias "aptas para uso alimentario" son bacterias que han sido aprobadas para el consumo animal o humano.

45 En una configuración preferida de la presente invención, los ácidos siálicos de origen natural que producen bacterias para uso alimentario son viables en los productos alimenticios. Esto tiene la ventaja de que las bacterias pueden continuar produciendo ácido siálico en el cuerpo, incluso después del consumo del producto alimenticio. Además, si las bacterias siguen viables en el cuerpo, se multiplicarán y como consecuencia de ello la cantidad de ácido siálico aportada por las bacterias al cuerpo humano aumentará de forma significativa.

Para los productos estériles, se puede preferir que las bacterias se encuentren presentes en forma inactivada, o bien que el producto se haya enriquecido con SiAc bacteriano puro o con una fracción de un cultivo de bacterias productoras de SiAc que no contenga ninguna bacteria viva.

5 En particular si las bacterias aptas para uso alimentario son viables en el producto, las bacterias o al menos una fracción de las mismas serán eficaces en cualquier cantidad. Si las bacterias alcanzan el intestino vivas, una sola bacteria puede ser suficiente para lograr un potente efecto por colonización y multiplicación.

10 Sin embargo, para el producto alimenticio de la presente invención generalmente se prefiere que las bacterias o al menos una parte de las mismas se utilice en una cantidad suficiente para conseguir un aumento del contenido de ácido siálico del 0,05-2% en peso seco, preferiblemente del 0,4-1,5% en peso seco, y más preferiblemente del 0,6-1% en peso seco.

El producto alimenticio de la presente invención puede ser una composición nutricional, un nutracéutico, una bebida, un aditivo alimenticio o un medicamento. Un aditivo alimenticio o un medicamento puede encontrarse en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas o líquido, por ejemplo.

15 El producto alimenticio se elige preferiblemente del grupo compuesto por productos alimenticios a base de leche, en particular leche, suero, yogur, queso, productos fermentados; fórmulas infantiles; papillas sólidas de bebe; fórmulas de seguimiento; bebidas para niños pequeños; zumos de frutas, mezclas al menos parcialmente solubles en forma de polvo como bebidas de malta, batidos de chocolate, cappuccino, café; chocolate; productos a base de cereales; dulces, galletas; gelatinas.

20 La leche puede ser cualquier leche que se obtenga de fuentes animales o vegetales y es preferiblemente leche de vaca, leche humana, leche de oveja, leche de cabra, leche de yegua, leche de camella o leche de soja.

En lugar de leche se pueden utilizar fracciones proteicas derivadas de la leche o bien calostro.

25 Los productos alimenticios puede contener además hidrocoloides protectores (como resinas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de películas, agentes/materiales de encapsulado, materiales de pared/revestimiento, compuestos matriciales, revestimientos, emulgentes, agentes tensoactivos, solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, portadores, rellenos. co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, agentes gelificantes, formadores de geles, antioxidantes y antimicrobianos. Pueden contener también aditivos farmacéuticos convencionales y adyuvantes, excipientes y diluyentes, que incluirán pero no se limitarán a agua, gelatina de cualquier fuente, resinas vegetales, sulfonato de lignina, talco, azúcares, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles, agentes aromatizantes, conservantes, estabilizadores, emulgentes, tampones, lubricantes, colorantes, humectantes, rellenos y similares. Además, pueden contener material portador orgánico o inorgánico para su administración oral o enteral así como vitaminas, minerales, elementos traza y otros micronutrientes de acuerdo con las recomendaciones de los organismos gubernamentales como el USRDA.

30 Los productos alimenticios de la presente invención pueden contener una fuente proteínica, una fuente de hidratos de carbono y una fuente de lípidos.

35 Se puede emplear cualquier proteína dietética adecuada como por ejemplo, las proteínas de animales (como las proteínas de la leche, proteínas de la carne y las proteínas de huevo); proteínas vegetales (como la proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres o combinaciones de los mismos. Las proteínas de la leche como la caseína, el trigo y las proteínas de soja son las preferidas.

40 Si el producto alimenticio incluye una fuente grasa, la fuente grasa aporta preferiblemente un 5% hasta un 40% de la energía de la fórmula; por ejemplo, un 20% hasta un 30% de la energía. Se puede añadir DHA. Se puede obtener un perfil de grasas adecuado usando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol con gran contenido en ácido oleico.

45 Una fuente de carbohidratos aportará más preferiblemente entre un 40 y un 80% de la energía de la composición. Se puede utilizar cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de las mismas.

Las bacterias aptas para uso alimentario se eligen preferiblemente del grupo formado por los lactobacilos.

Los inventores descubrieron que los lactobacilos producen en particular grandes cantidades de SiAc si los lactobacilos producen N-acetilneuraminato-liasa y/o N-acetilneuraminato-aldolasa.

50 Las especies de lactobacilos especialmente preferidas que se pueden utilizar con el objetivo de la presente invención son *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* y/o *Lactobacillus salivarius*. Se obtienen resultados especialmente buenos con bacterias procedentes del grupo formado por *Lactobacillus sakei* NCC 121, *Lactobacillus sakei* NCC 2935, *Lactobacillus sakei* NCC 2934, *Lactobacillus sakei* NCC 166, *Lactobacillus sakei* NCC 170, *Lactobacillus sakei* NCC 1393, *Lactobacillus sakei* NCC 1428, *Lactobacillus sakei* NCC 1511, *Lactobacillus sakei*

NCC 2937, *Lactobacillus plantarum* NCC 2936, *Lactobacillus plantarum* NCC 252 o mezclas de los mismos.

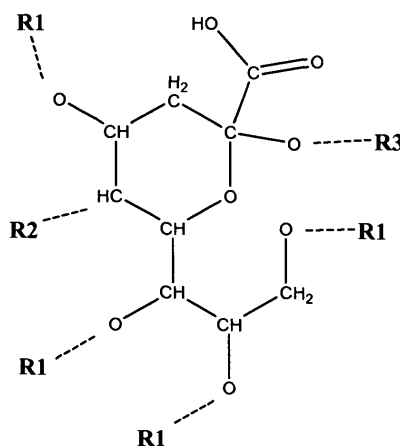
Por ejemplo, se puede utilizar uno de los métodos siguientes:

Método 1: Al cabo de 16 h de crecimiento a 37°C en un medio API (peptina 1%, extracto de almidón 0,5%, polisorbato 80 0,1%, citrato de amonio 0,2%, acetato sódico 0,5%, sulfato de magnesio 0,01%, sulfato de manganeso 0,005% y fosfato dipotásico 0,2%, glucosa 1%), las células se recogían y se lavaban en agua. Los ácidos siálicos se liberaban de las células por hidrólisis en ácido acético 2M a 80°C durante 3h. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se liofilizaba.

Método 2: Las células crecían en un medio API (ver antes) durante 16h a 37°C. A 1 litro del medio de fermentación se añadían 250g de ácido triclorico y se agitaba durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la centrifugación de las células, se añadía 1 litro de acetona al sobrenadante y se incubaba durante la noche a 4°C y se volvía a centrifugar. El precipitado se lavaba con un 50% de acetona y se resuspendía en agua. El pH se ajustaba a 7 y se centrifugaba de nuevo. El extracto se liofilizaba.

Método 3: Al cabo de 16 h de crecimiento a 37°C en un medio API (ver antes), las células bacterianas se lavaban dos veces con solución salina fría tamponada con fosfato (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4) y una vez con acetato de piridina 0,1M (pH5). Las bacterias se resuspendían en 0,1V de acetato de pirimidina precalentado (0,1M, pH 5) y se incubaban a 37°C durante 1h. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se liofilizaba.

Se puede utilizar cualquier ácido siálico con el objetivo de la presente invención. Sin embargo, se prefiere que el ácido siálico tenga la siguiente fórmula



R1= H, acetilo, lactilo, metilo, sulfato, fosfato, anhidro, ácido siálico, fucosa, glucosa o galactosa

R2= N-acetilo, N-glicolilo, amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo, o bien N-glicolil-O-metilo

R3= H, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico, o bien ácido N-glicolilneuramínico

R1 se puede elegir del grupo formado por H, acetilo, lactilo, metilo, sulfato, fosfato, ácido anhidrosiálico, fucosa, glucosa y/o galactosa.

R2 se puede elegir del grupo compuesto por N-acetilo, N-glicolilo, amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo y/o N-glicolil-O-metilo.

R3 se puede elegir del grupo compuesto por H, galactosa, N-acetilglucosima, N-acetilgalactosamina, ácido siálico y/o ácido n-glicolilneuramínico.

Los grupos en la posición R1 pueden ser idénticos o distintos unos de otros. Del mismo modo, los grupos en la posición R2 pueden ser idénticos o diferentes unos de otros al igual que los grupos en la posición R3.

En una configuración especialmente preferida de la presente invención, el ácido siálico es ácido N-acetilneuramínico con R1=H, R2=N-acetilo y R3=H.

La presente invención se refiere también a un producto alimenticio reforzado con ácido siálico que comprende bacterias aptas para los alimentos que producen ácido siálico de forma natural. El producto alimenticio reforzado con

ácido siálico puede tener las mismas propiedades que las descritas antes para el uso de la presente invención.

Un producto alimenticio se refuerza con ácido siálico, si el ácido siálico o las bacterias que producen ácido siálico se añaden al producto alimenticio. Por ejemplo, reforzando la cantidad de ácido siálico que puede estar presente de forma natural en el producto alimenticio se consigue un aumento del 10% en peso, preferiblemente de al menos un 50% en peso y más preferiblemente de al menos un 100% en peso.

El producto alimenticio de la presente invención se puede utilizar para aportar nutrición a un individuo, por ejemplo, para contrarrestar la falta de producción de ácido siálico endógeno. En particular en los organismos en crecimiento los requisitos de ácidos siálicos a menudo exceden la propia producción endógena de ácido siálico del organismo. De ahí que los productos con suplemento de ácido siálico ayuden al desarrollo de los individuos. Una ausencia de producción de ácido siálico endógeno se producirá en los individuos que ya no crezcan más.

Como consecuencia de ello, la materia de estudio o el tema a debatir en la presente invención es tanto para hombres como para animales, en particular animales de compañía, ganado. La materia de estudio de la presente invención no se limita en general a ningún grupo de edad en particular. Los productos alimenticios pueden ser administrados a madres durante el embarazo y la lactancia, para tratar los bebés. También se pueden administrar a niños, bebés, adultos o personas de edad. Sin embargo, se prefiere administrar los alimentos a niños.

El papel y el potencial del ácido siálico en la nutrición humana era resumido por Wang B y Brand-Miller, J. (2003) Eur. J. Clin. Nutr. Nov; 57(11): 1351-69.

Los actuales inventores han descubierto recientemente que la administración de productos alimenticios de la presente invención a un individuo conduce a una sialilación elevada en el cerebro, en particular en los individuos de edad. Esto se puede ver, por ejemplo, por una sialilación elevada de preparaciones de cerebro enriquecidas con gangliósidos (sialil-lactosilceramidas). La sialilación y especialmente los gangliósidos son factores importantes a la hora de estabilizar la integridad neuronal y de permitir la plasticidad neuronal en el sistema nervioso central y periférico.

También se ha averiguado que la administración de productos alimenticios de la presente invención, preferiblemente a las personas mayores, conduce a una sialilación elevada en el tracto gastrointestinal (GIT), en particular en la mucosa del colon distal y proximal. Aquí la modificación de la sialilación de la mucina afecta a las propiedades físico-químicas de la barrera mucosal. Adicionalmente, la sialilación debida a los glucolípidos aumentaba como puede verse por los elevados niveles de gangliósidos en el colon.

Además se observaba que la administración de productos alimenticios de la presente invención, preferiblemente para gente adulta, conduce a una sialilación elevada en el tracto gastrointestinal (GIT), en particular en la mucosa de colon distal y proximal. Aquí la modificación de la sialilación de mucina afecta a las propiedades físico-químicas de la barrera mucosal. Adicionalmente, la sialilación asociada a los glucolípidos se veía que aumentaba debido a los niveles elevados de gangliósidos en el colon.

Se observaba además que la administración de alimentos de la presente invención a un individuo conduce a una respuesta inmunológica mejorada mediada por las células. Al mismo tiempo, los niveles IL-2 en la estimulación in vitro de los esplenocitos por la lectina ConA aumentaban en los individuos que consumían los productos alimenticios de la presente invención en comparación con los individuos de control. Este efecto era más pronunciado en los bebés y niños que en la gente mayor.

Los productos alimenticios de la presente invención pueden ser utilizados como consecuencia de ello, para el tratamiento o la prevención de la neurodegeneración. en particular, en adultos. Pueden utilizarse también para mejorar el rendimiento cognitivo y/o respaldar el desarrollo del cerebro, en particular en los niños.

Otras aplicaciones de los productos alimenticios de la presente invención consisten en respaldar el sistema inmunitario, en particular mejorar la inmunidad y la función intestinal.

Las patologías clínicas que se pueden tratar o prevenir con los productos alimenticios de la presente invención incluyen, por ejemplo, una enfermedad inflamatoria del intestino, un síndrome inflamatorio intestinal, patologías degenerativas del sistema nervioso como la demencia o la enfermedad de Alzheimer, enfermedades inmunitarias autodestructivas postinfecciosas y/o la degradación de la neurona GIT.

Como consecuencia de ello, los productos alimenticios de la presente invención pueden promover, por ejemplo, el crecimiento y el envejecimiento sanos; respaldar el desarrollo del cerebro en bebés y niños; mejorar el funcionamiento cognitivo; prevenir o contrarrestar el deterioro y/o la neurodegeneración, por ejemplo, debido al envejecimiento, a una enfermedad o al estrés; respaldar la maduración inmunitaria y la homeostasis; aumentar la sialilación, por ejemplo, en personas mayores, aportando un NeuAc dietético para la protección inmunitaria; reducir inflamaciones de grado mínimo, mejorar la barrera intestinal; y/o suprimir las inflamaciones sistémicas.

Los productos alimenticios con un suplemento de ácido siálico de la presente invención pueden contribuir a unos

suministros o aportes óptimos de SiAc en el recién nacido, por ejemplo, en la leche materna o en los preparados para bebés; a un desarrollo óptimo del SNC; a restaurar un déficit de SiAc circunstancial, por ejemplo, durante el embarazo, la lactancia y/o en casos de desnutrición.

5 Los expertos en el tema entenderán que pueden combinar libremente todas las propiedades de la presente invención descritas, sin alejarse del objetivo de la invención. En particular, los rasgos descritos para los usos de la presente invención se pueden aplicar a productos alimenticios de la presente invención y viceversa.

Otras ventajas y características de la presente invención se deducen claramente de los ejemplos y figuras siguientes.

10 La figura 1 muestra cromatogramas de clorhidrato de 1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno (DMB): *L. plantarum* NCC2936(A); NCC2936 al que se ha añadido NeuAc y NeGc estándar(B); y NeuAc y NeuGc estándar(C).

Ejemplos:

METODOS

Cepas bacterianas y su producción

15 Las cepas bacterianas se obtenían de un Nestle Culture Collection (NCC) y crecían en un medio API (1% de peptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,1% de polisorbato 80, 0,2% de citrato de amonio, 0,5% de acetato sódico, 0,1% de sulfato de magnesio, 0,005% de sulfato de manganeso y 0,2% de fosfato dipotásico, 1% de glucosa). Después de un periodo de crecimiento de 16h a 30°C, se recogían las bacterias y se liofilizaban.

Detección de SiAc

20 Los SiAc se detectaban utilizando un método modificado de Jourdan y cols.(1971) J. Biol. Chem 246; 430-435. Brevemente, 10 µl de ácido periódico 0,04M se mezclaban con 50 µl de muestra o bien 50 µl de NeuAc estándar (0, 20, 40, 60 y 100 µg/ml) y se incubaban durante 35 minutos en un baño de hielo. 125 µl de la mezcla compuesta por 0,04 mg de CuSO₄ en 6 ml de HCl del 28% + 1 ml de resorcinol del 6% + 3 ml de H₂O se añadían e incubaban durante 5 minutos a 4°C. Las muestras se hervían durante 15 minutos y se dejaban enfriar. Se añadían 125 µl de tert-butanol del 95% y se incubaban durante 3 minutos a 37°C para estabilizar el color. Comparando la intensidad del color azul de las muestras con los modelos de diferentes concentraciones se efectuaba una evaluación visual.

Cuantificación de SiAc

30 Método de clorhidrato de 1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno (DMB): Una muestra bacteriana se disolvía en agua para obtener una concentración total de ácido siálico de aproximadamente 2 µg/ml. Una parte alícuota de 200 µl de esta solución se hidrolizaba añadiendo 200 µl de ácido fórmico (1,0M) y calentando a 80°C durante 2 horas para liberar todos los ácidos siálicos enlazados. Luego los ácidos siálicos se derivatizaban con clorhidrato de 1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno (DMB), un marcador fluorescente que es específico para los alfa-cetoácidos. La derivatización se llevaba a cabo añadiendo 200 µl de una solución de DMB (7,0 mM en ácido acético 1,4 M que contiene 2-mercaptoetanol 0,75 M e hidrosulfito sódico 18 mM) a una parte alícuota de 200 µl de la muestra hidrolizada. Luego se calentaba la mezcla a 80°C durante 50 minutos. Las muestras derivatizadas (5 µl) se inyectaban en una columna HPLC de fase reversa (Zorbax SB-Aq, 3,5 µm, 4,6x50 mm) y se eluían usando una fase móvil de agua/metanol/ácido acético (75/25/0,05_(v/v/v)) que fluía a 2,0 mL/min. EL eluyente de la columna se controlaba utilizando fluorescencia ($\lambda_{ex}=373$ nm, $\lambda_{em}=448$ nm). La cuantificación se realizaba preparando una curva de calibración de ácido siálico de concentración conocida y comparando las áreas máximas de la muestra con las de los modelos.

40 Identificación de NeuAc (análisis de CG-EM)

Los glucósidos de metilo se preparaban a partir de una cantidad pesada de muestra que se trataba con HCl 1M en metanol (25 gotas) a 80°C durante 15h. A ello seguía la re-N-acetilación con piridina (5 gotas) y anhídrido acético (5 gotas) en metanol (20 gotas) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras se per-O-trimetilsililaban mediante un tratamiento con Tri-Sil (10 gotas, Pierce) a 80°C (15 minutos). Estos procedimientos se llevaban a cabo tal como se ha descrito antes (Merkle, R.K. y I. Poppe (1994) Methods Enzymol. 230:1-15; York, W.A. y cols(1986)Methods Enzymol 118:3-40). El análisis de CG-EM de los metilglucósidos se efectuaba en una HP 5890 GC interconectada a una 5970 MSD, usando una columna DB-1 (30mx0,25 mm DI).

RESULTADOS

Detección de bacterias que producen SiAc

50 Las bacterias de la Nestle Culture Collection se cribaban para la producción de SiAc usando un método periódico. Las cepas siguientes se identificaban como eficiente particular en la producción de SiAc y se depositaban según el

tratado de Budapest.

| | | |
|----|---|----------------------------------|
| | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 121 | (número de depósito CNMC I-4020) |
| | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 2935 | (número de depósito CNMC I-4064) |
| | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 2934 | (número de depósito CNMC I-4025) |
| 5 | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 166 | (número de depósito CNMC I-4066) |
| | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 170 | (número de depósito CNMC I-4067) |
| | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 1393 | (número de depósito CNMC I-4022) |
| | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 1428 | (número de depósito CNMC I-4023) |
| | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 1511 | (número de depósito CNMC I-4024) |
| 10 | <i>Lactobacillus sakei</i> NCC 2937 | (número de depósito CNMC I-4065) |
| | <i>Lactobacillus plantarum</i> NCC 2936 | (número de depósito CNMC I-4026) |
| | <i>Lactobacillus plantarum</i> NCC 252 | (número de depósito CNMC I-4021) |

Identificación del tipo de SiAc

15 Los polvos secos de las cepas que producen SiAc se preparaban tal como se ha descrito en Material y Métodos. Los mismos polvos se analizaban usando dos métodos diferentes: DMB y CG-EM:

20 a) La figura 1 representa el cromatograma típico de las cepas analizadas (NCC 2936) que se producen usando el método DMB. Utilizando este método identificamos un pico que aparecía a prácticamente el mismo tiempo de retención que el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), pero que mostraba un ligero desplazamiento en el tiempo de retención. No se detectaba ningún pico visible próximo al ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). Dicha desviación puede producirse si la muestra contiene algo que se enlaza a la fase estacionaria de la columna. Dicho enlace reduce la interacción del analito con la fase estacionaria y por consiguiente el tiempo de retención cambia. Alternativamente, el SiAc podría verse modificado por un grupo químico adicional y, por lo tanto, muestra un tiempo de retención modificado.

25 Para comprobar si los picos presentaban alguna desviación debida a los compuestos perturbadores de la muestra, realizamos un experimento "spiking"(de enriquecimiento o adición). Una cantidad determinada de NeuAc estándar se añadía a una preparación de muestra y se efectuaba de nuevo el análisis por HPLC. El tiempo de retención del pico observado en la muestra enriquecida era mucho más próximo al del pico estándar de NeuAc, debido probablemente a un efecto de dilución. Solamente se detectaba un pico en la muestra enriquecida de NeuAc, lo que indicaba que el estándar añadido a la muestra coincide en posición con el pico de la muestra original. Por consiguiente llegamos a la conclusión de que representa muy probablemente el NeuAc y que el cambio del tiempo de retención observado inicialmente se debía a los compuestos perturbadores de la muestra y no a una modificación del NeuAc.

30 b) Una prueba adicional de que las bacterias producen NeuAc se obtenía en un análisis por GC-EM. Usando este método, se analizaba la composición de glucosilo de las muestras bacterianas (tabla 1). Como resultado de ello el SiAc presente en las muestras bacterianas resultaba ser NeuAc.

35 **Tabla 1:** Análisis de la composición de glucosilo de las muestras bacterianas

| Muestra | Residuo de glucosilo | Masa (μg) | % molar ¹ |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------|
| <i>L. sakei</i> NCC 2934 | Ribosa(Rib) | 4,0 | 4,3 |
| | Galactosa (Gal) | 23,2 | 20,7 |
| | Glucosa (Glc) | 42,8 | 38,3 |
| | N-acetilglucosamina(GlcNAc) | 40,2 | 36,0 |
| | ácido n-acetilneuramínico (NANA) | 1,5 | 0,7 |
| | | $\Sigma = 111,7$ | |
| <i>L. sakei</i> | Ribosa(Rib) | 1,8 | 6,4 |

| | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------|------|
| NCC 2935 | Galactosa (Gal) | 1,7 | 4,9 |
| | Glucosa (Glc) | 16,9 | 49,8 |
| | N-acetilglucosamina(GlcNAc) | 12,8 | 37,8 |
| | ácido n-acetilneuramínico (NANA) | 0,6 | 1,1 |
| | | $\Sigma = 33,8$ | |
| <i>L. sakei</i> NCC 2937 | Ribosa(Rib) | 1,8 | 6,2 |
| | Rhamnosa (Rha) | 4,7 | 14,6 |
| | Galactosa (Gal) | 1,4 | 4,1 |
| | Glucosa (Glc) | 9,7 | 27,3 |
| | N-acetilglucosamina(GlcNAc) | 16,4 | 46,4 |
| | ácido n-acetilneuramínico (NANA) | 0,6 | 1,4 |
| | $\Sigma = 34,6$ | | |
| <i>L. plantarum</i> NCC 2936 | Ribosa(Rib) | 3,9 | 5,3 |
| | Galactosa (Gal) | 5,9 | 6,8 |
| | Glucosa (Glc) | 56,4 | 64,8 |
| | N-acetilglucosamina(GlcNAc) | 18,2 | 21,0 |
| | ácido n-acetilneuramínico (NANA) | 2,3 | 2,1 |
| | $\Sigma = 86,7$ | | |

¹Los valores se expresan como porcentaje molar de carbohidratos totales.

Cuantificación de SiAc

5 La cuantificación de SiAc en las muestras bacterianas se efectuaba con el método DMB y el método del análisis periódico. El DMB es un método cuantitativo, mientras que el análisis periódico se utilizaba para el análisis semicuantitativo de las muestras. No era posible la cuantificación exacta utilizando el análisis periódico debido al intenso color de fondo que interfería en la lectura espectrofotométrica de los resultados. Los resultados de la cuantificación realizada en el mismo lote de bacterias se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Contenido de NeuAc en las muestras bacterianas

10

| Cepa | Método DMB | Análisis periódico |
|-----------------------------|------------|--------------------|
| <i>L. sakei</i> NCC2934 | 0,16 | 0,27 |
| <i>L. sakei</i> NCC2935 | 0,13 | 0,21 |
| <i>L. sakei</i> NCC2937 | 0,14 | 0,21 |
| <i>L. plantarum</i> NCC2936 | 0,16 | 0,21 |

El contenido de SiAc se expresa como porcentaje de materia seca bacteriana

REIVINDICACIONES

1. Utilización de bacterias para uso alimentario que producen ácido siálico de forma natural con el fin de reforzar un producto alimenticio con ácido siálico.

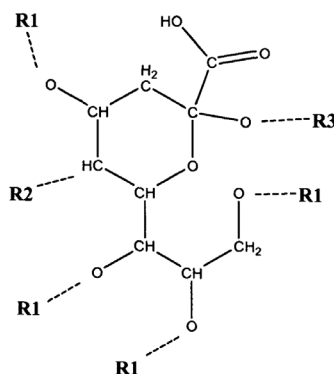
2. Utilización conforme a la reivindicación 1, donde las bacterias para uso alimentario que producen ácido siálico de forma natural pueden vivir, es decir que son capaces de producir ácido siálico en el organismo tras el consumo del producto alimenticio.

3. Utilización conforme a la reivindicación 1 ó 2, donde las bacterias o al menos una fracción de las mismas se utilizan en una cantidad suficiente para obtener en el producto alimenticio un aumento del contenido de ácido siálico del 0,05-2% en peso seco, preferiblemente del 0,4-1,5% de peso seco, más preferiblemente del 0,6-1% de peso seco.

4. Utilización conforme a las reivindicaciones 1-3, donde las bacterias se eligen del grupo compuesto por lactobacilos, en particular N-acetilneuraminato-liasa y/o N-acetilneuraminato-aldolasa que producen lactobacilos, y más preferiblemente *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* y/o *Lactobacillus salivarius*.

5. Utilización conforme a las reivindicaciones 1-4, donde las bacterias se eligen del grupo compuesto por *Lactobacillus sakei* NCC 121, *Lactobacillus sakei* NCC 2935, *Lactobacillus sakei* NCC 2934, *Lactobacillus sakei* NCC 166, *Lactobacillus sakei* NCC 170, *Lactobacillus sakei* NCC 1393, *Lactobacillus sakei* NCC 1428, *Lactobacillus sakei* NCC 1511, *Lactobacillus sakei* NCC 2937, *Lactobacillus plantarum* NCC 2936, *Lactobacillus plantarum* NCC 252 o mezclas de los mismos.

6. Utilización conforme a las reivindicaciones 1-5, donde el ácido siálico tiene la fórmula siguiente



R1= H, acetilo, lactilo, metilo, sulfato, fosfato, anhido, ácido siálico, fucosa, glucosa o galactosa

R2= N-acetilo, N-glicolilo, amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo, o bien N-glicolil-O-metilo

R3= H, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico, o bien ácido N-glicolilneuramínico

y preferiblemente ácido N-acetilneuramínico (R1=H, R2=N-acetilo, R3=H)

7. Utilización conforme a las reivindicaciones 1-6, donde el producto alimenticio se elige del grupo compuesto por productos alimenticios a base de leche, en particular leche, suero, yogur, queso, productos fermentados; fórmulas para bebe; papillas sólidas; fórmulas de seguimiento; bebidas para niños pequeños; zumos de frutas, mezclas al menos parcialmente solubles en forma de polvo como bebidas de malta, batidos de chocolate, cappuccino, café; chocolate; productos a base de cereales; dulces, galletas; gelatinas.

8. Producto alimenticio reforzado con ácido siálico que comprende bacterias para uso alimentario que producen ácido siálico de origen natural tal como se describe en las reivindicaciones 1-7.

9. Utilización de un producto alimenticio conforme a la reivindicación 8 para alimentar un individuo.

10. Producto alimenticio reforzado con ácido siálico de acuerdo con la reivindicación 8 que se utiliza para contrarrestar una falta de producción endógena de ácido siálico.

11. Producto alimenticio reforzado con ácido siálico de acuerdo con la reivindicación 8 que se utiliza en el tratamiento o la prevención de la neurodegeneración, en particular en adultos.

12. Producto alimenticio reforzado con ácido siálico de acuerdo con la reivindicación 8 que se utiliza para respaldar el sistema inmunitario, en particular para incrementar la inmunidad y/o mejorar la función intestinal.
13. Producto alimenticio reforzado con ácido siálico de acuerdo con la reivindicación 8 que se utiliza para mejorar el rendimiento cognitivo y/o apoyar el desarrollo del cerebro, en particular en niños.
- 5 14. Bacterias para uso alimentario que producen ácido siálico elegidas del grupo formado por *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* y/o *Lactobacillus salivarius*. Se obtienen resultados especialmente buenos con bacterias procedentes del grupo formado por *Lactobacillus sakei* NCC 121, *Lactobacillus sakei* NCC 2935, *Lactobacillus sakei* NCC 2934, *Lactobacillus sakei* NCC 166, *Lactobacillus sakei* NCC 170, *Lactobacillus sakei* NCC 1393, *Lactobacillus sakei* NCC 1428, *Lactobacillus sakei* NCC 1511, *Lactobacillus sakei* NCC 2937, *Lactobacillus plantarum* NCC 2936, *Lactobacillus plantarum* NCC 252.
- 10

Figura 1: Trazas de HPLC-fluorescencia de NCC2936(A); NCC2936 enriquecido con NeuAc y NeuGc estándar(B); y NeuAc y NeuGc estándar(C)

