

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 246**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2005 E 16155521 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 3050960**

54 Título: **Probióticos metabólicamente activos**

30 Prioridad:

27.09.2004 GB 0421448

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**MULTIGERM UK ENTERPRISES LTD. (100.0%)
Sandy Farm Business Centre The Sands
Farnham
Surrey GU10 1PX, GB**

72 Inventor/es:

THURLBY, TIMOTHY

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 654 246 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

Probióticos metabólicamente activos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una preparación de bacterias metabólicamente activas, a composiciones que comprenden dicha preparación, por ejemplo, suplementos probióticos o alimento para animales, y a sus usos, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades. La invención se refiere también a un sustrato de crecimiento para microorganismos que comprende una mezcla de azúcares simples y complejos y a un proceso para la fabricación de preparaciones de microorganismos metabólicamente activos usando este sustrato de crecimiento.

Antecedentes de la invención

15 Los organismos microbiológicos se usan frecuentemente como suplementos alimenticios. Un ejemplo son las bacterias probióticas, que se sabe que tienen efectos beneficiosos sobre la microflora intestinal aumentando la resistencia a enfermedades infecciosas tales como la diarrea. Los probióticos también han mostrado estar implicados en la modificación de la química de la sangre y en la inmunomodulación (véanse las referencias citadas en el apartado de Beneficios potenciales para la salud en la sección de referencias).

20 Las bacterias probióticas se pueden encontrar en productos lácteos tales como yogur y las especies conocidas por tener beneficios para la salud incluyen las de los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Sin embargo, los productos lácteos probióticos tienen una vida media corta. Los probióticos también están disponibles para el consumidor en la forma de polvos o comprimidos. Una aplicación adicional de los probióticos se refiere al uso en alimentación animal.

25 Los métodos actuales para almacenar cultivos bacterianos usan normalmente la liofilización, denominada también criodesecación. En este proceso, se elimina el agua del organismo mediante sublimación y el organismo se puede revivir tras la adición de agua. Sin embargo, las bacterias criodesecadas no son metabólicamente activas y se sabe bien que los productos criodesecados pierden normalmente mucho de su resiliencia tras unas pocas semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (Fonseca y col. y Murga y col).

30 Además, muchos probióticos comerciales no parecen contener todas las especies mencionadas en las etiquetas y, cuando las bacterias están presentes, las cantidades de bacterias viables son a menudo muy bajas (J. Hamilton-Miller).

35 Los presentes inventores han determinado ahora que pueden prepararse preparaciones estables de bacterias viables metabólicamente activas mediante el uso de un sustrato de crecimiento concreto que contiene cantidades equilibradas de hidratos de carbono complejos y simples. En contraste con los probióticos de la técnica anterior, las preparaciones proporcionadas de acuerdo con la presente invención comprenden cantidades elevadas de bacterias estables y activas que se pueden mantener durante un almacenamiento a largo plazo.

Descripción de la invención

45 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una preparación que comprende bacterias acidolácticas viables metabólicamente activas y un sustrato de crecimiento que comprende una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, y monosacáridos y disacáridos, proteínas y péptidos, donde la bacteria en la preparación presenta un estado de crecimiento casi en equilibrio caracterizado por que la población de bacterias se mantiene en el intervalo de 10^8 a 10^9 células viables por mililitro cuando se almacena a aproximadamente 4 °C y a pH controlado en el intervalo de 3,8-4,5 durante un periodo de al menos 5 meses, donde la cantidad total de azúcares está en el intervalo de entre 20 mg/ml a 40 mg/ml y donde la cantidad total de azúcares reductores está en el intervalo de entre 5 mg/ml a 20 mg/ml cuando se mide utilizando el método de Nelson-Somogyi, y donde las bacterias acidolácticas comprenden *Lactobacillus plantarum*, preparación que comprende bacterias metabólicamente activas y un sustrato de crecimiento que comprende una mezcla de carbohidratos simples y complejos, donde las bacterias presentan un estado de crecimiento en equilibrio caracterizado por que la población de bacterias se mantiene a un nivel constante cuando se almacena a aproximadamente 4 °C durante un periodo de al menos 5 meses.

60 Como se usa en el presente documento, las expresiones "hidratos de carbono complejos" o "azúcares complejos" incluyen oligosacáridos y polisacáridos, mientras que las expresiones "hidratos de carbono simples" o "azúcares simples" incluyen monosacáridos y disacáridos.

En una realización preferida, la concentración de azúcares totales es de aproximadamente de 30 mg/ml y la concentración de azúcares reductores es de aproximadamente de 10 mg/ml.

65 Normalmente, la cantidad total de proteínas y péptidos presentes en el sustrato está en el intervalo de 1 mg/ml a 2 mg/ml y la cantidad total de péptidos de alto peso molecular (peso molecular mayor de 5000 daltons) está en el

intervalo de 100 µg/ml a 300 µg/ml. En una realización específica, la concentración de proteínas y péptidos puede ser de aproximadamente 2 mg/ml y la concentración de péptidos de alto peso molecular puede ser de aproximadamente 250 µg/ml.

- 5 El sustrato de crecimiento puede incluir componentes adicionales tales como, por ejemplo, celulosa, almidón, β-glucanos, pentosanos, polifenoles, ácidos ribonucleicos, lípidos, fosfatos, flavonoides, aminoácidos, vitaminas (B₁, B₂, C y E), silicatos y elementos traza.

10 En una realización preferida, el sustrato de crecimiento se deriva de granos de cereales malteados. Lo más preferiblemente, el sustrato de crecimiento se prepara utilizando el proceso descrito más adelante en el presente documento.

15 La invención presenta una ventaja sobre las preparaciones probióticas actuales ya que las bacterias metabólicamente activas se pueden almacenar durante muchos meses sin deterioro o pérdida de actividad. Las preparaciones de bacterias criodesecadas que se usan actualmente de manera normal contienen pocas, si acaso, bacterias metabólicamente activas. Además, las preparaciones de bacterias criodesecadas pierden algunas de sus características y la actividad tras la rehidratación. También, las bacterias reactivadas tienen una vida media corta y solamente se pueden mantener en almacenamiento durante un tiempo corto. Las bacterias criodesecadas frecuentemente no se rehidratan antes de su uso en un hospedador animal. Si se rehidratan, generalmente deben
20 utilizarse en el mismo día; de lo contrario, pueden perder rápidamente su viabilidad y se deterioran por organismos contaminantes.

25 Un problema adicional con las preparaciones criodesecadas de la técnica anterior es que son higroscópicas (atraen la humedad del aire) y, por tanto, un envase ha de utilizarse en un plazo de pocos días tras la apertura, de otra forma, la hidratación parcial produciría una rápida pérdida de la viabilidad.

30 La preparación de acuerdo con la invención evita los anteriores problemas relacionados asociados con el uso de cultivos bacterianos criodesecados. Además, los inventores también han demostrado que los cultivos bacterianos preparados de acuerdo con la invención son significativamente más robustos que las bacterias preparadas mediante los métodos conocidos en la técnica anterior, lo que permite a las bacterias establecerse más rápidamente en animales hospedadores y tolerar el ambiente difícil del tracto digestivo de los mamíferos (ilustrado en el ejemplo 5).

35 Los inventores han superado los problemas de las preparaciones convencionalmente usadas utilizando un sustrato de crecimiento con el suministro de nutrientes equilibrado en la forma de azúcares, proteínas y péptidos complejos y simples, junto con un pH controlado y almacenamiento en frío. En estas condiciones, se produce un crecimiento lento continuo de bacterias en la preparación. La combinación de temperatura, pH, crecimiento en fases y sustrato impone un estado de crecimiento próximo al equilibrio, por el cual se pueden mantener altas concentraciones de bacterias viables metabólicamente activas durante periodos de al menos 5 meses.

40 El pH de la preparación cuando se almacena se mantiene en el intervalo de 3,8 a 4,5. En una realización específica, el pH de la preparación se mantiene a aproximadamente 4,0 durante el almacenamiento. El pH de la preparación puede controlarse convenientemente mediante la adición de un tampón adecuado o una combinación de agentes tamponantes. Los tampones preferidos incluyen, por ejemplo, tampones de citrato trisódico o fosfato. El uso de
45 tampones, tales como citrato trisódico o fosfato, se describe en los métodos normalizados en la técnica.

Las bacterias de la preparación son bacterias acidolácticas. La expresión "bacteria acidoláctica (LAB)" como se usa en el presente documento, describe un grupo de bacterias anaerobias no motiles, catalasa negativas, Gram
50 positivas. Este grupo incluye los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, y *Enterococcus*.

La bacteria acidoláctica de la preparación comprende *Lactobacillus plantarum*. En una realización preferida, se usa una combinación de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*.

La preparación puede comprender adicionalmente un agente antifúngico, tal como por ejemplo, sorbato de potasio esterilizado y/o un antioxidante, tal como vitamina C.

55 También se proporciona un sustrato de crecimiento para microorganismos (especialmente bacterias) que comprende una mezcla compleja de hidratos de carbono. El sustrato de crecimiento comprende una mezcla de azúcares simples y complejos, incluyendo monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros de azúcares.

60 Las características preferidas del sustrato de crecimiento son sustancialmente como se ha descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. De esta manera, la cantidad total de hidratos de carbono (azúcares simples sumados a los complejos) presentes en el sustrato de crecimiento está preferentemente en el intervalo de 20 mg/ml a 40 mg/ml, más preferentemente en el intervalo de 25 mg/ml a 35 mg/ml y lo más preferible aproximadamente 30 mg/ml. De este contenido de hidratos de carbono totales (azúcares), la cantidad total de
65 azúcares reductores (monosacáridos) está preferentemente en el intervalo de 5 mg/ml a 20 mg/ml, más preferentemente de 5 mg/ml a 15 mg/ml, y lo más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml.

Aunque los hidratos de carbono simples y complejos son el componente clave del sustrato de crecimiento, se apreciará que el sustrato de crecimiento puede contener también componentes adicionales, tales como proteínas que proporcionan nitrógeno para el crecimiento bacteriano. De acuerdo con ello, el sustrato de crecimiento comprende preferiblemente una cantidad total de proteínas y péptidos en el intervalo de 1 mg/ml a 2 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 2 mg/ml. De este contenido total de proteínas/péptidos, la cantidad total de péptidos de alto peso molecular (peso molecular mayor que 5000 daltons) puede estar en el intervalo de 100 µg/ml a 300 µg/ml, y normalmente de aproximadamente 250 µg/ml. La identidad precisa (por ejemplo, secuencia de aminoácidos) de los componentes de proteínas y péptidos en el sustrato de crecimiento no es generalmente un tema.

El sustrato de crecimiento puede incluir componentes adicionales tales como, por ejemplo, celulosa, almidón, β-glucanos, pentosanos, polifenoles, ácidos ribonucleicos, lípidos, fosfatos, flavonoides, aminoácidos, vitaminas (B₁, B₂, C y E), silicatos y elementos traza. La identidad precisa y las cantidades relativas de estos componentes adicionales en el sustrato no son particularmente limitantes. Si como se prefiere, el sustrato de crecimiento se deriva de una fuente vegetal natural, por ejemplo, granos de cereales malteados, estos componentes adicionales serán normalmente biomoléculas naturales.

El sustrato de crecimiento puede contener diversos aditivos tales como agentes tamponantes y otras sustancias diseñadas para mejorar el comportamiento del sustrato y/o la vida media extendida. Dichos aditivos pueden incluir, por ejemplo, agentes antifúngicos, antioxidantes, etc.

El sustrato de crecimiento puede contener materia particulada, por ejemplo, partículas que no exceden de 1 mm de diámetro.

El sustrato de crecimiento puede prepararse a partir de granos de cereales malteados usando el proceso de fabricación descrito a partir de ahora en el siguiente documento. Los sustratos de crecimiento que presenten propiedades sustancialmente similares pueden prepararse sintéticamente, por ejemplo, mezclando entre sí la mezcla requerida de hidratos de carbono simples y complejos junto con cualquiera de los componentes adicionales relacionados anteriormente.

También se proporciona un método para preparar un sustrato de crecimiento para microorganismos que comprende:

someter los cereales malteados a una etapa de maceración donde los cereales malteados se mezclan con líquido acuoso y se someten a condiciones de tiempo y temperatura que limitan la extensión de la conversión de hidratos de carbono complejos a simples de tal manera que se obtenga una mezcla de hidratos de carbono simples y complejos, proteínas y péptidos, y

separar la mezcla de hidratos de carbono simples y complejos, proteínas y péptidos de los cereales malteados agotados para obtener un sustrato de crecimiento.

Los términos "cereal malteado" o "malta" como se usa en el presente documento se refieren al producto de un proceso de malteado aplicado a los granos de cereales. El malteado es un proceso bien conocido en la técnica de la fabricación de cerveza.

En un proceso de malteado típico, los granos de cereales se hacen germinar para inducir la movilización de los nutrientes almacenados. Las semillas en germinación producen numerosas enzimas para movilizar las proteínas y los hidratos de carbono almacenados, incluyendo las α-amilasas, que hidrolizan el almidón a maltosa. El método puede estar relacionado con el uso de cebada, pero se pueden usar otros cereales, tales como arroz, trigo, almidón y avena. El proceso de germinación es generalmente bien conocido. Se apreciará que el método puede llevarse a cabo proporcionando granos malteados o un sustrato sintético que comprende una mezcla de hidratos de carbono, proteínas y enzimas.

Preferentemente, los granos malteados se laminan antes del procesamiento adicional. El agrietamiento de los granos debido al laminado facilita el acceso del agua y la extracción de nutrientes durante la etapa de maceración, a la vez que se evita que el aplastamiento de los granos ayude en la posterior separación del sustrato de crecimiento de los granos malteados gastados.

La malta preparada se somete a una etapa de maceración que se asemeja a la etapa de maceración utilizada en los métodos para la fabricación de cerveza (véase, por ejemplo, Kunze, W. Technology Brewing and Malting (1996)). El término "maceración" se conoce bien en el campo de la fabricación de cerveza y se refiere a un proceso donde los granos malteados se agitan en presencia de agua calentada a temperaturas definidas a fin de preparar la malta. Durante la etapa de maceración los hidratos de carbono complejos de los granos malteados se descomponen en maltosa.

El método implica también una etapa de maceración donde los granos de cereales malteados se mezclan con un líquido acuoso (normalmente agua) y la mezcla se calienta a diversas temperaturas definidas. Esta etapa de

maceración, sin embargo, no conforma un proceso de maceración típico de la fabricación de cerveza. El objetivo de los cerveceros es convertir tanto hidrato de carbono como sea posible en azúcares simples para la posterior fermentación alcohólica. En contraste, las condiciones de la etapa de maceración en el presente proceso se seleccionan específicamente para limitar la extensión de la conversión en azúcares simples (reductores), dejando cantidades significativas de hidratos de carbono en formas oligoméricas y poliméricas más complejas.

La extensión de la conversión de hidratos de carbonos puede limitarse de tal manera que la cantidad de azúcares simples (reductores) presente en el sustrato de crecimiento resultante, expresada como porcentaje (p/p) del contenido total de hidratos de carbono, está en el intervalo de 10 % (p/p) a 50 % (p/p).

La conversión limitada deseada de azúcares complejos en simples puede conseguirse aumentando la temperatura de la etapa de maceración durante un corto periodo de tiempo, normalmente de 30 minutos, sin dejar que la mezcla de granos malteados/agua repose a temperaturas intermedias. Los procesos de fabricación de cerveza tradicionales incluyen periodos de reposo a 60-65 °C y 70-74 °C ya que esto permite a las enzimas producir altas concentraciones de azúcares simples (principalmente maltosa). De acuerdo con ello, la etapa de maceración puede no comprender periodos de reposo a temperaturas en el intervalo de entre 60 °C a 65 °C y/o a temperaturas en el intervalo de entre 70 °C a 74 °C.

La etapa de maceración puede comprender mezclar el cereal malteado con agua a una temperatura en el intervalo de 30 °C a 45 °C, reposo de la mezcla de 1 a 2 horas, aumento de la temperatura a una temperatura en el intervalo de 75 °C a 85 °C durante un periodo de tiempo en el intervalo de 20 a 40 minutos, preferentemente de 30 minutos, y a continuación reposo de la mezcla a una temperatura en el intervalo de 75 °C a 85 °C durante un periodo de tiempo en el intervalo de 60 a 90 minutos. A mayores temperaturas, las enzimas presentes en la mezcla se inactivan y se pueden extraer los nutrientes. Se prefieren generalmente temperaturas superiores, en el intervalo de 76 °C a 80 °C y específicamente 78 °C. La temperatura en esta etapa debe ser lo suficientemente alta para inactivar durante un plazo de tiempo largo todas las enzimas presentes en la preparación. Se apreciará que la temperatura y los tiempos precisos utilizados pueden variar algo de acuerdo con el tipo de cereal utilizado.

El proceso descrito en el presente documento limita específicamente la cantidad de conversión de los azúcares complejos en azúcares simples. Además, el reposo inicial a una temperatura en el intervalo de entre 30 °C a 45 °C proporciona una ventaja adicional ya que maximiza la liberación de aminoácidos y péptidos. Se prefieren generalmente las temperaturas hacia el extremo superior de este intervalo, es decir, entre 40 °C y 45 °C o de forma específica 45 °C. El objetivo de esta etapa es hidrolizar las proteínas almacenadas presentes en los granos de cereales a aminoácidos y péptidos disponibles. La combinación óptima del tiempo y la temperatura para conseguir la hidrólisis deseada puede variar algo dependiendo del tipo de granos utilizados.

La presencia de altas concentraciones de proteínas, péptidos y aminoácidos es deseable en un sustrato de crecimiento que se vaya a usar para soportar el crecimiento de microorganismos, ya que estos proporcionan una fuente útil de nitrógeno. Los procesos de maceración típicos utilizados en la fabricación de cerveza tradicional no incluirían generalmente un reposo a una temperatura en este intervalo, ya que los cerveceros no buscan conseguir un contenido elevado de proteínas o aminoácidos en un mosto previsto para su fermentación para producir alcohol.

Cuando se completa la etapa de maceración, por ejemplo, se han extraído todos los nutrientes deseados de los granos malteados ahora "agotados", la mezcla resultante que comprende hidratos de carbono simples y complejos, proteínas y péptidos puede separarse de los granos agotados para obtener un sustrato de crecimiento usando cualquier medio adecuado. Normalmente, esto implicará una filtración gruesa, utilizando, por ejemplo, un filtro de 1 mm tal como una cesta de alambre de cuña, dando como resultado una solución que contiene partículas gruesas. Es una característica del proceso que el sustrato de crecimiento no está clarificado, como sería generalmente el caso de un mosto preparado en un proceso normal de fabricación de cerveza. En la fabricación de cerveza tradicional, el mosto se suele clarificar para eliminar todas las partículas gruesas, produciendo de esta forma un líquido transparente.

La presencia de cierta materia particulada en un sustrato de crecimiento preparado de acuerdo con el proceso es ventajosa con respecto al uso posterior como soporte del crecimiento de las bacterias, ya que proporciona una liberación lenta de los nutrientes y superficies particuladas para la adhesión de cultivos bacterianos.

Si se necesita, el sustrato de crecimiento preparado de acuerdo con el método descrito se puede esterilizar antes del uso posterior. Como se apreciará, esto se puede llevar a cabo mediante ebullición durante aproximadamente una hora o mediante autoclavado a 120 °C durante aproximadamente 20 minutos.

Si se necesita, se puede añadir un tampón, o varios componentes tamponantes al sustrato de crecimiento, por ejemplo, si el sustrato de crecimiento se va a usar posteriormente en la fabricación de una preparación bacteriana de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Los tampones preferidos son como se relaciona con respecto al primer aspecto de la invención. Si el sustrato de crecimiento se va a esterilizar, el(los) tampón(ones) se puede(n) añadir antes de, durante o después de la esterilización, según sea conveniente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere también a un método para preparar una preparación de bacterias acidolácticas metabólicamente activas y estables que comprende:

5 hacer crecer bacterias acidolácticas en un sustrato de crecimiento que comprende una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, y monosacáridos y disacáridos, proteínas y péptidos para obtener una preparación de bacterias acidolácticas en donde la cantidad total de azúcares en el sustrato de crecimiento está comprendida en el intervalo de 20 mg/ml a 40 mg/ml y en donde la cantidad total de azúcares reductores en el sustrato de crecimiento está comprendida en el intervalo de 5 mg/ml a 20 mg/ml cuando se mide usando el método de Nelson-Somogyi, y

10 enfriar la preparación resultante a aproximadamente 4 °C, donde las bacterias acidolácticas adoptan un estado de crecimiento próximo al equilibrio caracterizado por que la población de bacterias acidolácticas en la preparación se puede mantener en el intervalo de 10^8 a 10^9 células viables por mililitro cuando se almacena a aproximadamente 4 °C y a pH controlado en un intervalo de 3,8 a 4,5 durante un periodo de al menos 5 meses, donde la bacteria acidoláctica comprende *Lactobacillus plantarum*, y opcionalmente, almacenar la preparación a aproximadamente 4 °C.

20 Se apreciará, sin embargo, que el número preciso de células viables en el estado próximo al equilibrio puede variar algo dependiendo de las especies de bacterias utilizadas.

25 El método de acuerdo con este aspecto de la invención implica una "Etapa de crecimiento" donde las bacterias acidolácticas se hacen crecer en un sustrato de crecimiento hasta que alcanzan una concentración que permite que se consiga el estado próximo al equilibrio durante un posterior almacenamiento. Es una característica importante del método que el sustrato de crecimiento utilizado proporcione un suministro de nutrientes equilibrado que contiene una mezcla de azúcares simples y complejos donde una elevada proporción del contenido de hidratos de carbono está en la forma de azúcares complejos que los microorganismos pueden usar como fuente de energía. Esta mezcla ayuda a limitar inmediatamente la energía disponible durante la etapa de crecimiento. La composición y las características preferidas del sustrato de crecimiento es/son preferentemente como se ha descrito anteriormente en relación con el primer y el segundo aspectos de la invención. El sustrato de crecimiento se prepara preferentemente a partir de granos de cereales malteados usando el método de fabricación descrito en el siguiente documento. Se apreciará, sin embargo, que no es estrictamente necesario usar el sustrato de crecimiento preparado de acuerdo con este método. Se pueden conseguir resultados similares utilizando sustrato de crecimiento preparado sintéticamente mezclando las proporciones requeridas de hidratos de carbono simples y complejos, proteínas y péptidos.

35 La etapa de crecimiento debe llevarse a cabo de tal manera que se tenga cuidado en no hacer crecer los microorganismos durante demasiado tiempo, para evitar producir condiciones ácidas que inhibirían de otra manera el crecimiento adicional así como limitando el periodo de almacenamiento de la preparación resultante. Por otra parte, si la etapa de crecimiento se termina prematuramente, limitará la producción de la biomasa. El pH de la preparación durante el crecimiento de los microorganismos se puede usar como un indicador del estado próximo al equilibrio. En una realización típica, los cultivos de bacterias acidolácticas pueden hacerse crecer hasta que se alcanza un pH de 4,5 +/-0,3 unidades.

45 Se apreciará que el pH del sustrato de crecimiento puede variar algo dependiendo del intervalo de pH óptimo para el microorganismo (por ejemplo, bacterias) utilizado. En una realización típica (adecuada para las bacterias acidolácticas) el pH debe mantenerse en el intervalo de 3,8 a 4,5 durante el almacenamiento. Preferentemente, los tampones, tales como citrato trisódico o fosfatos, se añaden al sustrato de crecimiento para controlar el pH durante el crecimiento de los microorganismos y el almacenamiento posterior.

50 Se apreciará que la temporización exacta de la etapa de crecimiento de los microorganismos (por ejemplo, bacterias) en un estado próximo al equilibrio depende de las especies utilizadas. El crecimiento de los microorganismos se puede llevar a cabo en cualquier equipo de cultivo adecuado. En realizaciones específicas, la etapa de crecimiento puede llevarse a cabo por medio de fermentación en un fermentador.

55 Si especies como *Enterococcus* o *Lactobacillus* se hicieran crecer dichas especies utilizando medios de crecimiento "convencionales" consistentes en última instancia en azúcares simples, el suministro de energía en exceso conduciría a la producción de ácido en exceso por las bacterias acidolácticas, lo que limitaría la producción de biomasa y la vida media del cultivo resultante. Por el contrario, la mezcla compleja de azúcares presentes en el sustrato de crecimiento utilizado en el método de la invención suministra energía para el crecimiento durante la etapa inicial del crecimiento y también para el mantenimiento durante el almacenamiento del producto.

60 De acuerdo con la invención, la etapa de crecimiento puede llevarse a cabo utilizando especies individuales de bacterias. En una realización preferida de la invención pueden hacerse crecer de manera independiente dos o más especies bacterianas (microorganismos) diferentes en medios de crecimiento separados y a continuación mezclarse entre sí antes o después de la etapa de enfriado. Los sustratos de crecimiento utilizados para el cultivo independiente de dos o más especies bacterianas diferentes pueden tener la misma composición, o ser de

composición diferente. De esta manera, es posible optimizar las condiciones de crecimiento para cultivos de especies bacterianas individuales y, a continuación, combinar los cultivos entre sí para su almacenamiento en condiciones que permitan el mantenimiento del crecimiento en equilibrio de cada una de las especies individuales en el cultivo.

5 En otras realizaciones del método, se pueden hacer crecer dos o más especies bacterianas (u otros microorganismos) diferentes en un solo cultivo con el mismo sustrato de crecimiento, con la condición de que sus tasas de crecimiento sean comparables, de forma que una especie no domine la población. Tras la etapa de crecimiento, la preparación puede analizarse por métodos normalizados para determinar la pureza microbiológica y el recuento de microorganismos. Es también posible hacer crecer dos o más combinaciones diferentes de microorganismos (por ejemplo, bacterias) juntas en sustratos de crecimiento separados y a continuación combinar los cultivos entre sí en un producto final. Un cultivo combinado podría mezclarse de forma similar con un cultivo de una única especie bacteriana.

15 Los cultivos iniciadores de la etapa de crecimiento del método incluyen, por ejemplo, bacterias criodesecadas o cultivos líquidos.

20 Se apreciará que la preparación de microorganismos preparados usando el método de la invención puede utilizarse inmediatamente después de la etapa de enfriado, pero más normalmente, la preparación se almacenará antes del uso. La temperatura óptima para el almacenamiento a fin de mantener el estado de crecimiento próximo al equilibrio en el cultivo es aproximadamente de 4 °C, pero el lector experto apreciará que la temperatura de almacenamiento puede variar algo. Por conveniencia, se pueden dispensar alícuotas del cultivo próximo al equilibrio producido mediante el método en un envase estéril adecuado antes del almacenamiento a largo plazo.

25 Es una ventaja clave del método de la invención que los cultivos próximos al equilibrio producidos mantienen la viabilidad y la integridad cuando se almacenan durante periodos extendidos, normalmente durante al menos 5 meses. Sin embargo, se apreciará que no es esencial para el método que los cultivos deban almacenarse *realmente* durante al menos 5 meses antes del uso.

30 Para evitar el crecimiento de hongos o levaduras, se puede añadir un agente antifúngico, tal como sorbato de potasio estéril, antes del almacenamiento. Los agentes antifúngicos son principalmente para prevenir el deterioro por levaduras u hongos durante el uso por los usuarios finales, una vez que se ha abierto un recipiente del producto. Además, se puede añadir un antioxidante, por ejemplo, vitamina C para ayudar a prevenir el deterioro del producto durante el almacenamiento. Se apreciará que se pueden usar otros agentes bien conocidos en la materia como agentes antifúngicos o antioxidantes.

En un aspecto adicional, la invención se refiere también a un método para preparar una preparación de bacterias acidolácticas metabólicamente activas y estables que comprende:

40 añadir bacterias acidolácticas a un sustrato de crecimiento que comprende una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, y monosacáridos y disacáridos, proteínas y péptidos para la preparación de microorganismos, en donde la cantidad total de azúcares en el sustrato de crecimiento está comprendida en el intervalo de 20 mg/ml a 40 mg/ml y en donde la cantidad total de azúcares reductores en el sustrato de crecimiento está comprendida en el intervalo de 5 mg/ml a 20 mg/ml cuando se mide usando el método de Nelson-Somogyi, y en donde las bacterias acidolácticas se añaden al sustrato de crecimiento a una concentración que proporciona un estado de crecimiento próximo al equilibrio caracterizado por que la población de bacterias acidolácticas en la preparación se puede mantener en el intervalo de 10^8 a 10^9 células viables por mililitro cuando se almacena a aproximadamente 4 °C y a pH controlado en un intervalo de 3,8 a 4,5 durante un periodo de al menos 5 meses, donde la bacteria acidoláctica comprende *Lactobacillus plantarum*, y opcionalmente, almacenar la preparación a aproximadamente 4 °C.

Otras especies bacterianas preferidas adicionales son como se ha relacionado anteriormente con respecto al método que requiere una etapa de crecimiento activo.

55 Este método no requiere que las bacterias acidolácticas crezcan en el sustrato de crecimiento antes de que se impongan las condiciones para el crecimiento próximo al equilibrio. En su lugar, el sustrato de crecimiento se inocula con cultivo(s) iniciador(es) de bacterias a una concentración que permita el mantenimiento del estado de equilibrio cuando la preparación resultante se almacena a 4 °C y a un pH controlado durante un periodo de al menos 5 meses. Los cultivos iniciadores para el método incluyen, por ejemplo, bacterias criodesecadas o cultivos líquidos. El sustrato de crecimiento puede inocularse con más de una especie bacteriana. Preferentemente, la concentración de células viables en el cultivo iniciador supera 10^8 células viables por mililitro.

65 El estado próximo al equilibrio se consigue de nuevo mediante la combinación de nutrientes en el sustrato de crecimiento, la temperatura, el pH y el crecimiento en fases. En el estado próximo al equilibrio, que se puede mantener durante un periodo de al menos 5 meses, la población de bacterias metabólicamente activas se mantiene a un nivel constante en el intervalo de 10^8 a 10^9 células viables por mililitro. Se apreciará de nuevo que el número

preciso de células viables en el estado próximo al equilibrio puede variar algo dependiendo de las especies de bacterias utilizadas. Se apreciará también que la concentración exacta del cultivo iniciador y el pH del sustrato de crecimiento pueden variar dependiendo de las especies de bacterias utilizadas.

5 Las características descritas como preferidas con respecto a los cultivos próximos al equilibrio producidos utilizando el método que requiere una etapa de crecimiento se aplican *mutatis mutandis* a los cultivos próximos al equilibrio conseguidos utilizando este método. De esta manera, en una realización preferida, el pH del cultivo próximo al equilibrio se mantiene en el intervalo de 3,8 a 4,5 durante el almacenamiento. Preferentemente, los tampones, tales como citrato trisódico o fosfatos, se usan para controlar el pH durante el almacenamiento.

10 Las características preferidas del sustrato de crecimiento usado en este método son como se ha descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. De nuevo, se prefiere, pero no es esencial, que el sustrato de crecimiento se prepare a partir de granos de cereales malteados utilizando el proceso descrito en el presente documento.

15 Usos de la preparación de bacterias metabólicamente activas

20 Son bien conocidos los beneficios para la salud de los probióticos (véase, por ejemplo, Marteau, P. y Rambaud, J-C, (1996) 'Therapeutic applications of probiotics in humans' en Leeds, A. R. y Rowland, I. R. (eds.) Gut flora and health - past, present and future, Royal Society of Medicine Press Limited, Londres; Stark, B. A. y Wilkinson, (eds.) (1989) Probiotics. Theory and Applications). Los probióticos han mostrado ser útiles en el tratamiento de la diarrea y el estreñimiento, síndrome del intestino irritable, tratamiento y prevención del cáncer y otras enfermedades que afectan la microflora intestinal.

25 Las preparaciones bacterianas proporcionadas por la invención encuentran por tanto utilidades concretas en el tratamiento o la prevención de enfermedades que afectan a la flora intestinal microbiana y, de forma más general, utilidad para ayudar a mantener la flora microbiana sana.

30 De esta manera, en un aspecto adicional, la invención proporciona una preparación de bacterias metabólicamente activas y estables de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso como medicamento.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una preparación de bacterias metabólicamente activas y estables de acuerdo con el primer aspecto en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno que afecta el equilibrio microbiano intestinal de un sujeto humano, opcionalmente, donde el trastorno que afecta el equilibrio microbiano intestinal es la enfermedad crónica inflamatoria del intestino, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn.

40 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una preparación de bacterias metabólicamente activas y estables de acuerdo con el primer aspecto en la fabricación de un medicamento para su uso en el mantenimiento del equilibrio microbiano intestinal de un sujeto humano

45 También se proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno que afecta el equilibrio microbiano intestinal de un paciente humano o animal que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una preparación de bacterias metabólicamente activas y estables de acuerdo con la invención.

50 En particular, la invención se refiere al tratamiento o la prevención de la enfermedad crónica inflamatoria del intestino, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn. Además, los cultivos bacterianos de acuerdo con la invención pueden administrarse a pacientes humanos o a otros pacientes animales (por ejemplo, mamíferos o aves) para el mantenimiento general de una flora microbiana sana, en lugar de para el tratamiento de una enfermedad específica.

55 Se pueden usar las preparaciones bacterianas como tales, por ejemplo, como suplementos probióticos, o se pueden premezclar con componentes adicionales antes de su administración a un sujeto humano o animal, o incluso administrarse juntamente con otros componentes sin premezcla. Para el uso veterinario, puede ser conveniente añadir la preparación bacteriana a un pienso animal normal. En el campo veterinario, las preparaciones encuentran utilidad concreta en el tratamiento de especies de aves, especialmente aves de corral comerciales (como se ilustra en los ejemplos acompañantes) así como en especies de mamíferos, por ejemplo, vacas, ovejas, caballos, gatos, perros, etc.

60 Para uso humano, se pueden administrar las preparaciones bacterianas como tales o se pueden premezclar de nuevo o formularse con componentes adicionales antes de la administración a un sujeto humano. La invención abarca por tanto composiciones que comprenden una preparación bacteriana de acuerdo con la invención más uno o más componentes adicionales. Como ejemplo, se pueden añadir componentes adicionales para mejorar la palatabilidad de la composición para el consumo humano. Si resulta conveniente, se pueden incorporar las preparaciones de acuerdo con la invención a comestibles o bebidas para consumo humano, con la condición de que no afecten a la viabilidad de las bacterias de la preparación.

Para uso humano y/o veterinario, puede ser conveniente formular las preparaciones de acuerdo con la invención en formas farmacéuticas unitarias, tanto solas como en combinación con uno o más diluyentes, excipientes o transportadores farmacéuticamente aceptables. De nuevo, dicha formulación no debe afectar adversamente la viabilidad de las bacterias en la preparación.

5 La invención se entenderá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitantes, junto con los dibujos acompañantes donde:

10 Las Figuras 1a-1d muestran la robustez de un cultivo líquido de *Lactobacillus plantarum* preparado mediante el método descrito en el presente documento ("húmedo") en comparación con una preparación liofilizada de la bacteria ("seco"). Las dos primeras curvas de crecimiento (Figura 1a y 1b) indican que, en un entorno no hostil, las bacterias preparadas de acuerdo con la invención crecen más rápidamente que la preparación liofilizada. La curva de crecimiento en la Figura 1c muestra el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* preparado mediante el método descrito en el presente documento ("húmedo") en comparación con una preparación liofilizada de la bacteria ("seco") en un medio suplementado con sales biliares. La Figura 1d muestra el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* preparado mediante el método descrito en el presente documento ("húmedo") en comparación con una preparación liofilizada de la bacteria ("seco") a un pH bajo en presencia de sales biliares simulando un entorno que se encuentra en el tracto digestivo de los mamíferos. Los resultados muestran que las bacterias preparadas de acuerdo con el método de la invención son más resistentes a un entorno hostil.

20 Las Figuras 2a y 2b muestran que se ha aumentado la vida media de las bacterias preparadas de acuerdo con la invención.

25 La Figura 3 muestra la colonización de bacterias en el intestino delgado de pollo.

Ejemplo 1: Producción de un sustrato de crecimiento, utilizando un medio basado en cebada.

(A) Germinación (malteado)

30 Día 1

La cebada se impregnó en agua durante 2 a 24 horas, dependiendo del lote de grano. Se puede incluir un 0,1 % (p/v) de hipoclorito sódico (blanqueador) en el agua para inhibir el crecimiento de contaminantes durante la fase de germinación. Después de 4 horas, el agua se retiró de los granos mediante drenaje, y los granos se dejaron reposar a temperatura ambiente de 10 a 30 °C durante aproximadamente 1 día.

Día 2

40 Los granos se impregnaron en agua limpia durante otro periodo de 4 horas. Se puede añadir peróxido de hidrógeno (0,1 % p/v) al agua durante estos enjuagados y los posteriores. El peróxido de hidrógeno proporciona oxígeno para la germinación de los granos, y actúa como desinfectante. De forma alternativa, se puede usar hipoclorito de sodio. Después de 4 horas, el agua se retiró de los granos mediante drenaje, y los granos se dejaron reposar durante aproximadamente 1 día. La agitación ocasional (por ejemplo, cada 4 horas) de los granos puede mejorar la germinación aumentando el intercambio gaseoso, proporcionando oxígeno y eliminando el dióxido de carbono.

45 Día 3 en adelante

50 Se continuó el ciclo de impregnación, drenaje y reposo hasta que las raicillas que emergían de los granos en germinación tuvieron de 2 a 4 mm de longitud. Este estado de crecimiento indicó que los granos habían producido enzimas para la movilización de los nutrientes almacenados. Estas enzimas son fundamentales para la posterior producción del medio de crecimiento, durante la 'maceración'. Se podría permitir una modificación más amplia de los granos, dejando la fase de germinación hasta que las raicillas tienen algunos milímetros de longitud. Sin embargo, demasiado crecimiento convertirá a los nutrientes en meras raíces y brotes de la planta, que no se pueden usar en la fermentación.

(B) Laminado

60 Cuando los granos habían germinado suficientemente se molieron a continuación con un molino de cilindros. El molino se ajustó de tal manera que los granos tenían grietas abiertas, pero no se aplastaron o aplanaron completamente. El agrietamiento de los granos permite el acceso del agua y la extracción de los nutrientes durante la maceración, evitando a la vez que el aplastamiento de los granos ayude en las etapas de filtración.

(C) preparación de un sustrato de crecimiento.

65 Los granos molidos germinados se mezclaron con suficiente agua para cubrirlos, a 45 °C y la mezcla se mantuvo a 45 °C durante 1 hora.

Después de 1 hora a 45 °C, se aumentó la temperatura a 78 °C durante un periodo de 30 minutos.

La mezcla se dejó reposar a 78°C durante 1 hora. Después de reposar a 78 °C, se separaron los bagazos mediante filtración. Se usó un filtro relativamente grueso (por ejemplo, una cesta de alambre de cuña con huecos de 1 mm) dando como resultado una solución que contenía cantidades significativas de sólidos en suspensión. Se descartó el bagazo y el líquido se trató a continuación con calor para pasteurizarlo o esterilizarlo. En este experimento concreto el líquido, se hizo hervir durante 45 minutos. A continuación se añadió un tampón (citrato trisódico al 0,5 % (p/v)) y se hizo hervir la mezcla durante 15 minutos más para dar como resultado el sustrato final de crecimiento.

10 Ejemplo 2: Análisis del sustrato de crecimiento

(a) Análisis de hidratos de carbono:

Se determinó el contenido total de hidratos de carbono usando el ensayo del ácido sulfúrico-fenol, con glucosa como patrón de referencia. (Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) Analytical Chemistry, vol. 28., p. 350).

Se determinaron los azúcares reductores usando el método Nelson-Somogyi, de nuevo con glucosa como patrón de referencia.

(Somogyi, M. (1952) Journal of Biological Chemistry., vol. 195., p. 19).

Resultados:

Los azúcares totales en el sustrato están en el intervalo de 20 a 40 mg/ml (miligramos por mililitro)

Los azúcares reductores están en el intervalo de 5 a 20 mg/ml.

(b) Análisis de proteínas y péptidos:

Se determinó la proteína total usando dos ensayos, con albúmina de suero bovino como patrón de referencia:

(i) El reactivo del Biuret (Itzhaki, R. F & Gill, D. M. (1964) Analytical Biochemistry, Vol. 9., p. 401-410.

(ii) El método de Lowry, como se ha modificado por Ohnishi y Barr. (Ohnishi, S. T. & Barr, J. K. (1978) Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, p. 265).

Se determinaron los péptidos de peso molecular mayor de 5000 daltons usando el reactivo de Bradford, (Bradford, M. M. (1976) Analytical Biochemistry, Vol. 72, p. 248-254).

Resultados:

La proteína y los péptidos totales están en el intervalo de 1 a 2 miligramos por mililitro.

Los péptidos de alto peso molecular (mayores de 5000 daltons) están en el intervalo de 100 a 300 microgramos por mililitro.

Ejemplo 3: Producción de un cultivo bacteriano metabólicamente activo

(A) Fermentación

El sustrato de crecimiento preparado de acuerdo con el ejemplo 1 se enfrió a 37 °C y se añadieron los cultivos bacterianos. Los ejemplos de un inóculo adecuado son bacterias criodesecadas o cultivos iniciadores líquidos (normalmente 1 % (v/v) de un cultivo durante la noche en un caldo nutriente).

En este ejemplo, las siguientes bacterias se hicieron crecer en dos recipientes:

(i) *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*;

(ii) *Lactobacillus casei*

Se llevó a cabo la fermentación durante 16-20 horas, hasta que se alcanzó el pH de 4,5 +/- 0,3 unidades. A continuación se enfrió la mezcla de fermentación a 4 °C y se sometió a técnicas normalizadas para evaluar la calidad (para determinar la pureza microbiológica y la enumeración de bacterias).

En este punto, se puede añadir sorbato de potasio estéril (0,005 % p/v de concentración final) al caldo fermentado. Este actúa para inhibir el crecimiento de cualquier hongo o levadura que pueda surgir debido a la contaminación durante la manipulación por el usuario final. Se puede añadir también vitamina C (0,01 % p/v de concentración final)

como antioxidante.

Tras los ensayos de aseguramiento de la calidad, si se requiere, se pueden mezclar diferentes lotes para dar productos con mezclas complejas de especies bacterianas.

5 En el ejemplo presentado en el presente documento, la mezcla de dos lotes de bacterias da como resultado un producto final que contiene las bacterias *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*.

Ejemplo 4: Vida media del cultivo bacteriano metabólicamente activo

10 Para evaluar la vida media del cultivo bacteriano metabólicamente activo, que comprende las especies *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*, como se obtuvieron en el ejemplo 2, se almacenaron a 4 °C (+/- 1 °C). Las muestras se tomaron a intervalos semanales, y se pulverizaron alícuotas de 100 ul de diluciones en serie en agua de peptona al 0,1 % (p/v) sobre placas de agar. Se incubaron las placas durante aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37 °C y se contaron las colonias bacterianas.

Resultados

20 Los resultados siguientes muestran la vida media de las bacterias preparadas mediante el método de la invención como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro por semana (véase también la Figura 2). Se han preparado el lote A y el B de acuerdo con el mismo método que se describe en el presente documento pero en diferentes días.

25 E.f = *Enterococcus faecium*
 L.p = *Lactobacillus plantarum*
 L.c = *Lactobacillus casei*
 LAB = Bacterias acidolácticas
 ufc por ml = unidades formadoras de colonias por mililitro

30 Tabla 1

Lote A	(8059)			
Semana	E.f	L.p	L.c	LAB total
0	2,7E+08	1,2E+08	9,0E+07	4,8E+08
1	2,0E+08	2,4E+08	1,9E+08	6,3E+08
2	2,4E+08	2,2E+08	1,5E+08	6,1E+08
3	3,0E+08	1,9E+08	9,0E+07	5,8E+08
4	3,0E+08	1,8E+08	8,0E+07	5,6E+08
5	3,5E+08	1,7E+08	6,0E+07	5,8E+08
6	3,0E+08	1,9E+08	5,0E+07	5,4E+08
7	3,1E+08	1,5E+08	3,0E+07	4,9E+08
8	2,8E+08	1,7E+08	3,0E+07	4,8E+08
9	2,5E+08	1,7E+08	3,0E+07	4,5E+08
10	2,5E+08	1,6E+08	2,0E+07	4,3E+08
11	2,2E+08	1,5E+08	3,0E+07	4,0E+08
12	2,0E+08	1,4E+08	3,0E+07	3,7E+08
13	1,6E+08	1,5E+08	2,0E+07	3,3E+08
14	1,5E+08	1,5E+08	2,0E+07	3,2E+08
15	1,5E+08	1,3E+08	2,0E+07	3,0E+08
16	1,4E+08	1,3E+08	2,0E+07	2,9E+08
17	1,2E+08	1,4E+08	2,0E+07	2,8E+08
18	6,0E+07	1,4E+08	1,0E+07	2,1E+08
19	4,0E+07	1,3E+08	2,0E+07	1,9E+08
20	3,0E+07	1,1E+08	2,0E+07	1,6E+08
21	4,0E+07	1,1E+08	2,0E+07	1,7E+08
22	1,0E+07	1,0E+08	1,0E+07	1,2E+08

Tabla 2

Lote B	(8060)			
Semana	E.f	L.p	L.c	LAB total
0	3,0E+08	1,3E+08	1,5E+08	5,8E+08
1	3,6E+08	1,6E+08	2,5E+08	7,7E+08
2	3,0E+08	1,5E+08	1,4E+08	5,9E+08
3	1,8E+08	2,2E+08	1,2E+08	5,2E+08
4	2,1E+08	1,0E+08	8,0E+07	3,9E+08
5	1,7E+08	1,0E+08	7,0E+07	3,4E+08
6	1,6E+08	2,0E+08	8,0E+07	4,4E+08
7	1,5E+08	1,4E+08	7,0E+07	3,6E+08
8	1,2E+08	1,5E+08	5,0E+07	3,2E+08
9	1,5E+08	1,1E+08	6,0E+07	3,2E+08
10	2,3E+08	1,0E+08	5,0E+07	3,8E+08
11	1,8E+08	1,0E+08	2,0E+07	3,0E+08
12	1,6E+08	1,0E+08	3,0E+07	2,9E+08
13	1,2E+08	1,1E+08	3,0E+07	2,6E+08
14	1,0E+08	1,1E+08	2,0E+07	2,3E+08
15	1,0E+08	1,0E+08	2,0E+07	2,2E+08
16	1,0E+08	1,0E+08	2,0E+07	2,2E+08
17	8,00E+07	9,00E+07	1,00E+07	1,8E+08
18	9,00E+07	9,00E+07	1,00E+07	1,9E+08
19	8,00E+07	8,00E+07	2,00E+07	1,8E+08
20	6,00E+07	8,00E+07	1,00E+07	1,5E+08
21	5,00E+07	7,00E+07	1,00E+07	1,3E+08
22	4,00E+07	8,00E+07	1,00E+07	1,3E+08

Ejemplo 5: Evaluación de la robustez del cultivo metabólicamente activo y de las bacterias criodesecadas

5 En esta serie de experimentos se usó una única cepa de *Lactobacillus plantarum* para inocular el medio de crecimiento. Se midió el posterior crecimiento a aproximadamente 37 °C vigilando la absorbancia a 600 nm (y también se comprobó sembrando en placas diluciones sobre medio de agar).

10 'Húmedo' se refiere a un cultivo líquido de la bacteria (producido por el método descrito en esta solicitud de patente).

'Seco' se refiere a una preparación liofilizada de la bacteria, suspendida en caldo MRS (Caldo de Man, Rogosa y Sharpe) justo antes de la incubación en el medio especificado.

15 Se usaron cantidades idénticas de bacterias 'húmedas' y 'secas' en cada par de incubaciones.

(1) Crecimiento en un medio rico y 'adecuado'

20 Se inocularon bacterias en caldo MRS y se vigiló su crecimiento (x_1 = inóculo de 1×10^7 ufc/ml de concentración final; $x_2 = 2 \times 10^7$ ufc/ml). En la Figura 1a se muestran los resultados. Esta primera curva de crecimiento indica que en un entorno no hostil, el cultivo líquido crece bastante más rápido que el de la preparación liofilizada. Presumiblemente, la bacteria durmiente en la preparación liofilizada necesita tiempo para rehidratarse y mantener el metabolismo funcionando y activado.

(2) El efecto de un choque ácido

25 1 % (v/v) tanto de un cultivo líquido, como de una suspensión de bacterias liofilizadas, se añadieron a un caldo MRS, que se había ajustado a diversos valores de pH con HGI. Las bacterias se incubaron en caldos ácidos durante 1 hora y a continuación las muestras se contaron sobre placas de agar MRS.

30

pH	6	5	4	3	2	1
Húmedo	10 ⁶ ufc/ml	10 ⁶ ufc/ml	10 ⁶ ufc/ml	10 ⁶ ufc/ml	6 x 10 ⁵ ufc/ml	0
Seco	10 ⁶ ufc/ml	10 ⁶ ufc/ml	10 ⁶ ufc/ml	2 x 10 ⁴ ufc/ml	1 x 10 ⁴ ufc/ml	0
ufc = unidades formadoras de colonias por mililitro						

Este resultado indica que las bacterias 'húmedas' son más capaces de sobrevivir al entorno ácido que los son las bacterias 'secas'. Como el estómago puede alcanzar niveles de pH tan bajos como 2, esto es significativamente relevante para la supervivencia y el bienestar de las bacterias durante y tras el tránsito gástrico.

(3) Combinación de los efectos del pH y las sales biliares

Llevando el nivel de desafío un paso más adelante, el crecimiento de preparaciones bacterianas 'húmedas' y 'secas' se comparó en las siguientes condiciones:

- (a) caldo MRS solo (Figura 1b)
- (b) caldo MRS suplementado con sales biliares al 0,5 % (p/v) (Oxoid L55) (Figura 1c)
- (c) Incubación en MRS a pH 3,0 durante 1 hora, seguido por el crecimiento en caldo MRS con sales biliares (Figura 1d).

Los resultados combinados de los experimentos indican los siguientes puntos:

- Las bacterias 'húmedas' crecen más rápidamente que las bacterias 'secas'.
- El choque ácido tiene un efecto más perjudicial sobre las bacterias 'secas' que sobre las 'húmedas'.
- Las sales biliares inhiben ambos tipos, posiblemente con un efecto más adverso sobre las bacterias 'secas' que sobre las 'húmedas'.
- Los efectos secuenciales combinados de un choque ácido seguido por la exposición a las sales biliares ralentizan significativamente el crecimiento de las bacterias 'húmedas', pero destruye a las bacterias 'secas' (determinado por la ausencia de colonias en placas de agar).

Sin embargo, aunque el pH y la tolerancia a las sales biliares son obviamente factores importantes, existen numerosos estímulos diferentes, químicos y microbianos, a los cuales deben enfrentarse las bacterias probióticas. De esta manera, la viabilidad y el número total de bacterias, como se ha determinado de forma sencilla por el número de unidades formadoras de colonias por gramo o ml, es solo un indicador del bienestar de una preparación para funcionar como un probiótico. Si las bacterias no están en un estado activo cuando penetran en el hospedador, existe una posibilidad significativa de que puedan resultar destruidas o que avancen demasiado a lo largo del tracto digestivo, antes de que tengan una posibilidad de colonizar. Por tanto, los probióticos son ventajosos para su uso en un hospedador si están en un estado metabólicamente activo cuando penetran en el hospedador. De acuerdo con la invención, las bacterias están vivas y en forma metabólicamente activa, de tal manera que son capaces de resistir el entorno hostil del tracto GI. La naturaleza metabólicamente activa del producto se diseña para aumentar las posibilidades de supervivencia y colonización en el hospedador.

Ejemplo 6: Efectos sobre la microflora intestinal de pollos de corral

Introducción y métodos:

Se preparó un probiótico que contiene las bacterias acidolácticas *E. faecium*, *L. plantarum*, *L. casei* y *L. acidophilus* de acuerdo con el método descrito en el presente documento. El probiótico se sometió a ensayo para determinar su capacidad de alterar la microflora intestinal de pollos de corral en una unidad en una unidad de pollo de corral comercial (variedad broiler).

Tratamiento de los pollos:

Se proporcionó a los pollos de corral el antibiótico Lincospectina desde el día 1 (día de edad) al día 3.

En el día 4, las aves no recibieron tratamiento.

En el día 5, la mitad de las jaulas de los pollos variedad broiler recibieron la preparación a una velocidad de 1 litro por 5000 pollos. Las jaulas restantes se usaron como controles.

En el día 6 se seleccionaron aleatoriamente seis aves de cada grupo, se sacrificaron y se examinó la microflora intestinal. (Se combinaron muestras de tejidos de parejas de aves de cada grupo, proporcionando tres muestras de cada grupo).

Análisis microbiológico:

Las zonas del sistema digestivo seleccionadas para el análisis son el tracto intestinal superior, tomadas desde el inicio del intestino delgado hacia el punto de unión del saco vitelino.

5 Los tejidos y contenidos intestinales de las parejas de aves se maceraron en agua de peptona estéril, se diluyeron, y las muestras se pulverizaron sobre una variedad de agares semiselectivos. Tras la incubación de las placas, se señalaron las características y el número de colonias juntas con el análisis microscópico de las bacterias. Se llevó a cabo la identificación de las bacterias acidolácticas mediante el examen de las características de las colonias, la morfología celular y los perfiles de fermentación de los hidratos de carbono (esto último utilizando el kit de ensayo 'api 50 CH' de BioMerieux).

Resultados:

15 En la Figura 3 se muestran los resultados.

- L1 a L3 = aves tratadas con probióticos (parejas 1 a 3)
- C1 a C3 = aves del control (parejas 1 a 3)
- SI = intestino delgado
- 20 ufc = unidades formadoras de colonias

25 Como se esperaba, existían muchos microbios diferentes presentes en los tractos gastrointestinales de las aves tratadas con el control y con los probióticos. Globalmente, existían cantidades y tipos similares de bacterias en ambos grupos de aves, pero con algunas diferencias significativas en la distribución y cantidad de especies concretas.

Bacterias acidolácticas

30 Existía una diferencia muy perceptible en el contenido de bacterias acidolácticas (LAB) entre la preparación tratada y las aves del control. Aunque ambos grupos tenían cantidades totales comparables de LAB, la flora de las aves del control estaba dominada por una única especie, mientras que las aves tratadas con probióticos tenían una mezcla más amplia de especies presentes.

Ejemplo 7 Efecto de la preparación probiótica sobre polluelos de avestruz

35 Se llevó a cabo un ensayo para evaluar los efectos de una preparación de acuerdo con la invención en polluelos de avestruz. El ensayo se llevó a cabo durante un periodo de 4 semanas con polluelos que padecen diarrea desde el día 4. Se trató un grupo de polluelos con la preparación de acuerdo con la invención, un segundo con un antibiótico de amplio espectro y un tercero con un suplemento de vitaminas y aminoácidos. Los resultados del ensayo muestran que el grupo tratado con la preparación de acuerdo con la invención tenían un 67 % de disminución de la mortalidad en comparación con el grupo tratado con antibióticos y que la administración de la preparación podría aliviar los síntomas del estreñimiento, la diarrea, la estasis del intestino, comportamientos indebidos y prolapsos. Además, se observó un aumento de peso del 27 % en comparación con los grupos del control en el grupo tratado con la preparación probiótica.

45 En un segundo ensayo, donde se administraron 100 ml de la preparación de acuerdo con la invención a las aves reproductoras, se observó a la administración dio como resultado un aumento de la fertilidad en comparación con el grupo del control.

50 De acuerdo con ello, estos resultados muestran que la tasa de crecimiento, la morbilidad y la mortalidad están influenciadas por la administración de la preparación probiótica de acuerdo con la invención.

Ejemplo 8 Efectos beneficiosos de la preparación probiótica en mamíferos

55 En un pequeño ensayo independiente, se evaluó el efecto de la preparación de acuerdo con la invención sobre gatos y perros que padecen enteritis crónica y se encontró que es útil en la restauración de la flora intestinal normal.

60 En un ensayo en seres humanos, los voluntarios han observado efectos beneficiosos de la preparación que ayudan en casos agudos de diarrea y corrigen las irregularidades crónicas del intestino.

Este modelo de beneficios sugiere que un producto basado en el método notificado en el presente documento podría tener beneficios significativos para los seres humanos en el control de disfunciones gastrointestinales agudas y crónicas (incluyendo síndrome del intestino irritable y enfermedad inflamatoria del intestino, envenenamiento alimenticio, diarrea infecciosa y estreñimiento). Se está llevando un ensayo clínico completo para apoyar los resultados obtenidos de esta manera.

Referencias

- F. Fonseca, C. Béal, y G. Corrieu. *J.Dairy Res.* 67 (1):83-90, 2000.
- 5 M. L. F. Murga, A. P. D. Holgado, y G. F. de Valdez. *Cryobiology* 36 (4):315-319, 1998.
- J. Hamilton-Miller. *Lancet* 355 (9201):413-414, 2000.
- 10 Kunze, W. *Technology Brewing y Malting* (1996)
- Beneficios potenciales para la salud:**
- Collins, J. K., Q'Sullivan, G. y Shanahan, F. (1996) *Gut flora and health - past, present and future*, Royal Society of Medicine Press Limited, London.
- 15 D. Haller, C. Bode, y W. P. Hammes. *Microbiol.Immunol.* 43 (10):925-935, 1999.
- C. Hesse, L. A. Hanson, y A. E. Wold. *Clin.Exp.Immunol.* 116 (2):276-282, 1999.
- 20 E. Isolauri, Y. Sütas, P. Kankaanpää, H. Arvilommi, y S. Salminen. *Am.J.Clin.Nutr.* 73 (2):444S-450S, 2001.
- M. Miettinen, S. Matikainen, J. Vuopio-Varkila, J. Pirhonen, K. Varkila, M. Kurimoto, y I. Julkunen. *Infect. Immun.* 66 (12):6058-6062, 1998.
- 25 A. E. Wold y I. Adlerberth. *Adv.Exp.Med.Biol.* 478:77-93, 2000.
- Química de la sangre**
- J. W. Anderson y S. E. Gilliland. *J.Am.Coll.Nutr.* 18 (1):43-50, 1999.
- 30 H. Bukowska, J. Pieczul-Mrész, M. Jastrzebska, K. Chelstowski, y M. Naruszewicz. *Atherosclerosis* 137 (2):437-438, 1998.
- I. De Smet, P. De Boever, y W. Verstraete. *Br.J.Nutr.* 79 (2):185-194, 1998.
- 35 T. Endo, M. Nakano, S. Shimizu, M. Fukushima, y S. Miyoshi. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 63 (9):1569-1575, 1999. H. Kikuchi-Hayakawa, N. Onodera, S. Matsubara, E. Yasuda, Y. Shimakawa, y F. Ishikawa. *Br.J.Nutr.* 79 (1):97-105, 1998.
- 40 H. Kikuchi-Hayakawa, H. Shibahara-Sone, K. Osada, N. Onodera-Masuoka, F. Ishikawa, y M. Watanuki. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 64 (3):466-475, 2000.
- F. A. M. Klaver y R. van der Meer. *The Assumed Appl.Environ.Microbiol.* 59 (4):1120-1124, 1993.
- 45 B. K. Mital y S. K. Garg. *Crit.Rev.Microbiol.* 21 (3):175-214, 1995.
- G. R. J. Taylor y C. M. Williams. *Br.J.Nutr.* 80 (4):S225-S230, 1998.
- Tratamiento y prevención del cáncer**
- 50 Y. Aso, H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai, y S. Naito. *Eur.Urol.* 27:1-04-109, 1995.
- R. Balansky, B. Gyosheva, G. Ganchev, Z. Mircheva, S. Minkova, y G. Georgiev. *Cancer Lett.* 147 (1-2):125-137, 1999.
- 55 L. J. Brady, D. D. Gallaher, y F. F. Busta. *J.Nutr.* 130 (2):410S-419S, 2000.
- D. D. Gallaher y J. Khil. *J.Nutr.* 129 (7):1483S-1487S, 1999.
- 60 B. R. Goldin. *Br.J.Nutr.* 80 (4):S203-S207, 1998.
- S. L. Gorbach. *Am.J.Gastroenterol.* 95 (1):S2-S4, 2000.
- K. Hirayama y J. Rafter. *Antonie Van Leeuwenhoek - International Journal of Microbiology* 76 (1):391-394, 1999.
- 65 K. Hirayama y J. Rafter. *Microbe.Infect.* 2 (6):681-686, 2000.

W. H. Ling. *Nutr.Res.* 15 (3):439-454, 1995.

G. H. McIntosh, P. J. Royle, y M. J. Playne. *Nutr.Cancer* 35 (2):153-159, 1999.

5 J. J. Rafter. *Scand.J.Gastroenterol.* 30:497-502, 1995.

B. S. Reddy. *Br.J.Nutr.* 80 (4):S219-S223, 1998.

10 Rowland, I. R. (1996) 'Gut microflora and cancer' en Leeds, A. R. y Rowland, I. R. (eds.) *Gut flora and health - past, present and future*, Royal Society of Medicine Press Limited, London.

M. D. Winters, T. L. Schlinke, W. A. Joyce, S. R. Glore, y M. M. Huycke. *Am.J.Gastroenterol.* 93 (12):2491-2500, 1998.

15 **Diarrea y estreñimiento**

T. Arvola, K. Laiho, S. Torkkeli, H. Mykkanen, S. Salminen, L. Maunula, y E. Isolauri. *Pediatrics* 104 (5):L1-L4, 1999.

20 R. Bennet, S. L. Gorbach, B. R. Goldin, T. W. Chang, B. E. Laughon, W. B. Greenough, y J. G. Bartlett. *Nutrition Today* 31 (6):35S-38S, 1996.

A. Bomba, R. Nemcová, S. Gancarci-ková, R. Herich, y R. Kastel. *Adv.Exp.Med.Biol.* 473:185-190, 1999.

25 N. M. De Roos y M. B. Katan. *Am.J.Clin.Nutr.* 71 (2):405-411, 2000.

H. L. DuPont. *J.Pediatr.* 134 (1):1-2, 1999.

30 S. L. Gorbach. *Am.J.Gastroenterol.* 95 (1):S2-S4, 2000.

M. Heyman. *J.Am.Coll.Nutr.* 19 (2):137S-146S, 2000.

E. Isolauri, M. Kaila, H. Mykkanan, W. H. Ling, y S. Salminen. *Dig.Dis.Sci.* 39 (12):2595-2600, 1994.

35 R. A. Oberhelman, E. H. Gilman, P. Sheen, D. N. Taylor, R. E. Black, L. Cabrera, A. G. Lescano, R. Meza, y G. Madico. *J.Pediatr.* 134 (1):15-20, 1999.

R. D. Rolfe. *J.Nutr.* 130 (2):396S-402S, 2000.

40 J. Saavedra. *Am.J.Gastroenterol.* 95 (1):S16-S18, 2000.

C. Scarpignato y P. Rampal. *Chemotherapy* 41 ((suppl 1)):48-81, 1995.

45 A. V. Shornikova, I. A. Casas, H. Mykkänen, E. Salo, y T. Vesikari. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 16 (12):1103-1107, 1997.

J. A. Vanderhoof, D. B. Whitney, D. L. Antonson, T. L. Hanner, J. V. Lupo, y R. J. Young. *J.Pediatr.* 135 (5):564-568, 1999.

Síndrome del intestino irritable

50 P. Brigidi, B. Vitali, E. Swennen, G. Bazzocchi, y D. Matteuzzi. *Res.Microbiol.* 152 (8):735-741, 2001.

K. Niedzielin, H. Kordecki, y B. Birkenfeld. *Eur.J. Gastroenterol.Hepatol.* 13 (10):1143-1147, 2001.

55 S. Nobaek, M. L. Johansson, G. Molin, S. Ahrne, y B. Jeppsson. *Am.J. Gastroenterol.* 95 (5):1231-1238, 2000.

Panorama general:

60 Marteau, P. y Rambaud, J-C, (1996) 'Therapeutic applications of probiotics in humans' en Leeds, A. R. y Rowland, I. R. (eds.) *Gut flora and health - past, present and future*, Royal Society of Medicine Press Limited, London.

Stark, B. A. y Wilkinson, (eds.) (1989) *Probiotics. Theory and Applications*, Chalcombe Publications, Bucks, UK.21

65

REIVINDICACIONES

1. Una preparación que comprende bacterias acidolácticas viables metabólicamente activas y un sustrato de crecimiento que comprende una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, y monosacáridos y disacáridos, proteínas y péptidos, donde la bacteria en la preparación presenta un estado de crecimiento casi en equilibrio caracterizado por que la población de bacterias se mantiene en el intervalo de 10^8 a 10^9 células viables por mililitro cuando se almacena a aproximadamente 4 °C y a pH controlado en el intervalo de 3,8-4,5 durante un periodo de al menos 5 meses, donde la cantidad total de azúcares está en el intervalo de entre 20 mg/ml a 40 mg/ml y donde la cantidad total de azúcares reductores está en el intervalo de entre 5 mg/ml a 20 mg/ml cuando se mide utilizando el método de Nelson-Somogyi, y donde la bacteria acidoláctica comprende *Lactobacillus plantarum*.
2. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la bacteria acidoláctica comprende además *Lactobacillus casei* y *Enterococcus faecium*.
3. La preparación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde la cantidad total de proteínas y péptidos está en el intervalo de 1 mg/ml a 2 mg/ml y donde la cantidad total de péptidos de alto peso molecular está en el intervalo de 100 µg/ml a 300 µg/ml.
4. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende además un agente antifúngico.
5. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende además un antioxidante.
6. Un método para preparar una preparación estable y metabólicamente activa de bacterias acidolácticas que comprende:

hacer crecer bacterias acidolácticas en un sustrato de crecimiento que comprende una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, y monosacáridos y disacáridos, proteínas y péptidos para obtener una preparación de bacterias acidolácticas, donde la cantidad total de azúcares en el sustrato de crecimiento está en el intervalo de 20 mg/ml a 40 mg/ml y donde la cantidad total de azúcares reductores en el sustrato de crecimiento está en el intervalo de 5 mg/ml a 20 mg/ml cuando se mide usando el método de Nelson-Somogyi, y enfriar la preparación resultante a aproximadamente 4 °C, donde las bacterias acidolácticas adoptan un estado próximo al equilibrio **caracterizado por que** la población de bacterias acidolácticas en la preparación se puede mantener en el intervalo de 10^8 a 10^9 células viables por mililitro cuando se almacena a aproximadamente 4 °C y a pH controlado en el intervalo de 3,8 a 4,5 durante un periodo de al menos 5 meses, donde las bacterias acidolácticas comprenden *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Enterococcus faecium*, opcionalmente, almacenar la preparación a aproximadamente 4 °C.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la bacteria acidoláctica comprende además *Lactobacillus casei* y *Enterococcus faecium*.
8. El método de la reivindicación 7 donde las especies de bacterias acidolácticas se hacen crecer conjuntamente en un solo sustrato de crecimiento.
9. El método de la reivindicación 7 o la reivindicación 8 donde dos o más especies de bacterias acidolácticas se hacen crecer en sustratos de crecimiento separados y se mezclan entre sí antes del almacenamiento a aproximadamente 4 °C.
10. Un método para preparar una preparación estable y metabólicamente activa de bacterias acidolácticas que comprende:

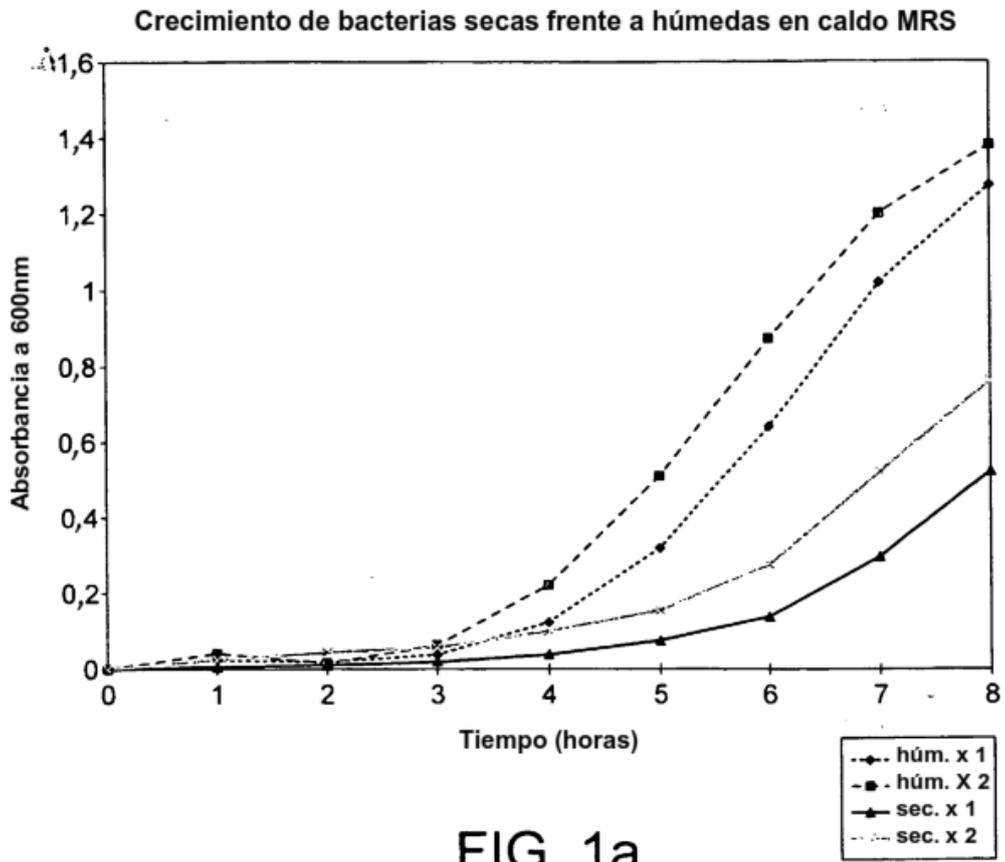
añadir bacterias acidolácticas a un sustrato de crecimiento que comprende una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos, y monosacáridos y disacáridos, proteínas y péptidos, para formar una preparación de microorganismos, donde la cantidad total de azúcares en el sustrato de crecimiento está en el intervalo de 20 mg/ml a 40 mg/ml y donde la cantidad total de azúcares reductores en el sustrato de crecimiento está en el intervalo de 5 mg/ml a 20 mg/ml, cuando se mide utilizando el método de Nelson-Somogyi, y donde las bacterias acidolácticas se añaden al sustrato de crecimiento a una concentración que proporciona un estado de crecimiento próximo al equilibrio caracterizado por que la población de bacterias acidolácticas en la preparación se puede mantener en el intervalo de 10^8 a 10^9 células viables por mililitro cuando se almacenan a aproximadamente 4 °C y a un pH controlado en el intervalo de 3,8 a 4,5 durante un periodo de al menos 5 meses, donde la bacteria acidoláctica comprende *Lactobacillus plantarum* y, opcionalmente, almacenar la preparación a aproximadamente 4 °C.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la bacteria acidoláctica comprende además *Lactobacillus casei* y *Enterococcus faecium*.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 donde antes del almacenamiento de la preparación se añade un agente antifúngico.

5 13. Una preparación metabólicamente activa y estable de bacterias de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como medicamento.

10 14. Uso de una preparación metabólicamente activa y estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno que afecta al equilibrio microbiano intestinal en un sujeto mamífero,
opcionalmente donde el trastorno que afecta al equilibrio microbiano intestinal es la enfermedad crónica inflamatoria de intestino, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn.

15 15. Uso de una preparación metabólicamente activa y estable de bacterias de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la fabricación de un medicamento para su uso en el mantenimiento del equilibrio microbiano intestinal en un sujeto mamífero.



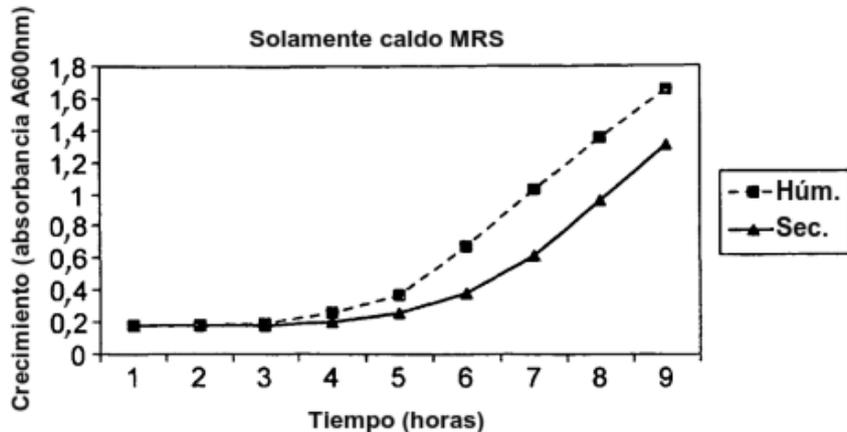


FIG. 1b

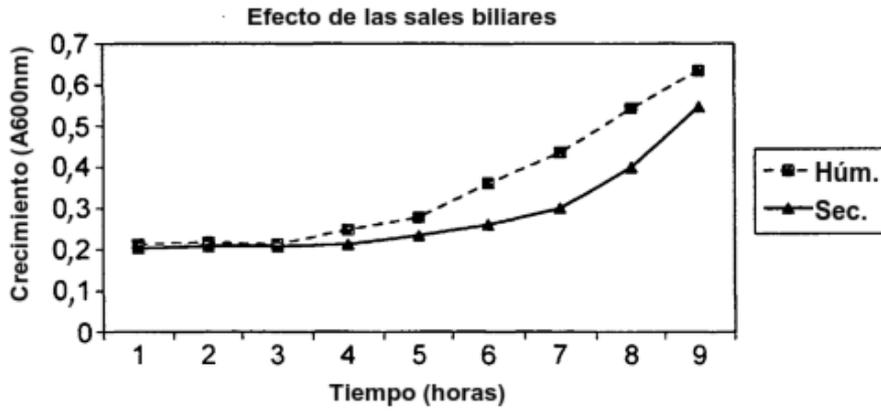


FIG. 1c

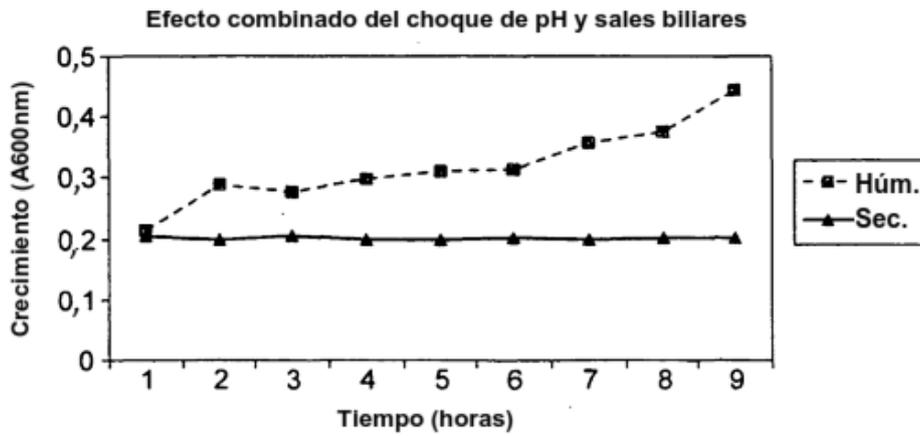


FIG. 1d

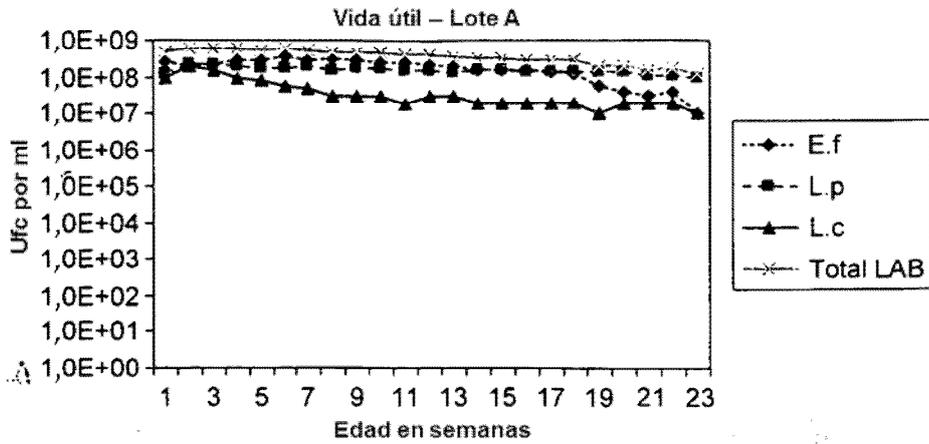


FIG. 2a

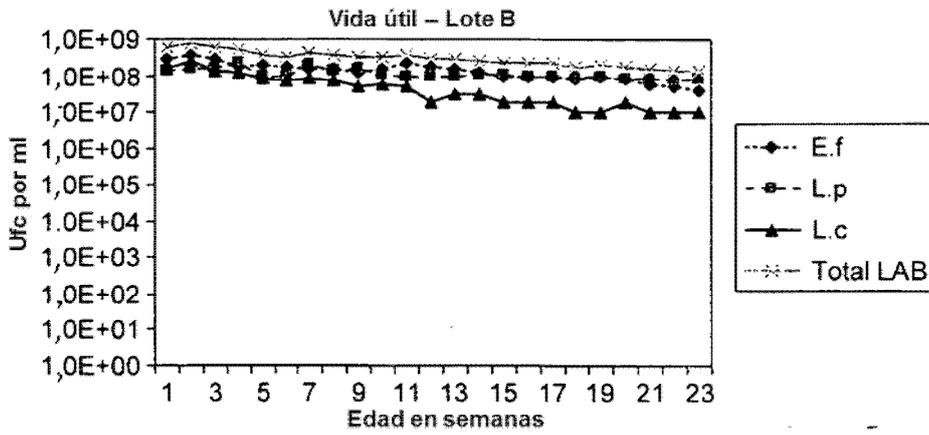


FIG. 2b

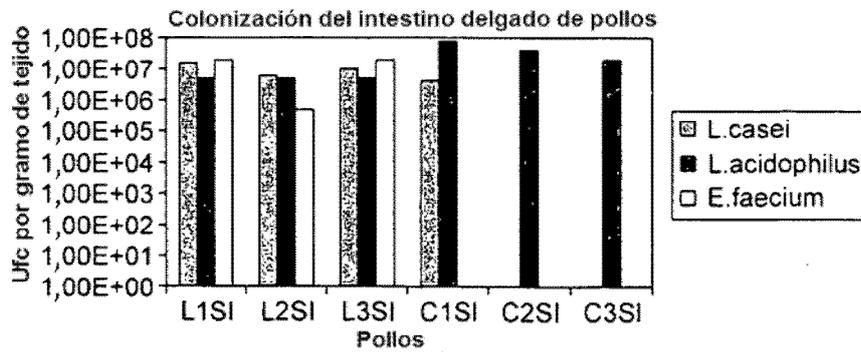


FIG. 3