

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 826**

51 Int. Cl.:

A23L 33/135 (2006.01)

A23L 33/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2016 PCT/GB2016/051516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16189306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2016 E 16726382 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3302103**

54 Título: **Composiciones y métodos para su producción**

30 Prioridad:

27.05.2015 GB 201509023

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

25.06.2019

73 Titular/es:

**OPTIBIOTIX LIMITED (100.0%)
Innovation Centre Innovation Way
Heslington, York YO10 5DG, GB**

72 Inventor/es:

**O'HARA, STEPHEN PATRICK y
KOLIDA, SOFIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 717 826 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

Composiciones y métodos para su producción

Campo Técnico de la Invención

5 La invención se refiere a una composición prebiótica que es selectiva para el crecimiento de la o las cepas bacterianas de *Propionibacterium*, para uso en, pero no limitadas a fomentar la producción de propionato en el intestino para regular el apetito en un individuo.

Antecedentes de la Invención

10 Los prebióticos son ingredientes dietéticos que pueden mejorar selectivamente los niveles y/o la actividad de microbióticos intestinales beneficiosos, tales como lactobacilos o bifidobacterias, y están encontrando una aplicación mucho mayor en el sector alimentario. Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que son metabolizados selectivamente por bacterias colónicas que contribuyen a mejorar la salud. Como tales, su uso puede fomentar cambios beneficiosos en el medio microbiano intestinal indígena y, por lo tanto, pueden ayudar a la supervivencia de los probióticos. Son distintos de la mayoría de las fibras dietéticas, tales como pectina, celulosas, xilano, que no son metabolizados selectivamente en el intestino. Los criterios para la clasificación como prebiótico es
15 que debe resistir la acidez gástrica, la hidrólisis por parte de enzimas de los mamíferos y la absorción en el tracto gastrointestinal superior, es fermentado por la microflora intestinal y estimula selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar.

20 Se cree que aumentar los niveles colónicos de propionato ayuda a regular el apetito en un individuo. Sin embargo, es difícil administrar propionato directamente en el intestino grueso debido al entorno digestivo destructivo y a la capacidad de absorción del tracto gastrointestinal superior.

25 Se ha demostrado que los fructo-oligosacáridos (FOS, inulina y oligofruktosa) y los galacto-oligosacáridos (GOS) cumplen los criterios para la clasificación prebiótica repetidamente en estudios de intervención en seres humanos. Los fructo-oligosacáridos y galacto-oligosacáridos actualmente disponibles fijan como objetivo el crecimiento y/o la actividad de bifidobacterias y lactobacilos, ninguno de los cuales puede producir propionato. Actualmente, no hay un prebiótico selectivo conocido para *Propionibacterium*. El documento WO 2015/067949 A1 se refiere a una composición prebiótica que es selectiva para el crecimiento de la o las cepas bacterianas de *Propionibacterium*, para uso, pero no limitado a, fomentar la producción de propionato en el intestino para regular el apetito en un individuo.

30 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición prebiótica que permita el crecimiento específico de una bacteria productora de propionato. También sería deseable que el prebiótico fijara como objetivo una especie o cepa beneficiosa de *Propionibacterium*.

Sumario de la Invención

35 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición prebiótica que comprende un galacto-oligosacárido (GOS) producido a partir de una o más cepas bacterianas de *Propionibacterium*, en donde el GOS actúa como un medio de crecimiento selectivo para las cepas bacterianas de *Propionibacterium*, y en donde el GOS es sustancialmente el mismo que la forma producida por la reacción de β -galactosidasa inversa de cepas bacterianas de *Propionibacterium*.

Preferiblemente, el GOS se produce y/o es selectivo para una o más de las siguientes cepas bacterianas: *Propionibacterium jensenii*; *Propionibacterium freudenreichii*; *Propionibacterium acidipropionici*, o sub-especies o cepas mutantes de los mismos.

40 El GOS puede producirse a partir de los géneros o cepas bacterianas de *Propionibacterium* seleccionados y el GOS puede actuar como un medio de crecimiento selectivo para dichos géneros o cepas bacterianas de *Propionibacterium* seleccionados.

45 La composición prebiótica estará preferiblemente presente en la composición en una cantidad eficaz para provocar un cambio positivo y gradual en las proporciones y la actividad de *Propionibacterium* en el intestino. Se pueden utilizar cantidades más altas si se requiere un cambio rápido en los microbióticos o si la composición se está utilizando para ayudar a sembrar el intestino con una nueva cepa bacteriana que no está actualmente presente.

La composición prebiótica puede estar encapsulada. Muchas técnicas de encapsulación resultarán evidentes para el destinatario experto y la empleada se adaptará a la estabilidad requerida del medio de crecimiento prebiótico durante el tránsito digestivo.

5 La composición prebiótica puede comprender, además, un excipiente o compuesto portador para permitir que pase a través de al menos parte del entorno gastrointestinal del cuerpo y sea administrada de manera eficiente y se libere en el intestino delgado. El prebiótico puede estar concentrado y/o liofilizado. La composición puede estar en un cierto número de formatos, tales como en forma de un líquido (que puede ser bebible) y/o polvo que se puede mezclar con un alimento sólido o líquido.

10 La composición prebiótica se puede combinar con uno o más ingredientes activos, tales como vitaminas, minerales, productos fitoquímicos, antioxidantes, cepas de bacterias probióticas y combinaciones de los mismos.

15 Las vitaminas pueden incluir vitaminas solubles en grasas, tales como la vitamina A, vitamina D, vitamina E, y vitaminas y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, las vitaminas pueden incluir vitaminas solubles en agua, tal como la vitamina C (ácido ascórbico), las vitaminas B (tiamina o B1, riboflavoína o niacina B25 o B3, piridoxina o B6, ácido fólico o B9, cianocobalamina o B12, ácido pantoténico, biotina), y combinaciones de las mismas.

Minerales pueden incluir, pero no se limitan a sodio, magnesio, cromo, yodo, hierro, manganeso, calcio, cobre, fluoruro, potasio, fósforo, molibdeno, selenio, zinc y combinaciones de los mismos.

20 Antioxidantes pueden incluir, pero no se limitan a ácido ascórbico, ácido cítrico, aceite de romero, vitamina A, vitamina E, fosfato de vitamina E, tocoferoles, fosfato de di-alfa-tocoferilo, tocotrienoles, ácido alfa lipoico, ácido dihidrolipoico, xantofilos, beta criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina, astaxantina, beta-caroteno, carotenos, carotenoides mixtos, polifenoles, flavonoides y combinaciones de los mismos.

25 Productos fitoquímicos pueden incluir, pero no se limitan a cartotenoides, clorofila, clorofilina, fibra, flavonoides, antocianinas, cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina, flavanoles, catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, teaflavinas, tearubiginas, proantocianinas, flavonoles, quercetina, kaempferol, miricetina, isoramnetina, flavanonas hesperidina, naringenina, eriodictiol, tangeretina, flavonas, apigenina, luteolina, lignanos, fitoestrógenos, resveratrol, isoflavonas, daidzeína, genisteína, gliciteína, isoflavonas de soja, y combinaciones de los mismos.

30 También se pueden incorporar cepas probióticas a la composición. Se prefiere que las cepas probióticas comprendan cepas bacterianas de *Propionibacterium*. Es más preferido que la cepa o las cepas probióticas comprendan la cepa o las cepas bacterianas *Propionibacterium* utilizadas para producir inicialmente el GOS.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición prebiótica para uso en la regulación y/o modulación del apetito. Alternativa o adicionalmente, la composición puede ser utilizada en la gestión o el tratamiento de la obesidad y/o la gestión del peso. La composición que comprende un galacto-oligosacárido (GOS) producido a partir de una o más cepas bacterianas de *Propionibacterium*, en donde el GOS actúa como un medio de crecimiento selectivo para las cepas bacterianas de *Propionibacterium*, y en donde el GOS es sustancialmente el mismo que la forma producida por la reacción de β -galactosidasa inversa de cepas bacterianas de *Propionibacterium* puede utilizarse como un medicamento o un complemento farmacéutico y/o dietético.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición prebiótica para uso en el tratamiento de la obesidad, comprendiendo la composición un galacto-oligosacárido (GOS) producido a partir de una o más cepas bacterianas de *Propionibacterium*, en donde el GOS actúa como un medio de crecimiento selectivo para las cepas bacterianas de *Propionibacterium*, y en donde el GOS es sustancialmente el mismo que la forma producida por la reacción de la β -galactosidasa inversa para cepas bacterianas de *Propionibacterium*.

45 En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un uso de una composición prebiótica, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o la gestión de la obesidad, comprendiendo la composición un oligosacárido producido de forma microbiana, en donde la composición comprende un galacto-oligosacárido (GOS) producido a partir de una o más cepas bacterianas de *Propionibacterium*, en donde el GOS actúa como un medio de crecimiento selectivo para cepas bacterianas de *Propionibacterium*, y en donde el GOS es sustancialmente el mismo que la forma producida por la reacción de la β -galactosidasa inversa para cepas bacterianas de *Propionibacterium*.

5 Alternativa (o adicionalmente) a un producto farmacéutico o medicamento, la composición puede utilizarse como un complemento dietético, un nutracéutico o un alimento funcional. Aún un aspecto adicional de la presente invención puede ser una composición prebiótica para uso como un complemento dietético, un nutracéutico o un alimento funcional, comprendiendo la composición un galacto-oligosacárido (GOS) producido a partir de una o más cepas bacterianas de *Propionibacterium*, en donde el GOS actúa como un medio de crecimiento selectivo para cepas bacterianas de *Propionibacterium*, y en donde el GOS es sustancialmente el mismo que la forma producida por la reacción de la β -galactosidasa inversa para cepas bacterianas de *Propionibacterium*.

10 Resultará evidente para el experto en la materia que las características de la composición prebiótica en relación con el primer aspecto de la invención también serán aplicables e intercambiables para la composición para uso como un producto farmacéutico, medicamento, complemento dietético, nutracéutico o alimento funcional.

Además, la composición podría incorporarse en un alimento existente, tal como yogur o en forma de un polvo, que puede mezclarse fácilmente con alimentos o convertirse en una bebida líquida.

15 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición para uso en el aumento de los niveles de propionato en el intestino delgado de un individuo en el que la composición fomenta el crecimiento de bacterias secretoras de propionato.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir galacto-oligosacárido (GOS), que comprende las etapas de crecimiento de una o más cepas de *Propionibacterium* en un medio de crecimiento que comprende hasta un 50 % de lactosa a una temperatura de hasta 55 °C durante hasta 24 horas en condiciones anaerobias y recogida de GOS de las células de *Propionibacterium*.

20 Preferiblemente, la una o más de las cepas de *Propionibacterium* se cultivan en un medio de crecimiento que comprende hasta 40 % de lactosa a una temperatura de hasta 50 °C durante hasta 24 horas. La una o más cepas de *Propionibacterium* se pueden cultivar en un medio de crecimiento que comprende en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 % de lactosa a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 35 a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 10 a aproximadamente 14 horas.

25 El GOS puede recogerse mediante un cierto número de métodos, pero se prefiere que se recoja de las células mediante lisis. Dicha lisis puede implicar una o más etapas de congelación-descongelación.

Las cepas de *Propionibacterium* pueden seleccionarse de una o más de las siguientes: *Propionibacterium jensenii*; *Propionibacterium freudenreichii*; *Propionibacterium acidipropionici*, o sub-especies o cepas mutantes de las mismas.

30 Preferiblemente, el método de producir GOS en una o varias cepas de *Propionibacterium* seleccionadas está optimizado.

El método, tal como se describe anteriormente en esta memoria, puede utilizarse para producir GOS para uso en aspectos de composición de la presente invención.

Descripción Detallada de la Invención

35 Se describirán ahora realizaciones de la presente invención, solo a modo de ejemplo, en las que:

La Figura 1 es un gráfico que muestra la relación entre las especies de GOS más frecuentes para *P. jensenii* calculada a diferentes temperaturas y momentos;

la Figura 2 es un gráfico que muestra las dos tasas de formación de GOS a 30°C y 50°C de las dos cepas seleccionadas de *Propionibacterium*;

40 la Figura 3 es un gráfico que muestra la relación de la tasa de formación de GOS real a la tasa de formación teórica de GOS a 30°C y 50°C para las cepas seleccionadas;

la Figura 4 es un gráfico que muestra el análisis de la diferencia en la actividad de la β -galactosidasa de los experimentos de rastreo iniciales y los experimentos de síntesis de GOS posteriores en las cepas seleccionadas; y

45 la Figura 5 muestra el análisis (mediante la relación Log/Stat) de la dependencia de la expresión de β -galactosidasa de las cepas seleccionadas.

Mecánicamente, las glicosidasas son todas transferasas que utilizan agua como su molécula aceptora preferida. Sin embargo, en circunstancias apropiadas, tales como altas concentraciones de hidratos de carbono de sustrato, estas enzimas transferirán restos de monosacáridos desde el sustrato (que actúa como donante de glicosilo) a otro sustrato o hidratos de carbono no de sustrato (que actúan como aceptor de glicosilo). Típicamente, los productos de estas reacciones son mezclas complejas que contienen todos los enlaces glicosídicos posibles pero en cantidades diferentes. Dado que las reacciones están controladas cinéticamente, el perfil de enlace sintetizado debe mapearse en las constantes de velocidad para la hidrólisis de esos enlaces por parte de la enzima productora. En consecuencia, los oligosacáridos pueden metabolizarse más fácilmente por los organismos productores que por otros en el ecosistema gastrointestinal. Este enfoque ha demostrado ser prometedor en las pruebas de laboratorio.

Es posible, sin embargo, en muchas reacciones de síntesis de enzimas incluir otros hidratos de carbono que actuarán como aceptores además de la lactosa. De esta manera, se podrían construir nuevas mezclas que contengan nuevas estructuras.

La base de los presentes experimentos fue utilizar reversiblemente β -galactosidasas en cepas de *Propionibacterium* para producir un nuevo GOS. Normalmente, las β -galactosidasas hidrolizarían la lactosa. Sin embargo, al cambiar las condiciones de reacción, en términos de concentración de sustrato y temperatura, la enzima actúa de manera reversible y genera una versión oligosacárida de la lactosa (GOS).

Experimentos

Los experimentos se realizaron en dos fases. La primera fase rastreó 77 cepas para la detección de la actividad hidrolítica de β -galactosidasa basado en la descomposición de *orto*-nitrofenil- β -galactósido (ONPG). Las condiciones de crecimiento se ajustaron para intentar mejorar las características generales de crecimiento. Se evaluó la actividad total de β -galactosidasa y las cepas que exhibían la mayor actividad se presentaron luego a la segunda fase. Durante la segunda fase, se realizó un estudio de viabilidad para seleccionar las cepas seleccionadas por su capacidad real para sintetizar GOS.

El rastreo de 77 cepas de *Propionibacterium* se realizó para la detección de la actividad hidrolítica de β -galactosidasa basada en la descomposición de ONPG. La actividad total de β -galactosidasa se evaluó en unidades Miller.

Actividad de β -galactosidasa en *Propionibacterium*

Se precultivó una gama de cepas de *Propionibacterium* (incluidas diferentes especies y subespecies) de una reserva de -80°C durante 72 horas a 30°C en 200 μl de medio LB complementado con 1% de glucosa en una placa estándar de 96 pocillos. Los cultivos se volvieron a diluir 100 veces a 1600 μl de LB suministrados con placas de pocillos profundos de glucosa al 1%. El crecimiento se realizó en condiciones anaerobias a 37°C durante 96 horas. La DO_{600} se determinó después de una dilución de 10 veces de los cultivos. Para evaluar la actividad de la β -galactosidasa, las células se centrifugaron primero a $5000 \times g$ a 4°C . Luego, los sedimentos se lisaron utilizando 0,5 gramos de perlas de sílice (0,1 mm) en 800 μl de tampón NaPi 0,05 M, pH = 7,0. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de la β -galactosidasa a 30°C utilizando un protocolo estándar.

La Tabla 1 que figura a continuación ilustra los resultados de las cepas de *Propionibacterium* que se examinaron utilizando el protocolo anterior.

Tabla 1

Cepa n°	Actividad total de Bgal		DO600 media		Actividad de Bgal (Unidades Miller)		Especies	Sub-especie
	Media	SD	Media	SD	Media	SD		
N°	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{l}$		AU		$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{Unidad DO}$			
4204	17,6	3,9	2,94	0,10	6,0	1,5	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	
380	15,8	0,7	2,86	0,34	5,6	0,4	<i>Propionibacterium sp .</i>	
2166	0,9	0,3	0,18	0,03	4,8	0,7	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
359	7,9	4,0	1,77	0,90	4,5	0,1	<i>Propionibacterium sp .</i>	
1134	10,6	1,0	2,49	0,07	4,2	0,3	<i>Propionibacterium</i>	<i>shermanii</i>

ES 2 717 826 T3

Cepa n°	Actividad total de Bgal		DO600 media		Actividad de Bgal (Unidades Miller)		Especies	Sub-especie
	Media	SD	Media	SD	Media	SD		
Nº	µmol/min/l		AU		µmol/min/Unidad DO			
							<i>freudenreichii</i>	
364	10,8	1,3	2,91	0,03	3,7	0,4	<i>Propionibacterium jensenii</i>	
2060	8,7	1,1	2,45	0,22	3,5	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
4199	5,9	1,4	1,69	0,44	3,5	0,1	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	
4201	6,4	0,3	1,92	0,02	3,3	0,1	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	
2175	6,8	0,2	2,04	0,06	3,3	0,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2145	8,0	0,6	2,39	0,01	3,3	0,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2168	7,3	1,2	2,36	0,07	3,1	0,6	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freufenreichii</i>
2174	4,5	2,9	1,33	0,68	3,1	0,6	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2173	6,4	0,4	2,06	0,08	3,1	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
384	1,5	0,3	0,53	0,11	2,9	1,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2171	7,7	3,5	3,00	0,00	2,6	1,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
362	5,7	0,6	2,38	0,08	2,4	0,3	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	
2172	4,4	2,2	1,83	0,34	2,3	0,8	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
360	0,6	0,2	0,14	0,22	2,2	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2156	4,4	1,8	2,01	0,46	2,1	0,4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2541	3,2	2,7	1,65	0,18	2,1	1,9	<i>Propionibacterium sp .</i>	
2149	5,4	3,0	2,70	0,04	2,0	1,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
375	5,4	0,5	3,00	0,00	1,8	0,2	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	
2169	4,7	0,6	2,68	0,05	1,8	0,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2146	3,4	0,2	2,37	0,33	1,4	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
374	3,2	5,4	2,42	0,01	1,3	2,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2167	2,9	0,6	2,23	0,06	1,3	0,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2160	3,2	1,1	2,63	0,29	1,2	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2150	0,9	0,5	1,24	1,04	1,1	0,7	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>

ES 2 717 826 T3

Cepa n°	Actividad total de Bgal		DO600 media		Actividad de Bgal (Unidades Miller)		Especies	Sub-especie
	Media	SD	Media	SD	Media	SD		
Nº	µmol/min/l		AU		µmol/min/Unidad DO			
2159	2,7	1,1	2,33	0,30	1,1	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2543	2,1	0,3	1,88	0,01	1,1	0,2	<i>Propionibacterium sp .</i>	
371	1,2	0,0	1,10	0,13	1,1	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
4200	2,6	0,4	2,37	0,11	1,1	0,1	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	
2178	1,2	0,2	1,33	0,54	1,1	0,6	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2164	2,4	0,5	2,28	0,04	1,1	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2162	2,4	1,9	2,04	1,23	1,0	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
367	2,0	0,5	1,93	0,08	1,0	0,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2068	2,2	0,3	2,13	0,12	1,0	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2177	1,9	0,3	1,86	0,12	1,0	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2165	2,4	1,0	2,36	0,02	1,0	0,4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2155	2,7	0,1	2,65	0,11	1,0	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2069	1,9	0,7	1,86	0,69	1,0	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2161	2,2	1,3	2,17	0,31	1,0	0,5	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2066	2,4	0,2	2,47	0,15	1,0	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
365	2,4	0,2	2,50	0,03	0,9	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2544	2,2	0,4	2,32	0,02	0,9	0,2	<i>Propionibacterium sp .</i>	
2158	2,1	1,2	2,24	0,06	0,9	0,5	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
361	2,7	2,1	2,96	0,09	0,9	0,7	<i>Propionibacterium thoenni</i>	<i>shermanii</i>
2163	1,9	0,9	2,11	0,20	0,9	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2154	2,2	0,2	2,56	0,16	0,9	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
382	2,1	0,9	2,41	0,83	0,8	0,1	<i>Propionibacterium sp .</i>	
379	0,9	0,4	1,09	0,07	0,8	0,4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2542	1,9	1,2	2,32	0,05	0,8	0,5	<i>Propionibacterium sp .</i>	
372	1,6	0,4	2,25	0,04	0,7	0,2	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2157	2,0	1,3	2,61	0,38	0,7	0,4	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>

Cepa n°	Actividad total de Bgal		DO600 media		Actividad de Bgal (Unidades Miller)		Especies	Sub-especie
	Media	SD	Media	SD	Media	SD		
Nº	µmol/min/l		AU		µmol/min/Unidad DO			
369	1,4	0,1	2,04	0,04	0,7	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
1256	1,7	0,9	2,40	0,29	0,7	0,3	<i>Propionibacterium sp .</i>	
2144	1,0	0,2	0,93	1,11	0,6	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2179	1,3	0,3	2,12	0,03	0,6	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2170	1,4	0,2	2,33	0,04	0,6	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2336	1,4	0,8	2,48	0,05	0,6	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2181	1,0	0,2	1,82	0,36	0,5	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2176	1,6	0,1	3,13	0,15	0,5	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2147	1,1	0,5	2,10	0,67	0,5	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
370	1,0	0,2	2,05	0,06	0,5	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
383	0,8	0,3	1,87	0,80	0,5	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2663	1,2	0,7	2,60	0,04	0,5	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2182	1,2	0,8	2,62	0,09	0,5	0,3	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2151	1,0	0,1	2,28	0,26	0,4	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2143	0,5	0,0	1,14	0,06	0,4	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2152	0,9	0,1	2,45	0,19	0,4	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2007	0,9	0,2	2,40	0,04	0,4	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
2065	0,9	0,1	2,39	0,11	0,4	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
363	0,6	0,1	1,66	0,07	0,3	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2148	0,7	0,2	1,97	0,07	0,3	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2180	1,0	0,1	3,00	0,00	0,3	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>
2067	0,6	0,1	1,92	0,01	0,3	0,0	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>
1219	0,4	0,2	2,27	0,06	0,2	0,1	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>

Las mayores cepas que expresan β-galactosidasa se incluyeron en la siguiente fase del estudio.

Análisis de la Producción de GOS en las Cepas Elegidas

Se utilizaron los siguientes protocolos de crecimiento:

5 Las cepas de *Propionibacterium* se precultivaron a partir de la reserva de -80°C durante 72 horas a 30°C en 100 ml de medio LB suministrado con 1% de glucosa. Los cultivos se diluyeron 50, 200, 1000 y 4000 veces en una botella de 1 litro llena con medio LB suministrado con 1% de glucosa. El crecimiento se realizó a 30°C durante un tiempo establecido que se había calculado para garantizar un cultivo logarítmico y un cultivo en fase estacionaria en el momento previsto de la recogida.

Análisis de la Actividad de β-galactosidasa en las Cepas Elegidas

10 Para analizar la actividad de la β-galactosidasa, las células se centrifugaron a 5000 x g a 4°C durante 15 minutos. Los sedimentos se volvieron a disolver en 1% del volumen original utilizando un tampón fosfato B (Na₂HPO₄.2H₂O 50 mM, MgCl₂ 1 mM) y luego ocho partes alícuotas de 1250 μl de cada uno de los extractos libres de células se transfirieron a una placa de pocillos profundos.

15 Los sedimentos se lisaron posteriormente utilizando 0,5 gramos de perlas de sílice (0,1 mm) en 800 μl de tampón NaPi 0,05 M a Ph= 7,0 y 4 repeticiones de 30 segundos en un disruptor celular. Los sedimentos lisados del mismo extracto libre de células se recombinaron luego en un solo tubo Geiner de 15 ml. Los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 x g después del período de tiempo indicado utilizando una centrifuga de placa de 96 pocillos. Se disolvieron 20 μl de sobrenadante del lisado celular en 180 μl de tampón fosfato A (8,9 g/l de Na₂HPO₄.2H₂O, 6,9 gramos/l de Na₂HPO₄.H₂O, DTT 1 mM).

20 Adicionalmente, se prepararon diluciones de 10, 100 y 100 veces de la mezcla de tampón fosfato de lisado celular, a las que se añadió una solución madre de ONPG (20 mM en tampón fosfato) hasta una concentración de partida de 1 mM. La absorbancia a 420 nm se observó a lo largo del tiempo utilizando un espectrofotómetro UV/Ultrspec de Pharmacia Biotech 2000 utilizando el software de aplicación Swift II y las Unidades Miller se calcularon utilizando las diluciones indicadas anteriormente.

Protocolo de Síntesis de GOS

25 La actividad se normalizó a 2 mM/min en un volumen total de 10 ml por dilución utilizando tampón fosfato B. Se precalentaron 15 ml de tubos Greiner que contenían 13,5 ml de tampón fosfato B a 30°, 50° y 60°C. La reacción se inició mediante la adición de 1,5 ml de extracto libre de células (2 mM/min de actividad β-galactosidasa) a los tubos Greiner precalentados. Las reacciones procedieron con un intervalo de tiempo de 30 segundos. Luego se transfirieron muestras de 1 ml a un tubo Eppendorf a intervalos de 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 1440 minutos.

30 La reacción de formación de GOS se detuvo luego por incubación a 100°C durante 5 minutos y las muestras se almacenaron inmediatamente a -80°C.

Sobre la base de las actividades de las β-galactosidasas encontradas, se podría predecir la actividad real para la tasa de formación de GOS. Se calcularon los factores de conversión para cada una de las especies.

La Tabla 2 que figura a continuación muestra la tasa de formación de GOS predicha a 30°C.

35 Tabla 2

Cepa	Especies	Subespecie	Actividad de Bgal (Unidades Miller)		Factor de conversión utilizado	Factor de corrección	Tasa de formación pronosticada de GOS
			Media	SD			
Nº			μmol/min/Unidad DO				mM/min/100 unidades DO
4204	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		6,0	1,5	10,8	5,0	0,025
380	<i>Propionibacterium sp</i>		5,6	0,4	10,8	5,0	0,023
2166	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	4,8	0,7	10,8	5,0	0,020

Cepa	Especies	Subespecie	Actividad de Bgal (Unidades Miller)		Factor de conversión utilizado	Factor de corrección	Tasa de formación pronosticada de GOS
			Media	SD			
Nº			µmol/min/Unidad DO				mM/min/100 unidades DO
359	<i>Propionibacterium sp</i>		4,5	0,1	10,8	5,0	0,019
1134	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>	4,2	0,3	10,8	5,0	0,018
364	<i>Propionibacterium jensenii</i>		3,7	0,4	10,8	5,0	0,015
2060	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>	3,5	0,1	10,8	5,0	0,015
4199	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		3,5	0,1	10,8	5,0	0,015
4201	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		3,3	0,1	10,8	5,0	0,014
2175	<i>Propionibacterium Freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,3	0,2	10,8	5,0	0,014
2145	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,3	0,2	10,8	5,0	0,014
2168	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,1	0,6	10,8	5,0	0,013
2174	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,1	0,6	10,8	5,0	0,013

La Tabla 3 que figura a continuación muestra la tasa de formación de GOS predicha a 50°C.

Tabla 3

Cepa	Especies	Subespecie	Actividad de Bgal (Unidades Miller)		Factor de conversión utilizado	Factor de corrección	Tasa de formación pronosticada de GOS
			Media	SD			
no.			µmol/min/Unidad DO				mM/min/100 unidades DO
4204	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		6,0	1,5	10,8	5,0	0,025
380	<i>Propionibacterium sp</i>		5,6	0,4	10,8	5,0	0,023
2166	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	4,8	0,7	10,8	5,0	0,020
359	<i>Propionibacterium sp</i>		4,5	0,1	10,8	5,0	0,019
1134	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>shermanii</i>	4,2	0,3	10,8	5,0	0,018
364	<i>Propionibacterium jensenii</i>		3,7	0,4	10,8	5,0	0,015
2060	<i>Propionibacterium</i>	<i>shermanii</i>	3,5	0,1	10,8	5,0	0,015

Cepa			Actividad de Bgal (Unidades Miller)				
	Especies	Subespecie	Media	SD	Factor de conversión utilizado	Factor de corrección	Tasa de formación pronosticada de GOS
no.			µmol/min/Unidad DO				mM/min/100 unidades DO
	<i>freudenreichii</i>						
4199	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		3,5	0,1	10,8	5,0	0,015
4201	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		3,3	0,1	10,8	5,0	0,014
2175	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,3	0,2	10,8	5,0	0,014
2145	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,3	0,2	10,8	5,0	0,014
2168	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,1	0,6	10,8	5,0	0,013
2174	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>freudenreichii</i>	3,1	0,6	10,8	5,0	0,013

Protocolo de Análisis de GOS

- 5 Se realizó una cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD, por sus siglas en inglés) para llevar a cabo el análisis de GOS. Los análisis HPAEC-PAD se realizaron en un sistema DX-500 BIO-LC (Dionex) equipado con un PAD. Las fracciones de galacto-oligosacáridos se separaron en la columna CarboPac PA1 con las dimensiones de 250 mm x 4 mm t a un caudal de 1 mL/min a 22°C. Se utilizó una columna protectora CarboPac PA1 con dimensiones de 50 * 4 mm d.i. (Dionex) para la protección de la columna. Los eluyentes utilizados para el análisis fueron (A) NaOAc 500 mM + NaOH 100 mM, (B) NaOH 100 mM y (C) agua Milli-Q.
- 10 Los eluyentes A y B se mezclaron para formar el siguiente gradiente: 100% de B de 0 a 5 min, seguido de 0-26% de A en 73 min. Después de cada operación, la columna se lavó con 100% de A durante 6 min y se volvió a equilibrar durante 10 min a 100% de B. La identificación de los picos se realizó sobre la base de la comparación de la distribución de picos del cromatograma de HPLC descrito en *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 8488-8495. La lactosa se utilizó como un patrón para la normalización del tiempo de elución.
- 15 **Resultados**
- Para determinar la relación entre las especies de GOS altamente formadas, se cuantificaron las especies de GOS más frecuentes para *P. jensenii* y se calculó la relación entre las dos especies a diferentes temperaturas y momentos. Tal como se muestra en la Tabla 4 que figura a continuación y se ilustra en la Figura 1, se encontró que la proporción de especies mostró una fuerte dependencia de la temperatura y una pequeña dependencia del tiempo.
- 20 **Tabla 4**

	Tipo de enlace esperado del GOS	Tipo de enlace esperado del GOS		
Cepa	Temp.	Desconocido	β-D-Gal-(1f4)-β-D-Gal-(1f4)-D-Glc	Relación 2:1
<i>Propionibacterium jensenii</i>	Temp = 30 C, Tiempo 5H	0,2	4,2	18,3
<i>Propionibacterium jensenii</i>	Temp = 50 C, Tiempo 5H	1,2	2,9	2,5
<i>Propionibacterium</i>	Temp = 30 C, Tiempo 24H	1,0	12,0	11,8

	Tipo de enlace esperado del GOS	Tipo de enlace esperado del GOS		
Cepa	Temp.	Desconocido	β-D-Gal-(1f4)-β-D-Gal-(1f4)-D-Glc	Relación 2:1
<i>jensenii</i>				
<i>Propionibacterium jensenii</i>	Temp = 50 C, Tiempo 24H	4,4	6,2	1,4

5 Sobre la base de la termodinámica estándar, se asumió que a 50°C la reacción de la β -galactosidasa se produce a una velocidad 4 - 8 veces mayor que a 30°C. Para muestras analizadas en las que la tasa de formación de GOS estaba en una fase en la que se esperaba que fuera lineal, se representaron gráficamente las tasas de formación de GOS. Tal como se muestra en la Tabla 5 que figura a continuación y se ilustra en la Figura 2, no se detectó un aumento significativo de la actividad en ninguna de las cepas de *Propionibacterium*.

Tabla 5

Cepa	Temp.	GOS total
P. jensenii	30°C	4,5
	50°C	4,1

10 La tasa de formación teórica de GOS se calculó en base a la actividad de β -galactosidasa medida en las Unidades Miller en la Fase 2 del estudio. La Tabla 6 que figura a continuación muestra la relación de la tasa de formación real de GOS sobre la tasa de formación teórica de GOS y la Figura 3 muestra esta gráfica tanto para 30°C como para 50°C. Sorprendentemente, y ventajosamente, las tasas de formación de GOS siempre fueron superiores a las tasas teóricas de la formación de GOS.

Tabla 6

Cepa	Nº	GOS Real/Teórico (30C)	GOS Real/Teórico (50C)	Relación
<i>P. jensenii</i>	364	13,6	12,5	0,9
<i>P. freudenreichii</i>	1134	7,9	9,1	1,2
Media		10,8	10,8	1,0

15 La actividad de la β -galactosidasa analizada en la fase inicial de los experimentos pareció ser, en general, mayor que las actividades determinadas en la fase posterior. Para averiguar si existe un error consistente en la metodología, se calcularon las relaciones de las actividades en las fases 1 y 2 (y se muestran en la Tabla 7 que figura a continuación) y se representan en un gráfico que se muestra en la Figura 4. La Figura 4 muestra que para la mayoría de las muestras se detecta una diferencia de 5 veces. Algunas muestras muestran claramente diferencias mucho más altas, y se espera que estas diferencias se deban principalmente a las diferencias en la fase de crecimiento de las células.

Tabla 7

Cepa no	Fase de Crecimiento	Relación Fase 1/Fase 2
364	Log media	7,9
364	Log media	7,9
364	Estacionaria	14,4
1134	Log media	1,5
1134	Estacionaria	5,0
1134	Estacionaria	5,0
4204	Log media	1,2

Cepa no	Fase de Crecimiento	Relación Fase 1/Fase 2
4204	Estacionaria	6,1

5 Para evaluar si la expresión de β -galactosidasa dependía de la fase de crecimiento del organismo, se representó gráficamente la actividad (medida en Unidades Miller) para todas las cepas. La Tabla 8 y la Figura 5 muestran los datos y el gráfico, respectivamente. Se encontró que para la mayoría de las cepas se encontró una relación Log: Stat ≥ 1 que indica que la actividad de la β -galactosidasa es mayor en la fase Log que en la fase estacionaria. Estas diferencias son limitadas y puede ser que el mayor rendimiento de biomasa en la fase estacionaria compense las actividades más bajas de la β -galactosidasa.

Tabla 8

		Relación Log/Stat
<i>Propionibacterium jensenii</i>	364	1,8
<i>Propionibacterium Freudenreichii</i>	1134	3,4
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	4204	4,9

10 Conclusiones

Todas las cepas de *Propionibacterium* produjeron GOS y los extractos libres de células mostraron tasas de formación de GOS aproximadamente similares a 30°C y 50°C. Todas las muestras muestran un perfil de GOS diferente al de GOS producido por la enzima *Apergillus oryzae*. Específicamente, la cepa 364 (*P. jensenii*) mostró rendimientos significativos de producción de GOS. En general, la última fase de síntesis de GOS mostró una actividad de β -galactosidasa 5 veces menor en comparación con la fase de rastreo inicial.

15 Estos experimentos demostraron que era posible que las cepas de *Propionibacterium* produjeran GOS, que podría utilizarse como un medio de crecimiento selectivo para una cepa bacteriana probiótica de *Propionibacterium* elegida con el fin de fomentar el crecimiento en el intestino delgado y ayudar a modular el apetito.

20 Las realizaciones anteriores no pretenden limitar el alcance de protección proporcionado por las reivindicaciones, sino más bien describir ejemplos de cómo se puede poner en práctica la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición prebiótica que comprende un galacto-oligosacárido (GOS) producido a partir de una o más cepas bacterianas de *Propionibacterium*, en donde el GOS actúa como un medio de crecimiento selectivo para las cepas bacterianas de *Propionibacterium*, y en donde el GOS es sustancialmente igual a la forma producida por la reacción de la β -galactosidasa inversa por cepas bacterianas de *Propionibacterium*.
2. Una composición según la reivindicación 1, en donde el GOS se produce y/o es selectivo para una o más de las siguientes cepas bacterianas: *Propionibacterium jensenii*; *Propionibacterium freudenreichii*; *Propionibacterium acidipropionici*, o sub-especies o cepas mutantes de las mismas.
- 10 3. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde el (GOS) se produce a partir de un género o cepa bacteriana de *Propionibacterium* seleccionado y el GOS actúa como un medio de crecimiento selectivo para dicho género o cepa bacteriana de *Propionibacterium* seleccionado.
4. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición está encapsulada.
- 15 5. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición comprende, además, un excipiente o compuesto portador para permitir que pase a través de al menos parte del entorno gastrointestinal del cuerpo y retener sus propiedades funcionales.
6. Una composición según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición está en forma de un líquido o polvo y/o se puede mezclar con un alimento sólido o líquido.
7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso como medicamento.
- 20 8. Una composición según la reivindicación 7, en donde el medicamento es para el tratamiento y/o la gestión de la obesidad.
9. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso como complemento dietético.
10. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en la regulación y/o modulación del apetito en un individuo.
11. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en la gestión del peso.
- 25 12. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en aumentar los niveles de propionato en el intestino delgado de un individuo en el que la composición fomenta el crecimiento de bacterias secretoras de propionato.
- 30 13. Un método para producir galacto-oligosacárido (GOS), que comprende las etapas de cultivar una o más cepas de *Propionibacterium* en un medio de crecimiento que comprende hasta un 50 % de lactosa a una temperatura de hasta 55 °C durante hasta 24 horas en condiciones anaerobias y la recogida de GOS a partir de células de *Propionibacterium*.
14. El método según la reivindicación 13, en el que la una o más cepas de *Propionibacterium* se cultivan en un medio de crecimiento que comprende hasta 40 % de lactosa a una temperatura de hasta 50 °C durante hasta 24 horas.
- 35 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que el GOS se recoge de las células de *Propionibacterium* mediante lisis.
16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que las cepas de *Propionibacterium* se seleccionan de una o más de las siguientes: *Propionibacterium jensenii*; *Propionibacterium freudenreichii*; *Propionibacterium acidipropionici*, o sub-especies o cepas mutantes de las mismas.
- 40 17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el método se utiliza para producir GOS para su uso en una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

Figura 1

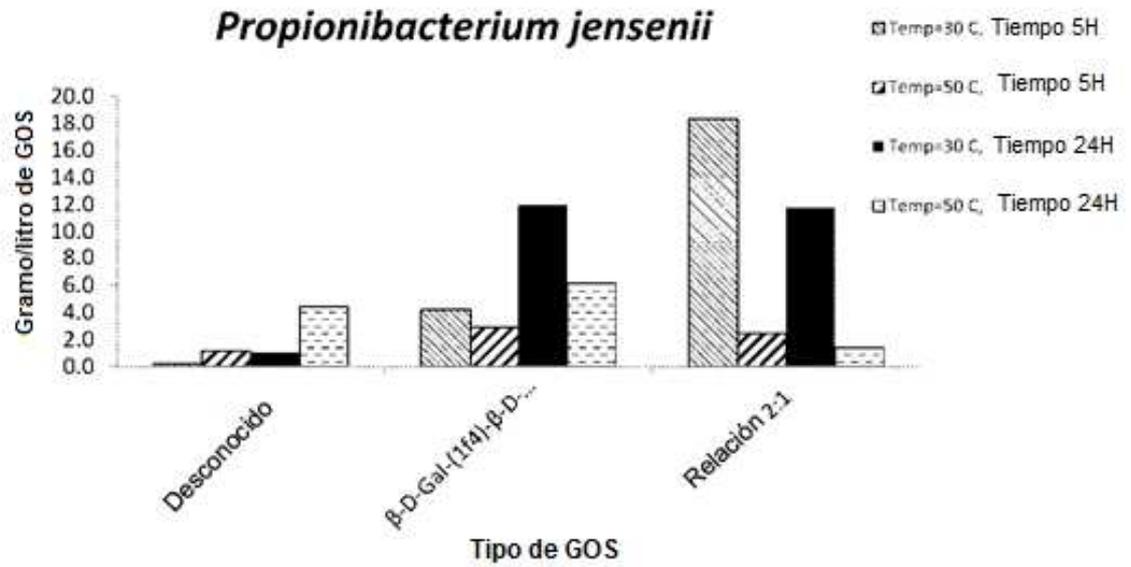


Figura 2

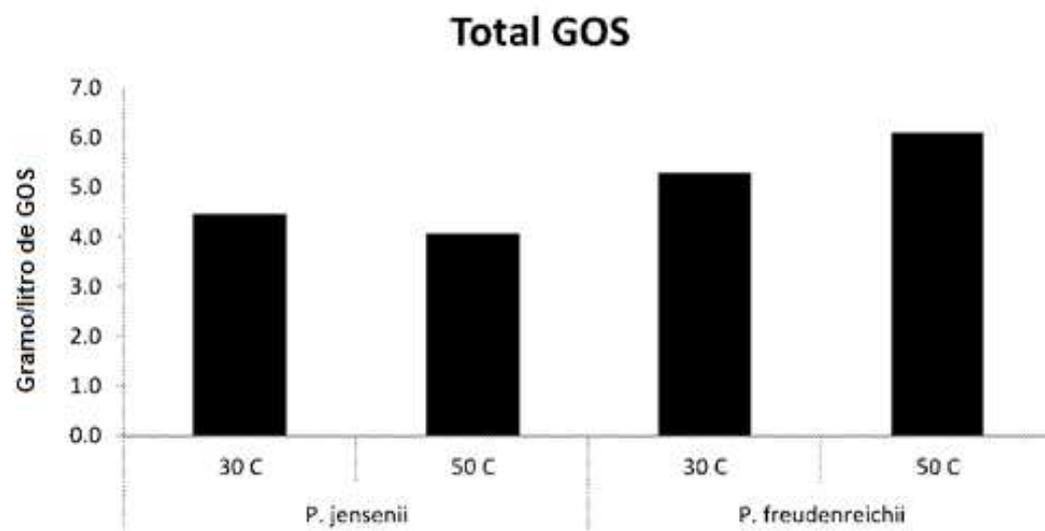


Figura 3

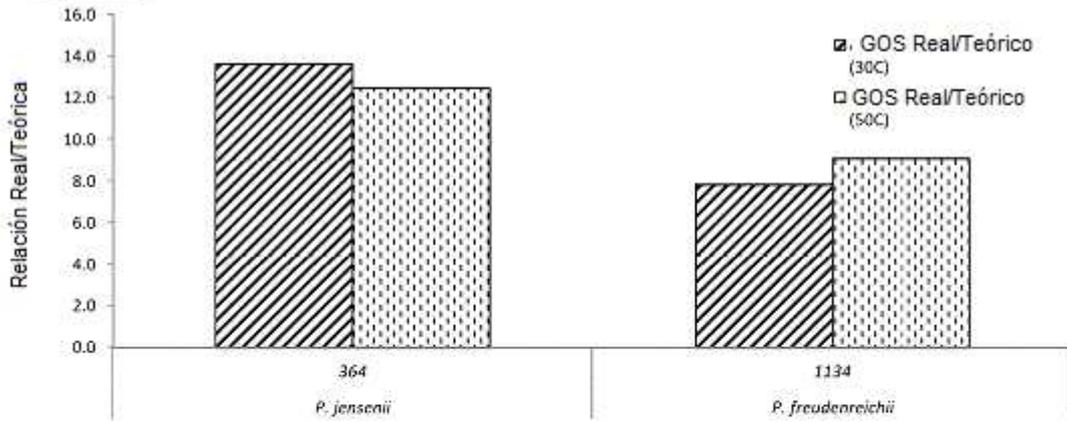


Figura 4

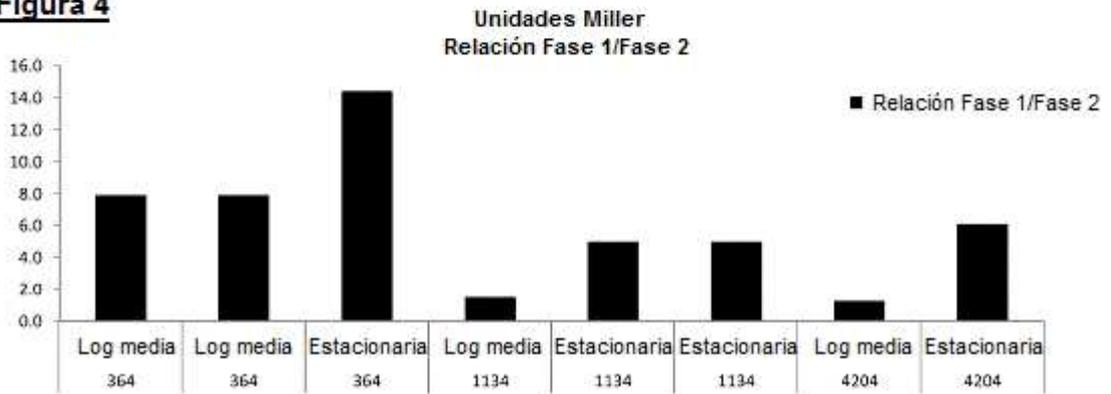


Figura 5

