

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 373**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|---------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C12N 1/20 | (2006.01) | A61K 31/19 | (2006.01) |
| A23K 10/40 | (2006.01) | C12N 15/09 | (2006.01) |
| A23L 33/10 | (2006.01) | | |
| A61K 31/047 | (2006.01) | | |
| A61K 31/7004 | (2006.01) | | |
| A61K 31/702 | (2006.01) | | |
| A61K 35/74 | (2015.01) | | |
| A61P 1/14 | (2006.01) | | |
| A61P 29/00 | (2006.01) | | |
| A61P 43/00 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2015 PCT/JP2015/059670**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15147277**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2015 E 15768326 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3124598**

54 Título: **Bacteria productora de butirato y su uso**

30 Prioridad:

28.03.2014 JP 2014067726

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

15.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SATO, TADASHI;
KUSUHARA, SHIRO;
YOKOI, WAKAE;
ITO, MASAHIKO;
MIYAZAKI, KOUJI y
KUSHIRO, AKIRA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 727 373 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

Bacteria productora de butirato y su uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva bacteria productora de butirato y a una composición para alimentos o bebidas, medicamentos o piensos que comprenden la misma.

10 **Antecedentes de la invención**

Los ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico se producen mediante la fermentación de carbohidratos no digeribles derivados principalmente de los alimentos por bacterias intestinales en el tracto gastrointestinal inferior. Los ácidos grasos de cadena corta no solo se utilizan como fuente de energía primaria para las células epiteliales de la membrana mucosa del intestino grueso, sino que muestran muchos efectos fisiológicos. En particular, se considera que el ácido butírico presenta diversas actividades fisiológicas, tales como un efecto promotor del crecimiento de las células epiteliales, un efecto antiinflamatorio y un efecto de aumento de la motilidad intestinal (Bibliografía no de patente 1 y 2). Además, se ha sugerido que el ácido butírico es importante para la prevención del cáncer colorrectal o la colitis ulcerosa (Bibliografía de patente 1). En los últimos años, se ha descrito que el ácido butírico promueve la secreción de hormonas gastrointestinales del tracto gastrointestinal inferior (Bibliografía no de patentes 3) y aumenta el consumo de energía en los tejidos periféricos a través de la administración oral para suprimir la obesidad y mejorar la resistencia a la insulina (Bibliografía no de patentes 4), por ejemplo.

Ciertas bacterias del género *Lactobacillus* y del género *Bifidobacterium* son conocidas como agentes que promueven un aumento en la concentración de butirato intestinal (Bibliografía de patentes 1). Además, las bacterias pertenecientes a, en particular, *Anaerostipes hadrus* (*Eubacterium hadrum*) (en lo sucesivo, denominado *A. hadrus*) DSM 3319^T, bacteria productora de butirato SSC/2, bacteria productora de butirato SS2/1 y similares se conocen como bacterias productoras de butirato (Bibliografía de patente 5, 6, 7 y 8).

30 **Lista de citas**

Bibliografía de patentes

35 Bibliografía de patentes 1: JP-A-10-084909

Bibliografía no de patentes

40 Bibliografía no de patentes 1: Hamwe HM et al., Review article: the role of butyrate on colonic function. Aliment Pharmacol Ther. 27: 104-119 (2008)

Bibliografía no de patentes 2: Roy CC et al., Short-chain fatty acids: ready for prime time? Nutr Clin Pract. 21: 351-366 (2006)

45 Bibliografía no de patentes 3: Zhou J et al., Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut. Obesity. 14: 683-689 (2006)

Bibliografía no de patentes 4: Gao Z et al., Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. Diabetes. 58: 1509-1517 (2009)

Bibliografía no de patentes 5: Allen-Vercoe et al., Anaerobe 18 (2012) 523-529

Bibliografía no de patentes 6: Applied and Environmental Microbiology (2004) p. 5810-5817

Bibliografía no de patentes 7: J. Bacteriology 2004, 186 (7): 2099-2106

50 Bibliografía no de patentes 8: Bui, T.P.N. et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2014), 64, 787-793.

Sumario de la invención55 **Problemas a resolver por la invención**

Sin embargo, las cantidades de butirato producidas por las cepas bacterianas descritas anteriormente no son suficientes. Por lo tanto, ha habido una demanda de una bacteria que tenga la capacidad de producir butirato más altamente.

60 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una nueva bacteria productora de butirato que tenga la capacidad de producir altos niveles de butirato, y una composición para alimentos o bebidas, medicamentos o piensos que comprenden la bacteria.

65

Medios para resolver los problemas

5 Por consiguiente, los presentes inventores han encontrado que la cantidad de butirato producido aumenta al agregar un sacárido no digerible a una biblioteca de muestras que posee el solicitante, seguido del cultivo. Además, como resultado del cultivo y la selección de la biblioteca utilizando L-sorbosa o D-xilitol como sacárido no digerible, han encontrado una nueva bacteria productora de butirato que tiene una capacidad de producir butirato al menos 1,5 veces superior a la de una cepa de tipo *A. hadrus* YIT 10092^T (DSM 3319^T) cuando se utiliza L-sorbosa como sustrato. También han encontrado que la administración de una composición que comprende la bacteria productora de butirato y un sacárido no digerible a los animales, incluidos los humanos, aumenta la bacteria productora de butirato en el intestino y aumenta la producción de butirato en el intestino. Basándose en estos hallazgos, se ha completado la presente invención.

15 Específicamente, la presente invención proporciona lo descrito en los siguientes apartados [1] a [4].

[1] Una bacteria productora de butirato perteneciente a *Anaerostipes hadrus* (*Eubacterium hadrum*), donde la bacteria productora de butirato es *Anaerostipes hadrus* (*Eubacterium hadrum*) YIT 12354 (NITE BP-01831) o *Anaerostipes hadrus* (*Eubacterium hadrum*) YIT 12355 (NITE BP-01832).

[2] Una composición para alimentos o bebidas, medicamentos o piensos que comprende un sacárido no digerible y una bacteria productora de butirato de acuerdo con [1].

[3] La composición de acuerdo con [2], donde el sacárido no digerible es uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en isomalt, isomaltulosa, D-galactitol, D-xilitol, D-sorbitol, L-sorbosa, maltitol, D-manitol, lactitol y galactooligosacárido.

[4] Un agente potenciador de la producción de butirato que comprende una composición de acuerdo con [2] o [3].

Efectos de la invención

La administración de la bacteria productora de butirato de la presente invención junto con un sacárido no digerible a animales, incluyendo seres humanos, aumenta la bacteria productora de butirato en el intestino y, por consiguiente, aumenta la producción de butirato en el intestino. El aumento de la cantidad de butirato en el intestino aumenta varios efectos fisiológicos basados en el butirato como se mencionó anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra la cantidad de butirato producido cuando se agregaron varios sacáridos no digeribles a 5 muestras (A a E) seleccionadas de la biblioteca.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis filogenético de aislados basados en las secuencias del gen ARNr 16S. Dos aislados (YIT 12354 y YIT 12355) se indican en negrita. El árbol filogenético se preparó mediante el método de unión de vecinos, y se describió un número en una posición con un valor de remuestreo con reemplazo (*bootstrap*) del 50 % o más (1.000 repeticiones). La barra de escala representa que la sustitución de la base ocurrió 0,01 veces en el locus.

La Figura 3 muestra la cantidad de butirato producido cuando se cultivó una bacteria productora de butirato en un medio con un sacárido no digerible como sustrato.

La Figura 4 muestra la proporción entre butirato y ácidos grasos de cadena corta totales cuando se cultivó una bacteria productora de butirato en un medio con un sacárido no digerible como sustrato.

La Figura 5 muestra una concentración de butirato cuando un sacárido no digerible y *A. hadrus* YIT 12355 se añadieron a las heces del ratón.

La Figura 6 muestra la proporción entre butirato y ácidos grasos de cadena corta totales cuando se añadió un sacárido no digerible y *A. hadrus* YIT 12355 a las heces del ratón.

50 La Figura 7 muestra el perfil DGGE del gen del ARNr 16S derivado de la bacteria en el contenido cecal después de la administración de un sacárido no digerible y *A. hadrus* YIT 12355 a un ratón.

La Figura 8 muestra el efecto del uso combinado de maltitol y *A. hadrus* YIT 12355 en un sistema de cultivo de heces de ratón.

55 Modos de realización de la invención

La bacteria productora de butirato de la presente invención pertenece a *A. hadrus* (*Eubacterium hadrum*), y la cantidad de butirato producido por la bacteria con L-sorbosa como sustrato es al menos 1,5 veces la de *A. hadrus* (*Eubacterium hadrum*) YIT 10092^T, que es una cepa tipo de *A. hadrus* (*Eubacterium hadrum*). La cantidad de butirato producido con L-sorbosa como sustrato es preferiblemente de 1,5 a 2,5 veces, más preferiblemente de 1,5 a 2,0 veces, incluso más preferiblemente de 1,5 a 1,7 veces la de YIT 10092^T.

A diferencia de *A. hadrus* YIT 10092^T, la bacteria productora de butirato de la presente invención puede producir butirato con D-xilitol como sustrato.

65

En este contexto, la cantidad de butirato producido con L-sorbose o D-xilitol como sustrato es la cantidad de butirato producido por cultivo en un medio complementado con solo L-sorbose o D-xilitol como sacárido. La composición del medio y las condiciones de cultivo pueden ser condiciones adecuadas para el cultivo habitual de bacterias productoras de butirato. Por ejemplo, la cantidad de butirato producido puede medirse descongelando una solución madre congelada de la cepa bacteriana (una solución 10 % (p/v) de leche desnatada y glutamato sódico 2 % en la cual se suspenden las células bacterianas) (recuento de células: 2,0 a $5,5 \times 10^{10}$ células/ml), inoculando la solución al 1 % a 4 ml de un medio líquido PY (peptona-extracto de levadura) complementado con acetato sódico 33 mM y 0,5 % (p/v) de glucosa (medio PYGA), seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas, inoculando después la solución de cultivo al 1 % a un medio PYGA, seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas, inoculando después la solución de cultivo al 1 % a un medio PY que contiene acetato sódico 33 mM y 0,5 % (p/v) de L-sorbose o D-xilitol, seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas, y después midiendo la concentración de butirato en la solución de cultivo.

Para confirmar un recuento de células después del cultivo, se prefiere medir la turbidez (DO_{660}) después del cultivo en un medio PYGA y/o el cultivo en un medio PY que contiene acetato sódico 33 mM y L-sorbose o D-xilitol 0,5 % (p/v).

La medición de la concentración de butirato en la solución de cultivo no está particularmente limitada siempre que el método sea capaz de medir la concentración de butirato. Por ejemplo, la concentración de butirato en la solución de cultivo se puede medir mediante cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de iones (HPLC).

La bacteria productora de butirato de la presente invención tiene la propiedad de poder producir butirato incluso en un medio que contiene solo ácido acético (o una sal del mismo) como un ácido graso de cadena corta, y no un medio que contiene muchos tipos de ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, un medio YCFA que contiene ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido isovalérico y ácido valérico).

La bacteria productora de butirato de la presente invención incluye *A. hadrus* (*Eubacterium hadrum*) YIT 12354 (NITE BP-01831) (en lo sucesivo denominada YIT 12354) y *A. hadrus* (*Eubacterium hadrum*) YIT 12355 (NITE BP-01832) (en lo sucesivo denominada YIT 12355).

La bacteria productora de butirato de la presente invención se puede aislar de la biblioteca o similar, por ejemplo, inoculando una porción de la biblioteca, bacterias recogidas de la naturaleza, o similares a un medio líquido complementado con un sacárido no digerible como única fuente de azúcar, seguido de cultivo, extendiendo a continuación la solución de cultivo sobre un medio de placa, seleccionando las colonias en crecimiento y midiendo la capacidad de producir butirato. Más específicamente, una solución diluida de la biblioteca, las bacterias recogidas de la naturaleza o similares se inoculan en un medio líquido complementado con un sacárido no digerible como única fuente de azúcar, seguido de cultivo. Por otro lado, la solución diluida se inocula en un medio líquido sin el sacárido no digerible, seguido de cultivo. Después del cultivo, una porción de cada solución de cultivo se extiende sobre un medio de placa de agar complementado con un sacárido no digerible como única fuente de azúcar, y se observan las colonias en crecimiento. Las colonias obtenidas del medio líquido complementado con un sacárido no digerible se comparan con las colonias obtenidas del medio líquido sin el sacárido no digerible para seleccionar aquellas que difieren en morfología. La cepa bacteriana seleccionada se cultiva anaeróticamente en un medio líquido que es un medio líquido PYA (un medio PY complementado con acetato sódico 33 mM) complementado con un sacárido no digerible como L-sorbose como única fuente de azúcar. La concentración de butirato en la solución de cultivo se puede medir. En este contexto, la concentración del sacárido no digerible a agregar es preferiblemente de 0,1 a 5,0 (p/v), más preferiblemente de 0,2 a 1,0 (p/v), incluso más preferiblemente de 0,4 a 0,6 % (p/v). El cultivo es preferiblemente un cultivo anaerobio a una temperatura de 30 a 40 °C durante 12 a 48 horas, más preferiblemente un cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas.

La bacteria productora de butirato de la presente invención puede utilizar una amplia gama de tipos de carbohidratos y tiene la capacidad de producir butirato incluso cuando se cultiva usando un sacárido no digerible tal como L-sorbose o D-xilitol, que es difícil de utilizar por otras bacterias, como sustrato. Como se describe en los ejemplos que se mencionan más adelante, como resultado de realizar un análisis filogenético basado en las secuencias del gen del ARNr 16S, la bacteria productora de butirato de la presente invención se clasifica en *A. hadrus*. Como resultado de la comparación de sus propiedades bioquímicas con las de la cepa tipo *A. hadrus* YIT 10092^T, estas difieren en la actividad enzimática y en la utilización del azúcar. Por lo tanto, la bacteria productora de butirato de la presente invención se ha identificado como una nueva cepa bacteriana diferente de la cepa tipo. YIT 12354 e YIT 12355 se depositaron el 19 de marzo de 2014 con números de acceso NITE BP-01831 y NITE BP-01832, respectivamente, en el Depositario del Organismo Internacional de Patentes del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (2-5-8 120, Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón).

La bacteria productora de butirato de la presente invención no tiene problemas asociados con la seguridad y tiene la capacidad de producir butirato con un sacárido no digerible como sustrato. Por lo tanto, una composición que comprende la bacteria productora de butirato de la presente invención y un sacárido no digerible es útil como una composición para alimentos o bebidas, medicamentos o piensos. La composición produce butirato en el intestino de los animales, incluidos los seres humanos, y como tal, es útil como agente potenciador de la producción de butirato.

El ácido butírico, como se mencionó anteriormente, no solo se utiliza como fuente de energía para las células epiteliales de la membrana mucosa del intestino grueso, sino que también tiene un efecto promotor del crecimiento de las células epiteliales, un efecto antiinflamatorio y un efecto de mejora de la motilidad intestinal y además tiene un efecto preventivo o terapéutico sobre el cáncer colorrectal y la colitis ulcerosa, y un efecto regulador del metabolismo energético. Por lo tanto, la composición de la presente invención es particularmente útil como un medicamento, un producto alimenticio o bebida o un alimento que tiene estas actividades fisiológicas.

Los ejemplos de sacáridos no digeribles incluyen: monosacáridos y disacáridos tales como L-sorbosa, D-xilosa, isomaltulosa, lactulosa y D-trehalosa; alcoholes de azúcar tales como isomalt, D-galactitol, D-xilitol, D-sorbitol, maltitol, D-manitol, eritritol y lactitol; oligosacáridos tales como galactooligosacáridos, fructooligosacáridos, lactosucrosa, isomaltooligosacáridos, oligosacáridos de soja, nigerooligosacáridos, gentiooligosacáridos, oligosacáridos de pectina y ciclodextrina; cebada germinada; inulina; dextrina no digerible; y almidón resistente. Entre ellos, se prefieren uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en sacáridos no digeribles utilizables por la bacteria productora de butirato de la presente invención, en particular, isomalt, isomaltulosa, D-galactitol, D-xilitol, D-sorbitol, L-sorbosa, maltitol, D-manitol, lactitol y galactooligosacárido.

La composición de la presente invención contiene preferiblemente 10^4 ufc a 10^{14} ufc de la bacteria productora de butirato como células vivas. La composición de la presente invención contiene preferiblemente de 0,01 % (p/v) a 90 % (p/v), más preferiblemente de 0,05 % (p/v) a 50 % (p/v) de sacárido no digerible.

La composición de la presente invención puede estar en una forma adecuada para cada producto alimenticio o bebida, medicamento o pienso. En el caso de un medicamento, la composición de la presente invención puede mezclarse con, por ejemplo, un vehículo no tóxico farmacéutico sólido o líquido y usarse en forma de una preparación farmacéutica convencional. Los ejemplos de tal preparación incluyen formulaciones sólidas tales como comprimidos, gránulos, polvos y cápsulas, formulaciones líquidas tales como solución, suspensiones y emulsiones, y preparaciones liofilizadas. Estas preparaciones se pueden preparar por medios convencionales para la formulación. Los ejemplos del vehículo farmacéutico no tóxico incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, dextrina, glicérido de ácido graso, polietilenglicol, hidroxietil almidón, etilenglicol, éster de ácido graso de sorbitán polioxietileno, aminoácidos, gelatina, albúmina, agua y solución salina fisiológica. Si es necesario, también se pueden agregar aditivos convencionales tales como un estabilizador, un agente humectante, un emulsionante, un aglutinante, un agente de tonicidad y un excipiente apropiadamente a las preparaciones.

En el caso de un producto alimenticio o bebida, la composición de la presente invención puede estar en cualquiera de las formas sólidas y líquidas, por ejemplo. En el caso de un producto alimenticio o bebida, la composición de la presente invención puede estar contenida tal cual o contenida con diversos componentes nutrientes. Específicamente, la composición de la presente invención se puede formar como una forma comestible, es decir, gránulos, granos, comprimidos, cápsulas, pastas o similares, usando un medio convencional apropiadamente usando aditivos utilizables para productos alimenticios o bebidas. Los ejemplos del tipo de producto alimenticio o bebida incluyen: productos alimenticios que incluyen productos cárnicos procesados como jamón y salchichas, productos alimenticios procesados de pesca como Kamaboko (pescado picado y al vapor) y Chikuwa (salchicha de pescado), pan, confitería, mantequilla y leche en polvo; y productos de bebida como agua, zumo de frutas, leche, refrescos y bebidas de té. Lo mismo se aplica a los piensos.

Cuando se administra a animales que incluyen seres humanos, la composición de la presente invención se administra preferiblemente por vía oral desde el punto de vista de producir butirato en el intestino. La dosis de la misma es preferentemente de $1,0 \times 10^4$ ufc o más, más preferiblemente $1,0 \times 10^8$ ufc a $1,0 \times 10^{12}$ ufc en términos de un recuento viable como la bacteria productora de butirato por día.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1 (Aislamiento de una bacteria productora de butirato)

(1) Efectos promotores de la producción de butirato de varios sacáridos no digeribles mediante el cultivo de la biblioteca de muestras

Se seleccionaron cinco muestras (A a E) de la biblioteca de muestras que poseía el solicitante y cada una se transfirió a una caja de guantes y se transfirieron 20 g de cada muestra a una bolsa homogeneizadora PYXON-30 (fabricada por ELMEX) con un filtro. Cada muestra se diluyó 10 veces mediante la adición de una solución tampón de fosfato sódico 0,1 M anaeróticamente sustituida (pH 6,8) a la misma en 9 veces la cantidad de cada muestra. A continuación se filtró la mezcla a través del filtro y el residuo se eliminó para preparar una solución de muestra diluida. Se añadieron 0,5 ml (concentración final de sacárido: 0,5 % (p/v)) de una solución al 10 % (p/v) de cada sacárido, es decir, cebada germinada (GBF), L-arabinosa, D-galactitol, galactooligosacárido, D-xilitol, D-xilosa, D-sorbitol, L-sorbosa, maltitol, D-manitol o fructooligosacáridos a 9,5 ml de la solución de muestra diluida, seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Como se ve en la Figura 1, la cantidad de butirato producido se incrementó mediante la adición de cada sacárido no digerible a las cinco muestras (A a E) y al cultivo posterior. Por lo tanto, se confirmó que la biblioteca contenía una bacteria productora de butirato.

5 (2) Aislamiento de YIT 12354 y YIT 12355

Dos de las muestras (C y E) se transfirieron a una caja de guantes. Cada muestra se homogeneizó suficientemente, y luego una porción de la misma se transfirió a una bolsa de homogeneizador PYXON-30 (fabricada por ELMEX) con un filtro. Cada muestra se homogeneizó mediante la adición de un tampón de fosfato sódico 0,1 M anaeróticamente sustituida (pH 6,8) a la misma en 9 veces la cantidad de cada muestra, y se eliminó el residuo. La solución de muestra diluida se inoculó al 0,5 % en un medio líquido PY (Tabla 1), un medio líquido PY complementado con 0,5 % (p/v) de L-sorbosa (PYS), o un medio líquido PY complementado con 0,5 % (p/v) de D-xilitol (PYX), seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. Después del cultivo, se diluyó la solución de cultivo 10⁶⁻⁷ veces con PBS anaeróticamente sustituido y se extendió sobre un medio de placa de agar PY, PYS o PYX, seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 72 horas. Entre las colonias cultivadas en el medio de placa PYS o PYX, se seleccionaron colonias que diferían en morfología de las cultivadas en el medio de placa PY y se inocularon en un medio líquido PYS o PYX, seguido de un cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. Estos aislados se examinaron en busca de cepas que producen butirato en la solución de cultivo. Como resultado, se seleccionaron dos aislados (YIT 12354 y YIT 12355).

[Tabla 1]

Composición del medio PY (por 1 l)

| | |
|---|---------|
| Peptona | 5,0 g |
| Tripticasa peptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 10,0 g |
| Solución de resazurina 0,1 % | 1,0 ml |
| Solución salina I* ¹ | 40,0 ml |
| Solución salina II* ² | 20,0 ml |
| Solución de hemina 0,05 % | 10,0 ml |
| Carbonato sódico 8 % | 50,0 ml |
| Clorhidrato de L-cisteína monohidratado | 0,5 g |
| Solución de vitamina K ₁ en etanol 1 % | 0,1 ml |

Anaeróticamente sustituido con gas CO₂, pH 6,9.

El medio de la placa se preparó añadiendo 1,6 % de agar a la composición anterior.

Esterilizado en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos

*1: Solución salina I (por 1 l)

| | |
|------------------------------------|---------|
| Cloruro de calcio | 0,2 g |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | 0,048 g |
| Cloruro sódico | 1,0 g |
| Dihidrógeno fosfato potásico | 1,0 g |
| Bicarbonato sódico | 2,0 g |

*2: Solución salina II (por 1 l)

| | |
|------------------------------|--------|
| Hidrógeno fosfato dipotásico | 20,0 g |
|------------------------------|--------|

Ejemplo 2 (Característica de YIT 12354 e YIT 12355 - 1)

30 (1) Cantidad de butirato producido

1) Producción de butirato por cada cepa bacteriana a partir de L-sorbosa y D-xilitol

Se descongeló una solución madre congelada de cada cepa bacteriana (una solución de leche desnatada 10 % (p/v)-glutamato sódico 2 % en la cual se suspendieron las células bacterianas) (recuento de células: 2,0 a 5,5 x 10¹⁰) y la solución se inoculó al 1 % a 4 ml de un medio líquido PY complementado con acetato sódico 33 mM y 0,5 % (p/v) de glucosa (medio PYGA), seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. Después del cultivo, la solución de cultivo se inoculó al 1 % en un medio PYGA nuevo, seguido de un cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. Después del cultivo, se midió la turbidez (DO₆₆₀) de la solución de cultivo. A continuación, la solución de cultivo se inoculó al 1 % en un medio PY que contenía de L-sorbosa o D-xilitol 0,5 % (p/v) y acetato sódico 33 mM (el medio que contenía L-sorbosa: PYS y el medio que contenía D-xilitol: PYXA), seguido por cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. A continuación se midió la turbidez (DO₆₆₀).

Una vez completado el cultivo, la concentración de ácido orgánico en la solución de cultivo se cuantificó mediante HPLC de exclusión iónica. En esta operación, se utilizó una solución de cultivo en un medio PY complementado con

acetato sódico pero sin L-sorbose o D-xilitol (medio PYA) como blanco.

[Tabla 2]

| (Resultados de la medición de la turbidez) Turbidez (DO ₆₆₀) después del cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas en medio líquido PYGA | | | |
|--|-------------------------------|-----------|-----------|
| Turbidez (DO ₆₆₀) | | | |
| | YIT 10092 ¹ | YIT 12354 | YIT 12355 |
| | 2,80 | 2,76 | 3,55 |
| Turbidez (DO ₆₆₀) después del cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas de inóculo al 1 % en PYSA o PYXA | | | |
| Medio | Turbidez (DO ₆₆₀) | | |
| | YIT 10092 ¹ | YIT 12354 | YIT 12355 |
| PYSA | 2,56 | 2,26 | 2,39 |
| PYXA | 0,11 | 1,09 | 1,47 |

5 (Condiciones de análisis de la HPLC)

Eluyente: ácido perclórico 15 mM – acetonitrilo 7 %

10

Ajustador de pH: ácido perclórico 15 mM-tris(hidroximetil)aminometano 60 mM-acetonitrilo 7 %

Columna de separación: columna de análisis de ácidos orgánicos RSpak KC-811 × 2 (fabricada por Showa Denko K.K.)

15

Temperatura de la columna: 42 °C

Volumen de la muestra inyectada: 10 µl.

Caudal: 1,0 ml/min

20

Tiempo de análisis: 35 min.

Detector: Detector de conductividad eléctrica Waters 432.

25

Temperatura de la celda: 45 °C

La cantidad de butirato producido se calculó de acuerdo con (Expresión 1).

(Expresión 1)

30

Cantidad de butirato producido = (Cantidad de butirato producido por cultivo durante 24 horas en un medio PYSA o PYXA) - (Cantidad de butirato producido por cultivo durante 24 horas en un medio PYA)

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

35

[Tabla 3]

| Cantidades de butirato producido por diversas cepas bacterianas a partir de L-sorbose y D-xilitol | | |
|---|---|-----------|
| Cepa bacteriana | Cantidad de butirato producido (mmol/l) | |
| | L-sorbose | D-Xilitol |
| <i>A. hadrus</i> YIT 10092 ¹ | 9,7 | -0,1 |
| Aislado YIT 12354 | 14,8 | 31,0 |
| Aislado YIT 12355 | 15,4 | 31,9 |

De la Tabla 3, las cantidades de butirato producido por los dos aislados en presencia de L-sorbose eran en ambos casos al menos 1,5 veces la de la cepa tipo. La cepa tipo no pudo producir butirato utilizando D-xilitol, mientras que los dos aislados produjeron butirato cuando se usó D-xilitol como sustrato.

40

2) Cantidad de butirato producido por cultivo en medio complementado con acetato o lactato.

45

Cada solución bacteriana cultivada en un medio líquido PYGA en las mismas condiciones que las descritas en el párrafo anterior 1) se inoculó al 1 % en un medio PYA que contenía acetato sódico 33 mM y se complementó adicionalmente con lactato sódico 40 mM, seguido de un cultivo anaerobio en 37 °C durante 24 horas. Una vez completado el cultivo, se analizó la concentración de ácido orgánico en la solución de cultivo mediante HPLC de exclusión iónica. Las condiciones de análisis fueron las mismas que las descritas en el párrafo anterior 1). La

cantidad de butirato producido se calculó de acuerdo con (Expresión 2).

(Expresión 2)

- 5 Cantidad de butirato producido = (Cantidad de butirato producido por cultivo durante 24 horas en un medio PYA complementado con lactato sódico 40 mM) - (Cantidad de butirato producido por cultivo durante 24 horas en un medio PYA sin lactato sódico 40 mM)

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

10

[Tabla 4]

| Cepa bacteriana | Cantidad de butirato producido (mmol/l) |
|-------------------|---|
| Aislado YIT 12354 | 16,5 |
| Aislado YIT 12355 | 19,9 |

- 15 La bibliografía no de patente 6 establece que las cantidades de butirato producido por las bacterias productoras de butirato SS2/1 y SSC/2 cuando se cultivan a 37 °C durante 24 horas en un medio YCFA (ácido acético 33 mM + ácido propiónico 9 mM + ácido isobutírico 1,2 mM + ácido isovalérico 1,0 mM + ácido valérico 1,0 mM) complementado con lactato 35 mM fue 12,98 mM y 13,49 mM, respectivamente.

- 20 Se descubrió que la bacteria productora de butirato de la presente invención tiene la propiedad de poder producir butirato incluso en un medio que contiene solo ácido acético (o una sal del mismo) como un ácido graso de cadena corta, y no un medio que contiene muchos tipos de ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, un medio YCFA). Además, la cantidad de butirato producido fue mayor que la de SS2/1 y SSC/2.

(2) Resultados del análisis filogenético de aislados basados en secuencias del gen del ARNr 16S

- 25 El ADN se extrajo mediante el método de perlas-fenol de la solución de cultivo de cada cepa bacteriana, y se amplificó la longitud completa del ADNr 16S por PCR. A continuación, se secuenció casi toda la secuencia. La secuencia obtenida se sometió a búsqueda FASTA utilizando el Banco de datos de ADN de Japón (DDBJ) y se verificó con la base de datos de secuencias de especies bacterianas conocidas. Además, la secuencia de cada aislado se analizó filogenéticamente mediante el método de unión de vecinos (NJ) utilizando Clustal X, y el árbol filogenético se preparó utilizando el programa Tree-View.

30

Los resultados se muestran en la Figura 2.

- 35 Como resultado de la realización del análisis filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S (aproximadamente 1.450 pb) de YIT 12354 y YIT 12355, ambas cepas se posicionaron en un subgrupo del género *Anaerostipes* en el Clúster Clostridial XIVA y además presentaron un 99,7 % y 99,8 % de identidad, respectivamente, con la secuencia de *A. hadrus* YIT 10092¹, que es una cepa tipo de *A. hadrus* (= *Eubacterium hadrum*). A partir de estos resultados, se determinó que tanto YIT 12354 como YIT 12355 se clasificaban en *A. hadrus*.

- 40 (3) Comparación de las propiedades bioquímicas de diversas cepas bacterianas

En el ensayo de las propiedades bioquímicas de varias cepas bacterianas se utilizaron las cepas comercializadas API-ZYM, Rapid ID32A API y API KENKI 20A (SYSMEX bioMerieux Co., Ltd.). El método de ensayo siguió los manuales del producto.

45

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 5]

| Comparación de las propiedades bioquímicas de diversas cepas bacterianas | | | |
|--|---|-----------|----------------|
| Parámetro de ensayo | <i>A. hadrus</i> YIT 10092 ¹ | YIT 12354 | YIT 12355 |
| Actividad enzimática | | | |
| Fosfatasa alcalina | - | + | + |
| Fosfatasa ácida | + | + | + |
| Naftol-AS-B1-fosfohidrolasa | + | + | + |
| Esterasa (C ₄) | + | - | + |
| β-Galactosidasa | + | + | + |
| β-Galactosidasa-6-fosfato | + | - | - |
| α-Glucosidasa | - | - | + ^d |
| Fermentabilidad de sacárido | | | |
| Aesculina | - | - | + |
| L-Arabinosa | + | + | + |
| D-Celobiosa | + | - | + ^d |

(continuación)

| Comparación de las propiedades bioquímicas de diversas cepas bacterianas | | | |
|--|---|----------------|----------------|
| Parámetro de ensayo | <i>A. hadrus</i> YIT 10092 ¹ | YIT 12354 | YIT 12355 |
| Glicerol | - | - | + ^d |
| Maltosa | + ^d | + ^d | + |
| D-manitol | + | + | + |
| Salicina | + | - | + |
| L-sorbitol | + | + | + |
| D-Rafinosa | - | + ^d | - |
| L-Ramnosa | - | - | + |
| D-xilosa | + | + | + |

+, reacción positiva; -, reacción negativa; +^d reacción débil

5 Como se ve en la Tabla 5, se determinó que estas tres cepas bacterianas exhibían propiedades similares, que, sin embargo, no eran las mismas propiedades y se diferenciaban entre sí al nivel de la cepa. Las tres cepas bacterianas fueron bacilos grampositivos.

10 A partir de estos resultados, YIT 12354 y YIT 12355 se determinaron como nuevas cepas bacterianas y se depositaron con los números de acceso NITE BP-01831 y NITE BP-01832, respectivamente, en el Depositario del Organismo Internacional de Patentes del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación.

10 Ejemplo 3 (Característica de YIT 12354 e YIT 12355 - 2)

a) Sacárido no digerible

15 Se usaron como como sacáridos no digeribles galactooligosacárido (GOS), maltitol, D-manitol, lactitol, isomalt, isomaltulosa, L-sorbosa y D-sorbitol. Estos sacáridos no digeribles utilizados, excepto el GOS, fueron de grado reactivo. El GOS utilizado fue el Oligomate 55N comercializado (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.), del cual se habían eliminado las fracciones de monosacárido y lactosa (fracciones digeribles y absorbibles por el tracto gastrointestinal superior) utilizando una columna de carbón activado. Específicamente, se añadió una solución de sacárido diluida con agua purificada a una columna empaquetada con carbón activado (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) hinchada en agua purificada, y la columna se lavó con una solución de etanol al 2 %, seguida de la elución de una fracción no digerible con una solución de etanol al 50 %. El eluato se secó a presión reducida y se usó la solución de sacárido GOS obtenida.

25 b) Cepa bacteriana utilizada

Se utilizaron dos aislados de *A. hadrus* YIT 10092^T (DSM 3319^T), que es una cepa tipo de *A. hadrus* (una bacteria humana típica intestinal que produce butirato).

30 c) Evaluación de la capacidad para producir butirato

35 Cada una de estas cepas bacterianas se cultivó anaeróbicamente a 37 °C durante 24 horas en un medio PYA que contenía acetato sódico 33 mM complementado con D-glucosa al 0,5 % (medio PYGA). La solución de cultivo se inoculó al 1 % en un medio PYA que contenía 0,5 % (p/v) de cada sacárido no digerible (medio de prueba), seguido de un cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. Una vez completado el cultivo, se analizó la concentración de ácido orgánico en la solución de cultivo mediante HPLC de exclusión iónica. Las condiciones de análisis fueron las mismas que las descritas anteriormente en el Ejemplo 2. Después de la cuantificación de la concentración de ácido orgánico, la cantidad de butirato producido a partir de cada sacárido no digerible y la proporción entre butirato y ácidos grasos de cadena corta totales se calcularon de acuerdo con las siguientes expresiones

40 (Expresión 3)

(Cantidad de butirato producido) = (Cantidad de butirato en el medio de prueba después del cultivo) - (Cantidad de butirato en el medio PYA sin cada sacárido no digerible después del cultivo)

45 (Proporción de butirato) = (Cantidad de butirato en el medio de prueba después del cultivo) / (Cantidad de acetato + Cantidad de propionato + Cantidad de butirato) en el medio de prueba después del cultivo) x 100

50 Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4. En las Figuras 3 y 4, se puede ver que YIT 12354 e YIT 12355 eran capaces de utilizar sacáridos no digeribles más que la cepa de tipo YIT 10092^T, y también eran capaces de producir una mayor cantidad de butirato. Las cantidades de butirato producido por los dos aislados en presencia de L-sorbosa eran al menos 1,5 veces la de la cepa tipo. También se observó que la proporción entre butirato y ácidos grasos de cadena corta total es más alta que la de la cepa de tipo YIT 10092^T.

55

Ejemplo 4 (Butirato producido mediante la adición de cada sacárido no digerible e YIT 12355 en heces de ratón, y proporción entre butirato y ácidos grasos de cadena corta totales)

Se diluyeron 0,8 g de heces de ratón 12,5 veces con PBS, y se añadió al mismo 0,5 % de cada sacárido no digerible (lactitol, maltitol, D-manitol, D-sorbitol, L-sorbosa o D-xilitol) y 1,0 % de YIT 12355 precultivada en un medio PYGA, seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. Además, también se cultivó un medio sin cada sacárido no digerible igual que antes. Una vez completado el cultivo, se analizó la concentración de ácido orgánico en la solución de cultivo mediante HPLC de exclusión iónica. Las condiciones de análisis fueron las mismas que las descritas anteriormente en el Ejemplo 2. Después de la cuantificación de la concentración de ácido orgánico, la cantidad de butirato producido y la proporción de butirato se calcularon de acuerdo con la misma expresión que (Expresión 3).

Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6. Como se muestra en las Figuras 5 y 6, la producción de butirato se incrementó en gran medida por la adición de la combinación de la bacteria productora de butirato de la presente invención y el sacárido no digerible, en comparación con el caso de la adición del sacárido no digerible solo y el caso de la adición de la bacteria productora de butirato de la presente invención solo. La proporción entre butirato y ácidos grasos de cadena corta totales también se incrementó en gran medida por la adición de la combinación de la bacteria productora de butirato de la presente invención y el sacárido no digerible, en comparación con el caso de la adición del sacárido no digerible solo y el caso de la adición de la bacteria productora de butirato de la presente invención solo.

Ejemplo 5 (Prueba de dosis oral múltiple de YIT 12355 en ratón administrado con sacárido no digerible)

1) Diseño de la prueba

El esquema global de la prueba se muestra en la Tabla 6. Los ratones se aclimataron y criaron con pienso F2 (fabricado por Funabashi Farm Co., Ltd.) durante 1 semana y luego se dividieron en 6 grupos, de manera que el peso corporal promedio fue casi igual entre estos grupos. A continuación, se administró una dieta control (Tabla 7) durante 1 semana y se reemplazó con pienso purificado que contenía un material no digerible, que luego se administró durante 2 semanas. Se administró por vía oral dos veces por semana una suspensión de células vivas de YIT 12355, un total de 4 veces utilizando una sonda. El último día de la prueba, se diseccionó cada ratón y se recuperaron los contenidos cecal y colónico y se examinaron para determinar la concentración de ácido orgánico. Además, se hizo el recuento de células de YIT 12355 en el contenido del tracto intestinal mediante PCR cuantitativa, mientras que el cambio en toda la flora intestinal se examinó mediante el uso de PCR-DGGE (electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante).

<Sistema de la prueba>

Animal utilizado: ratón C57BL/6J (4 semanas de edad; CLEA Japan, Inc.)

Período de prueba: 3 semanas

Sacárido no digerible utilizado: lactitol y maltitol

Dosis de sacárido no digerible: 5 % (p/p)

Cepa bacteriana administrada: YIT 12355

Dosis de bacteria: dosis de células vivas: 3,9 a $6,9 \times 10^8$ ufc/ratón (administración de una suspensión en solución salina fisiológica utilizando una sonda). Recuento total de células, incluidas las células muertas: 3,6 a $4,6 \times 10^9$ ufc/ratón

Configuración de grupo: 6 grupos (5 ratones/grupo)

Grupo -/-, control

Grupo AH/-, Administración de YIT 12355 solo

Grupo -/LAC, Administración de lactitol solo.

Grupo -/MAL, Administración de maltitol solo.

Grupo AH/LAC, administración de YIT 12355 y lactitol en combinación

Grupo AH/MAL, administración de YIT 12355 y maltitol en combinación

Composición del pienso: alimento purificado a base de AIN-93G (Tabla 7)

Parámetro de medición: análisis de la flora cecal (medición del recuento celular de la bacteria administrada mediante PCR cuantitativa, medición del recuento total de células mediante el método de recuento DAPI y observación del cambio en la flora mediante PCR-DGGE)

[Tabla 6]

| Esquema de la prueba | | |
|--|----------------------------|------------------------------------|
| Células vivas o administración de solución salina fisiológica (dos veces por semana) | | |
| ↓↓↓↓ | | |
| Grupo -/- (grupo control) | (Dieta control) (1 semana) | (Dieta control) (2 semanas) |
| Grupo AH/- (grupo AH) | (Dieta control) (1 semana) | (Dieta control) (2 semanas) |
| Grupo -/LAC (grupo LAC) | (Dieta control) (1 semana) | Dieta que contiene LAC (2 semanas) |
| Grupo -/MAL (grupo MAL) | (Dieta control) (1 semana) | Dieta que contiene MAL (2 semanas) |
| Grupo AH/LAC | (Dieta control) (1 semana) | Dieta que contiene LAC (2 semanas) |
| Grupo AH/MAL | (Dieta control) (1 semana) | Dieta que contiene MAL (2 semanas) |
| ↓ Disección | | |

[Tabla 7]

| Composición del pienso | | | | | | |
|----------------------------|---------------|----------|-----------|---------------|-----------|--------------|
| Composición | Contenido (%) | | | | | |
| | Grupo control | grupo AH | Grupo LAC | Grupo AH/ LAC | Grupo MAL | Grupo AH/MAL |
| α-Almidón de maíz | 39,7486 | | 34,7486 | | 34,7486 | |
| Caseína sin vitamina | 20,00 | | 20,00 | | 20,00 | |
| Dextrina | 13,20 | | 13,20 | | 13,20 | |
| Sacarosa | 10,00 | | 10,00 | | 10,00 | |
| Aceite de soja | 7,00 | | 7,00 | | 7,00 | |
| Celulosa | 5,00 | | 5,00 | | 5,00 | |
| Lactitol | - | | 5,00 | | - | |
| Maltitol | - | | - | | 5,00 | |
| Mezcla de sales AIN93G | 3,50 | | 3,50 | | 3,50 | |
| Mezcla de vitaminas AIN93G | 1,00 | | 1,00 | | 1,00 | |
| L-cistina | 0,300 | | 0,300 | | 0,300 | |
| Tartrato de colina | 0,25 | | 0,25 | | 0,25 | |
| t-Butilhidroxitolueno | 0,0014 | | 0,0014 | | 0,0014 | |
| Total | 100 | | 100 | | 100 | |

5 2) Preparación y medición del recuento celular de la bacteria administrada (YIT 12355)

Se cultivó YIT 12355 a 37 °C durante 24 horas en un medio PYGA, y a continuación los gránulos de centrifugación se suspendieron en una solución de leche desnatada 10 %- glutamato sódico 2 %. La suspensión se congeló a -80 °C para preparar una solución madre congelada. Se preparó una solución bacteriana de YIT 12355 para la administración de la siguiente manera utilizando la solución madre congelada.

10

La solución madre congelada de YIT 12355 se descongeló y la solución se inoculó al 1 % a 4 ml de un medio PYGA, seguido de un cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. La solución de cultivo se inoculó al 1 % a 56 ml de un medio que tenía la misma composición que antes, seguido de un cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. La solución bacteriana se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y a continuación se eliminó el sobrenadante. Los sedimentos se resuspendieron mediante la adición de 30 ml de solución salina fisiológica fría sustituida anaeróticamente por adelantado, y el sobrenadante se eliminó mediante centrifugación. Los sedimentos se resuspendieron en 6 ml de solución salina fisiológica fría para preparar una solución bacteriana para la administración. La suspensión de las células bacterianas se llevó a cabo en una caja de guantes.

15

20

La solución bacteriana se diluyó en serie con solución salina fisiológica anaeróticamente sustituida y se extendió sobre un medio de placa PYGA, seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. A continuación se contaron las colonias y se calculó un recuento viable. Después de la fijación de una porción de la solución bacteriana en una solución al 4 % de paraformaldehído en PBS, el recuento total de células se midió mediante el método de recuento DAPI.

25

3) Recogida de contenidos del tracto intestinal.

En la 2ª semana de administración del pienso de prueba, cada ratón se anestesió con éter dietílico y se sacrificó por

dislocación cervical. Después de la sección abdominal, se extirparon los tejidos cecales y los tejidos colónicos para recuperar su contenido. Los contenidos cecales y colónicos se diluyeron 10 veces con PBS y se sometieron a extracción de ADN.

5 4) Análisis de la flora en el contenido del tracto intestinal

a) Medición del recuento celular de YIT 12355 mediante PCR cuantitativa

10 El ADN se extrajo mediante el método de perlas-fenol de la solución diluida 10 veces del contenido del tracto intestinal. Específicamente, 0,3 g de perlas de vidrio (diámetro: 0,1 mm), 300 µl de una solución de Tris-SDS (una solución mixta de 250 ml de Tris-HCl 200 mM, EDTA 80 mM, pH 9,0 y 50 ml de SDS al 10 %) y 500 µl de fenol saturado de TE se agregaron a 200 µl de la solución diluida del contenido del tracto intestinal, y la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos utilizando FastPrep FP120 (nivel de potencia: 5,0). Después de la centrifugación a 15.000 rpm durante 5 minutos, se agregaron 400 µl de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) a 400 µl del sobrenadante, y la mezcla se agitó durante 45 segundos usando FastPrep FP120 (nivel de potencia) 4.0). Después de la centrifugación a 15.000 rpm durante 5 minutos, se agregaron 25 µl de acetato sódico 3 M (pH 5,4) y 250 µl de isopropanol a 250 µl del sobrenadante y se mezclaron con el mismo. Después de la centrifugación a 15.000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol al 70 %, seguido de la centrifugación nuevamente a 15.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secaron los gránulos y se disolvieron en 1,0 ml de un tampón TE. La solución de ADN obtenida se diluyó 10 veces con agua purificada para preparar una solución de molde de ADN. Para la PCR cuantitativa, se utilizó el 7500 Real-Time PCR System (fabricado por Life Technologies Corp.). El volumen total de la solución de reacción se ajustó a 20 µl, y se mezclaron SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) que contenía 1,0 µM de cada uno de los cebadores, y la solución de molde de ADN y luego se sometieron a PCR cuantitativa. Las condiciones de reacción implicaron calentamiento a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos repetitivos, cada uno de los cuales incluía reacciones a 95 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 50 segundos, y la reacción subsiguiente a 72 °C durante 3 minutos. Para el análisis posterior del valor de T_m, después de la reacción a 60 °C durante 1 minuto, la temperatura se elevó a un gradiente de temperatura de 0,2 °C/seg a 95 °C durante el cual se midió la fluorescencia de SYBR Green I para medir la temperatura de disociación (T_m) de la doble hebra del producto de amplificación. Las secuencias de los cebadores específicos de *A. hadrus* utilizados en la PCR cuantitativa se muestran en la Tabla 8. La curva de calibración para el uso en la cuantificación de *A. hadrus* se preparó utilizando, como molde, el ADN extraído de las células bacterianas de *A. hadrus* YIT12355 preparado en un recuento de células dado.

35 [Tabla 8]

| Cebador específico de <i>A. hadrus</i> usado en la PCR cuantitativa | | | |
|---|----------|------------------------------------|---|
| Especie bacteriana diana | Cebador | Secuencia (5'→3') | Longitud del producto de amplificación (pb) |
| <i>A. hadrus</i> | s-Ahad-F | AGGGCTTAAGTCTGGGAC (SEQ ID NO: 1) | 405 |
| | s-Ahad-R | GGTTAAGGACCGGTCAGAA (SEQ ID NO: 2) | |

b) Medición de la ocupación de YIT 12355 para el recuento total de células en el intestino

40 Después de la fijación de una porción de la solución diluida 10 veces del contenido del tracto intestinal en una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS, se midió el recuento total de células mediante el método de recuento DAPI. El recuento de células de YIT 12355 se dividió por el recuento de células total para calcular la ocupación (%).

(Expresión 4)

$$(Ocupación de YIT 12355) (\%) = (\text{Recuento celular de YIT 12355} / \text{Recuento total de células}) \times 100$$

45

c) Análisis de la flora en el contenido cecal por PCR-DGGE.

El ADN extraído en el párrafo 4)-a anterior se agrupó en forma de grupos, y el fragmento del gen ARNr 16S (que contiene las regiones V3 y V4) de la bacteria se amplificó por PCR utilizando el conjunto de ADN como molde y los cebadores con un anclaje de GC (Tabla 9). Las condiciones de la PCR incluían 5 µl 10 × Ex Taq Buffer, 1 µl de una solución BSA (20 mg/ml), 2 µl de dNTP 2,5 mM, 1 µl de una solución de cebador de 25 pmol/µl, 1,25 unidades de Ex Taq polymerase HS (Takara Bio Inc.) y 0,1 ng de molde de ADN en 50 µl de la solución de reacción. Las condiciones de temperatura incluían 94 °C durante 5 minutos, (94 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 1 minuto) x 30 ciclos y 72 °C durante 7 minutos. El producto de amplificación se purificó utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (fabricado por Qiagen N.V.), y a continuación el ADN se aplicó a un gel a 200 ng/pocillo. Se utilizó gel de acrilamida 8 % (acrilamida/bis 8 % (37:5:1), 1 × TAE (pH 8,0), TEMED 0,1 %, persulfato de amonio 0,1 %) provisto de un gradiente de concentración de desnaturizante de 35 a 50 % (aquí, 100 % de desnaturizante significa una mezcla de urea 7 M y formamida 40 %) usando Gradient Former (Bio-Rad Laboratories, Inc.) para realizar la electroforesis a 60 °C a 130 V durante 5 minutos y la electroforesis posterior a 70

V durante 16 horas Después de la electroforesis, el gel se tiñó con GelRed (Biotium), y las bandas se confirmaron y se fotografiaron bajo una lámpara UV. Para identificar una banda derivada de *A. hadrus* YIT 12355, la PCR se realizó utilizando, como molde, el ADN extraído de células bacterianas simplemente cultivadas de la cepa bacteriana, y el producto amplificado se usó como una muestra de electroforesis.

5

[Tabla 9]

| Cebador específico utilizado en la PCR-DGGE | | |
|--|-------------------------------|----------------|
| Cebador | Secuencia (5'→3') | |
| GC-341F | Anclaje GC*-CCTACGGGAGGCAGCAG | (SEQ ID NO: 3) |
| 800R | GGACTACCAGGGTATCTAAT | (SEQ ID NO: 4) |
| Anclaje GC* = CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCG (SEQ ID NO: 5) | | |

Los resultados de la medición del recuento total de células y el recuento de células de YIT 12355 en el intestino, y la ocupación de YIT 12355 se muestran en la Tabla 10. Los resultados de analizar la flora en el contenido cecal mediante PCR-DGGE se muestran en la Figura 7.

10

[Tabla 10]

| Grupo | Recuento de células (log ₁₀ células/g de contenido) | | | Ocupación (%) |
|--|--|--------------------|---------------------------|---------------|
| | <i>A. hadrus</i> | Recuento detectado | Recuento total de células | |
| Contenido cecal | | | | |
| Grupo - / - | 6,0 | (1/5) | 10,9 ± 0,1 | 0,001 |
| Grupo AH / - | 7,0 ± 1,1 | (4/5) | 10,9 ± 0,1 | 0,1 ± 0,1 |
| Grupo - / LAC | 7,2 | (1/5) | 11,1 ± 0,1 | 0,014 |
| Grupo - / MAL | 6,1 | (1/5) | 11,0 ± 0,1 | 0,001 |
| Grupo AH / LAC | 10,5 ± 0,4 | (5/5) | 11,1 ± 0,1 | 27,5 ± 19,0 |
| Grupo AH / MAL | 10,6 ± 0,2 | (5/5) | 11,0 ± 0,1 | 45,2 ± 8,5 |
| Contenido colónico | | | | |
| Grupo - / - | ND | (0/5) | 10,9 ± 0,1 | 0,000 |
| Grupo AH / - | 7,2 ± 1,1 | (4/5) | 11,0 ± 0,0 | 0,1 ± 0,1 |
| Grupo - / LAC | ND | (0/5) | 11,1 ± 0,1 | 0,000 |
| Grupo - / MAL | ND | (0/5) | 11,0 ± 0,1 | 0,000 |
| Grupo AH / LAC | 10,4 ± 0,4 | (5/5) | 11,1 ± 0,1 | 23,4 ± 15,6 |
| Grupo AH / MAL | 10,5 ± 0,4 | (5/5) | 11,0 ± 0,1 | 41,3 ± 22,1 |
| ND: <límite inferior de cuantificación 6,0 log ₁₀ (celdas/g contenidos) | | | | |

La Tabla 10 demostró que la administración de YIT 12355 solo o el sacárido no digerible solo no cambia en gran medida ni el recuento celular ni la ocupación de *A. hadrus* en el intestino, mientras que la administración de la bacteria productora de butirato de la presente invención y el sacárido no digerible en combinación aumenta drásticamente el recuento de células y la ocupación de *A. hadrus*.

15

Como se ve en la Figura 7, la banda derivada de YIT 12355 (con un círculo en la Figura 7) se incrementó en el grupo AH/LAC y el grupo AH/MAL. Por lo tanto, se confirmó que la administración de la bacteria productora de butirato de la presente invención y el sacárido no digerible en combinación aumentaba específicamente la bacteria productora de butirato de la presente invención incluso cuando se observaba un cambio en toda la flora intestinal.

20

Ejemplo 6 (Prueba de dosis oral única de YIT 12355 en ratón administrado con sacárido no digerible)

25

1) Diseño de la prueba

La configuración del grupo y el esquema de la prueba se muestran en la Tabla 11. Los ratones se aclimataron y criaron con pienso F2 durante 1 semana y a continuación se dividieron en 4 grupos, de manera que el peso corporal promedio fue casi igual entre estos grupos. Se administró una dieta de control (Tabla 12) durante 1 semana. A continuación, la dieta de control se administró al grupo de control (grupo -/-) y al grupo AH/- durante 2 semanas, mientras que el alimento purificado que contenía maltitol (dieta que contenía MAL) se administró al grupo -/MAL y al grupo AH/MAL durante 2 semanas. Se administró una suspensión de células vivas de YIT 12355 en una dosis única utilizando una sonda después de la administración de la dieta de control durante 1 semana. En el último día de la prueba, se diseccionó cada ratón y se recuperaron los contenidos cecales. Los contenidos cecales se sometieron a la medición del recuento de células de YIT 12355.

30

35

<Sistema de la prueba>

40

Material de prueba: Maltitol (administración de piensos mixtos 5 %) Cepa bacteriana administrada: YIT 12355
Especies animales: Ratón C57BL/6J (4 semanas de edad; CLEA Japan, Inc.)

Configuración del grupo: 7 ratones × 4 grupos

- Grupo -/-, control
- Grupo AH/-, Administración de YIT 12355 solo
- Grupo -/MAL, Administración de maltitol solo.
- Grupo AH/MAL, administración de YIT 12355 y maltitol en combinación (ver Tabla 11)

- Período de prueba: 3 semanas (dieta de control de 1 semana + dieta de control de MAL de 2 semanas o dieta de control)
- Método de administración de las bacterias: dosis única de una suspensión de células vivas en solución salina fisiológica utilizando una sonda
- Composición del pienso: pienso sólido purificado a base de AIN-93G (Tabla 12)
- Parámetro de prueba: flora cecal (recuento celular y ocupación de la bacteria administrada)

[Tabla 11]

| Esquema de la prueba | | |
|---|----------------------------|------------------------------------|
| Administración de células vivas o solución salina fisiológica (dosis única) | | |
| Grupo -/- | (Dieta control) (1 semana) | (Dieta control) (2 semanas) |
| Grupo AH/- | (Dieta control) (1 semana) | (Dieta control) (2 semanas) |
| Grupo -/MAL | (Dieta control) (1 semana) | Dieta que contiene MAL (2 semanas) |
| Grupo AH/MAL | (Dieta control) (1 semana) | Dieta que contiene MAL (2 semanas) |

↓
Disección

[Tabla 12]

| Composición del pienso | | |
|----------------------------|---------------|------------------------|
| Composición | Contenido (%) | |
| | Dieta control | Dieta que contiene MAL |
| α-Almidón de maíz | 39,7486 | 34,7486 |
| Caseína sin vitamina | 20,00 | 20,00 |
| Dextrina | 13,20 | 13,20 |
| Sacarosa | 10,00 | 10,00 |
| Aceite de soja | 7,00 | 7,00 |
| Celulosa | 5,00 | 5,00 |
| Maltitol | - | 5,00 |
| Mezcla de sales AIN93G | 3,50 | 3,50 |
| Mezcla de vitaminas AIN93G | 1,00 | 1,00 |
| L-cistina | 0,300 | 0,300 |
| Tartrato de colina | 0,25 | 0,25 |
| BHT | 0,0014 | 0,0014 |
| Total | 100 | 100 |

- 2) Preparación y medición del recuento celular de la bacteria administrada (YIT 12355)
- Se preparó una suspensión de células vivas de YIT 12355 (bacteria administrada) de la misma manera que en el párrafo 2) del Ejemplo 5.
- 3) Administración de YIT 12355
- La solución bacteriana (recuento de viables: $3,1 \times 10^9$ ufc/ml, recuento total de células: $1,9 \times 10^{10}$ células/ml) preparada en el párrafo anterior 2) se administró por vía oral a una dosis única de 0,2 ml (recuento de viables: $6,2 \times 10^8$ ufc/ratón, recuento total de células: $3,8 \times 10^9$ células/ratón) a cada ratón utilizando una sonda. Al grupo de control y al grupo -/MAL, se administraron 0,2 ml de solución salina fisiológica en lugar de la solución bacteriana.
- 4) Recogida de muestras
- En la tercera semana después del inicio de la prueba (en la segunda semana de administración de la solución bacteriana utilizando una sonda), se realizó un corte abdominal con anestesia con Somnopentyl, y los ratones se sacrificaron por extracción de sangre completa de la vena cava inferior. A continuación, se recuperaron los contenidos cecales. Los contenidos cecales se diluyeron 10 veces con PBS y se sometieron a extracción de ADN.

5) Medición del recuento celular de YIT 12355 en contenido cecal

5) -1 Medición del recuento celular de YIT 12355 por PCR cuantitativa

5 El ADN se extrajo mediante el método de perlas-fenol descrito en el párrafo 4) a) del Ejemplo 5 de la solución diluida 10 veces del contenido del tracto intestinal. El recuento de células de YIT 12355 se midió mediante PCR cuantitativa utilizando el ADN obtenido como molde y los cebadores específicos de la especie bacteriana descritos en el párrafo 4) a) del Ejemplo 5.

10 5)-2 Medición de la ocupación de YIT 12355 para el recuento total de células en el intestino

Después de la fijación de una porción de la solución diluida 10 veces del contenido del tracto intestinal en una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS, se midió el recuento total de células mediante el método de recuento DAPI. El recuento de células de YIT 12355 se dividió por el recuento de células total para calcular la ocupación (%).

15 (Expresión 5)

$$(Ocupación \text{ de YIT 12355}) (\%) = (\text{Recuento celular de YIT 12355} / \text{Recuento total celular}) \times 100$$

20 Los resultados de la medición del recuento total de células en el intestino y el recuento de células de YIT 12355 y la ocupación de YIT 12355 se muestran en la Tabla 13. Como se ve en la Tabla 13, la dosis única de AH solo o el sacárido no digerible solo tampoco modifica el recuento celular ni la ocupación, mientras que la dosis única de la bacteria productora de butirato de la presente invención y el sacárido no digerible en combinación aumenta drásticamente el recuento celular y la ocupación, como en el caso de la administración múltiple.

25

[Tabla 13]

| Recuento celular de <i>A. hadrus</i> YIT 12355 en ciego y su proporción respecto al recuento total de células | | | |
|---|--|---------------------------|---------------|
| Grupo | Recuento de células log ₁₀ (células/g de contenido) | | Ocupación (%) |
| | <i>A. hadrus</i> YIT 12355 | Recuento total de células | |
| Grupo -/- | <6,0 | 10,9±0,3 | 0,0 |
| Grupo -/AH | 8,0±0,3 | 10,9±0,4 | 0,3 |
| Grupo -/MAL | <6,0 | 10,9±0,1 | 0,0 |
| Grupo AH/MAL | 10,1±0,2 | 10,8±0,3 | 21,3±14,6 |

Ejemplo 7 (Prueba de la proporción entre el aumento en el recuento de células de YIT 12355 y la concentración de butirato)

30

Se recogieron en un tubo de ensayo 0,8 g de heces frescas de ratón obtenidas 1 semana después del inicio de la prueba de dosis única del Ejemplo 6 y el tubo se transfirió a una caja de guantes con baja temperatura y estado anaerobio. Las heces se diluyeron con PBS anaeróbicamente sustituido por adelantado (dilución final: 12,5 veces), y a continuación se añadió una solución de maltitol (concentración final: 0,5 %) y/o una solución bacteriana cultivada de YIT 12355 (1 % inoculado), seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 24 horas. Después del cultivo, la concentración de butirato se midió mediante HPLC de exclusión iónica utilizando un detector de conductividad eléctrica.

35

Los resultados se muestran en la Figura 8. El uso combinado de la bacteria productora de butirato de la presente invención y el sacárido no digerible *in vitro* aumenta la concentración de butirato al aumentar el recuento celular.

40

Como se ve de los resultados de los Ejemplos 5 a 7, la adición del sacárido no digerible solo dio como resultado un recuento de células de YIT 12355 inferior a 10⁶ células/ml, y no aumentó la concentración de butirato. Por otro lado, la adición de YIT 12355 solo aumentó el recuento de células de *A. hadrus* y en consecuencia aumentó la concentración de butirato. La combinación del sacárido no digerible e YIT 12355 aumentó el recuento de células de *A. hadrus* aproximadamente 100 veces más que en el caso de la adición de YIT 12355 solo y aumentó la concentración de butirato con el aumento en el recuento de células. Esto demostró que el uso combinado de la bacteria productora de butirato de la presente invención y un sacárido no digerible aumenta la concentración de butirato con el aumento del recuento celular

50

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> YAKULT HONSHA CO., LTD.

55

<120> Una bacteria productora de ácido butírico y uso de la misma

<130> YK0081

ES 2 727 373 T3

<150> JP 2014-067726
<151> 28-03-2014

5 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador diseñado basado en el gen de *Anaerostipes hadrus*

<400> 1
agggcttaac tctgggac 18

20 <210> 2
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador diseñado basado en el gen de *Anaerostipes hadrus*

<400> 2
ggttaaggac cggtcagaa 19

30 <210> 3
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador diseñado basado en el gen del ARNr 16S bacteriano

40 <400> 3
cctacgggag gcagcag 17

45 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador diseñado basado en el gen del ARNr 16S bacteriano

<400> 4
ggactaccag ggtatctaat 20

55 <210> 5
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

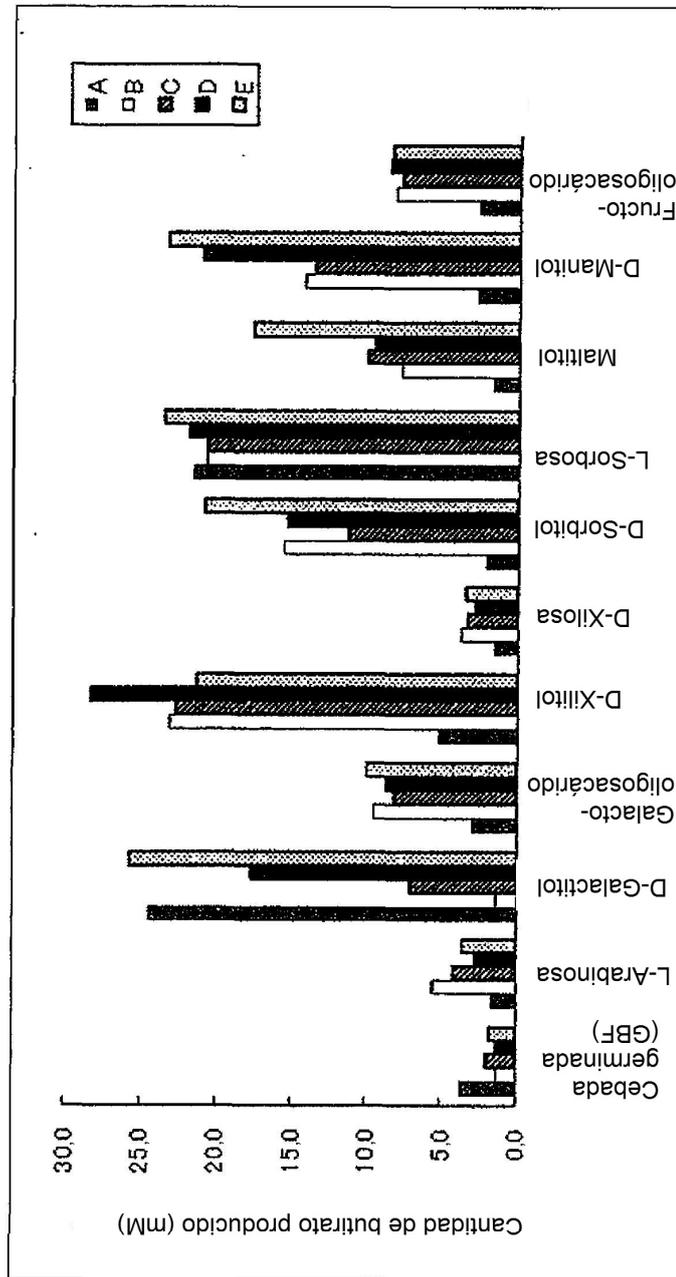
60 <220>
<223> Cebador diseñado para DGGE

<400> 5
cgcccgcgc gcccgcgcc cgtccgccg ccccgcgccg 40

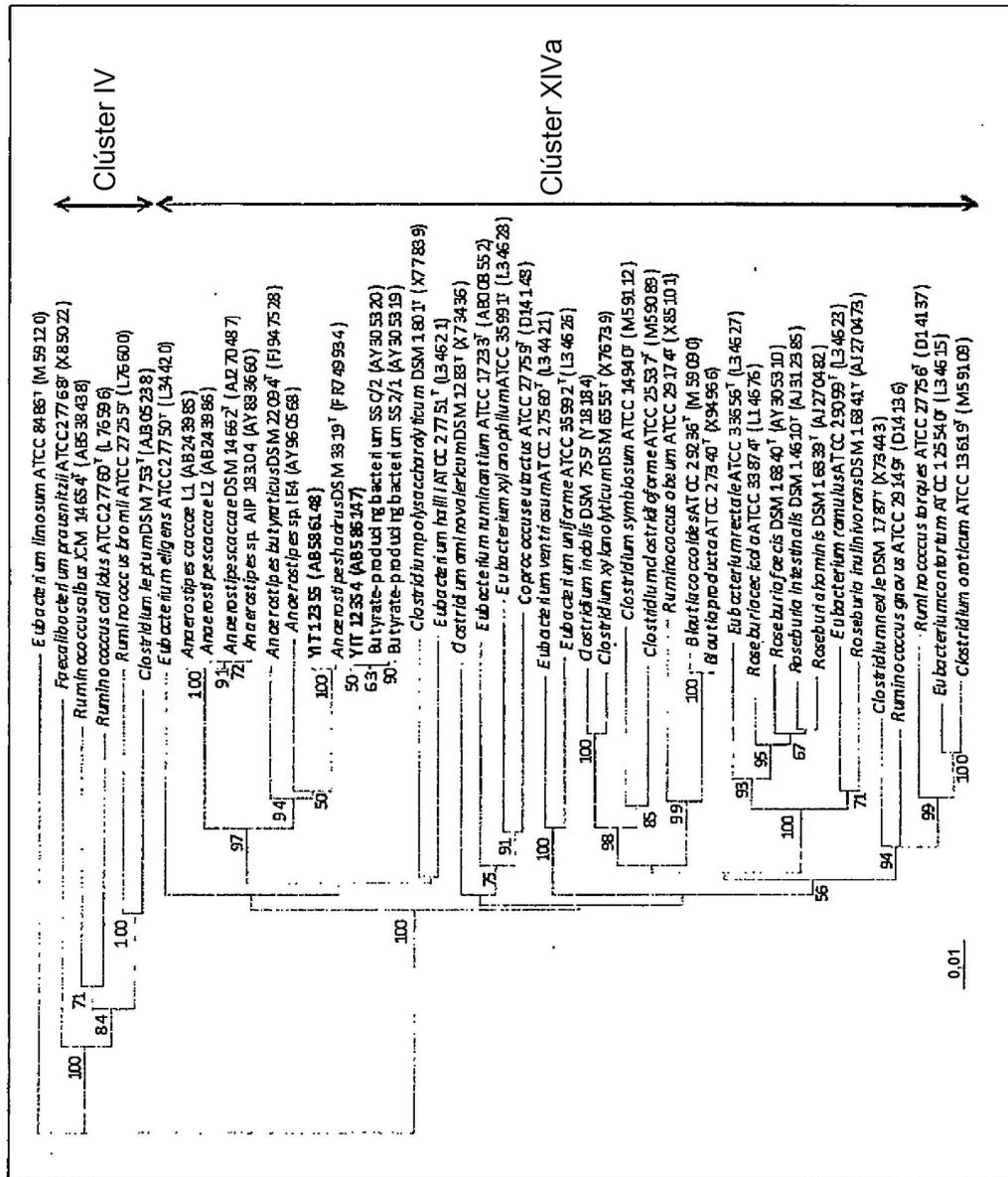
REIVINDICACIONES

1. Una bacteria productora de butirato perteneciente a *Anaerostipes hadrus* (*Eubacterium hadrum*), donde la bacteria productora de butirato es *Anaerostipes hadrus* (*Eubacterium hadrum*) YIT 12354 (NITE BP-01831) o *Anaerostipes hadrus* (*Eubacterium hadrum*) YIT 12355 (NITE BP-01832).
5
2. Una composición para un producto alimenticio o bebida, medicamento o pienso, que comprende un sacárido no digerible y una bacteria productora de butirato de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, donde el sacárido no digerible es uno o más miembros seleccionados del grupo que consiste en isomalt, isomaltulosa, D-galactitol, D-xilitol, D-sorbitol, L-sorbosa, maltitol, D-manitol, lactitol y galactooligosacárido.
- 15 4. Un agente potenciador de la producción de butirato, que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 2 o 3.

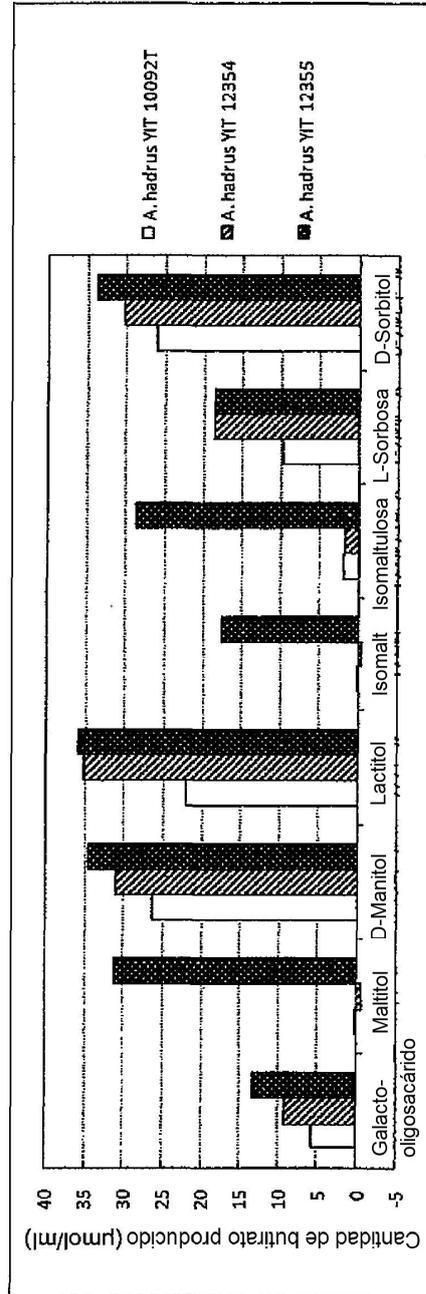
[Figura 1]



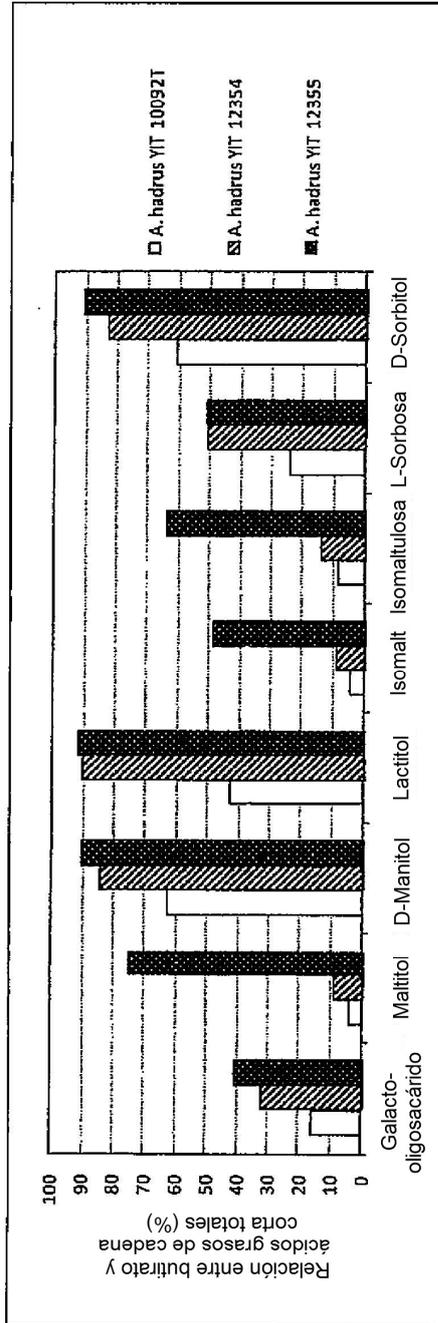
[Figura 2]



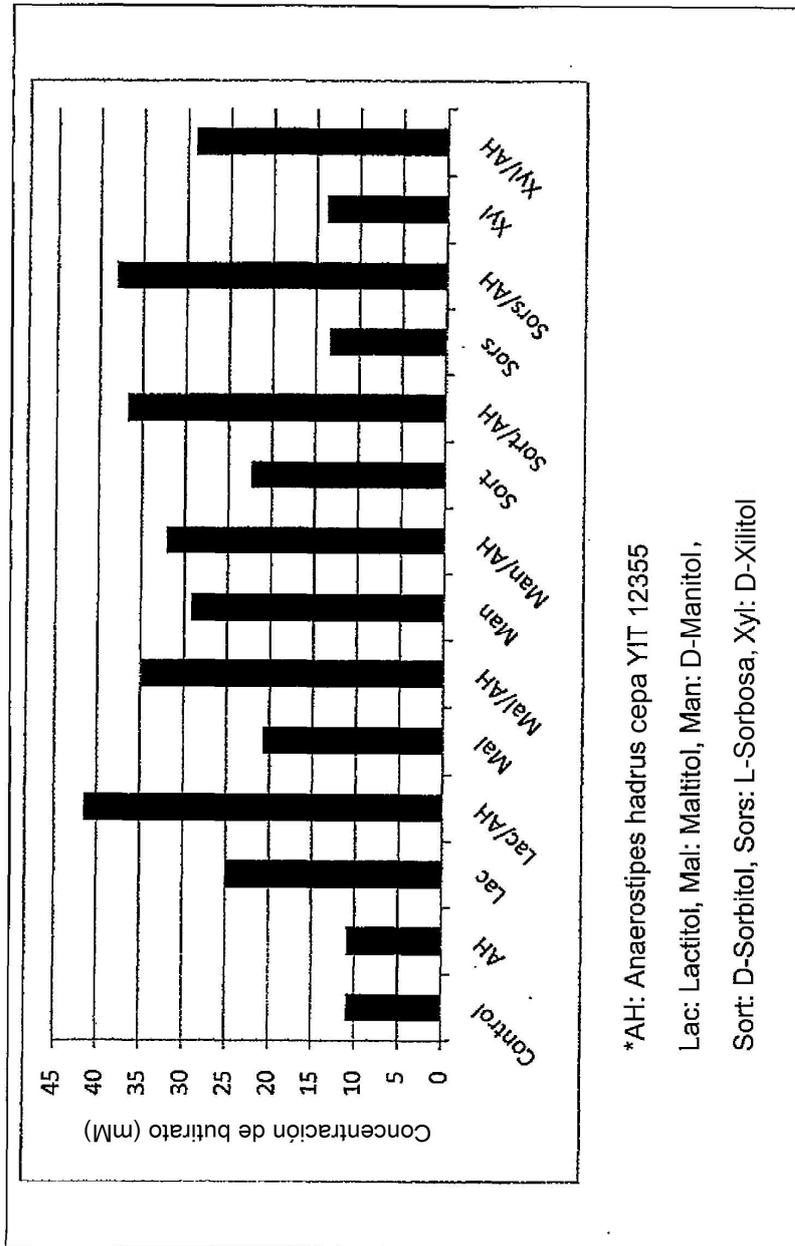
[Figura 3]



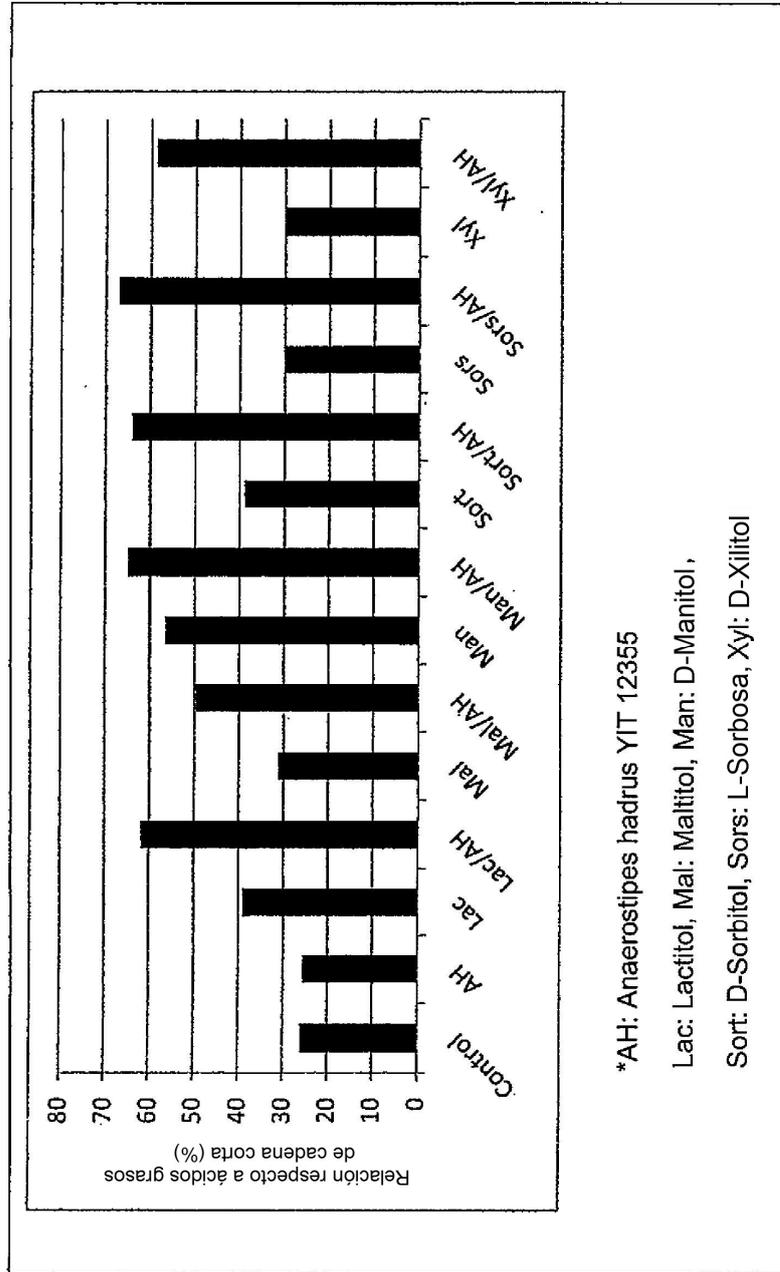
[Figura 4]



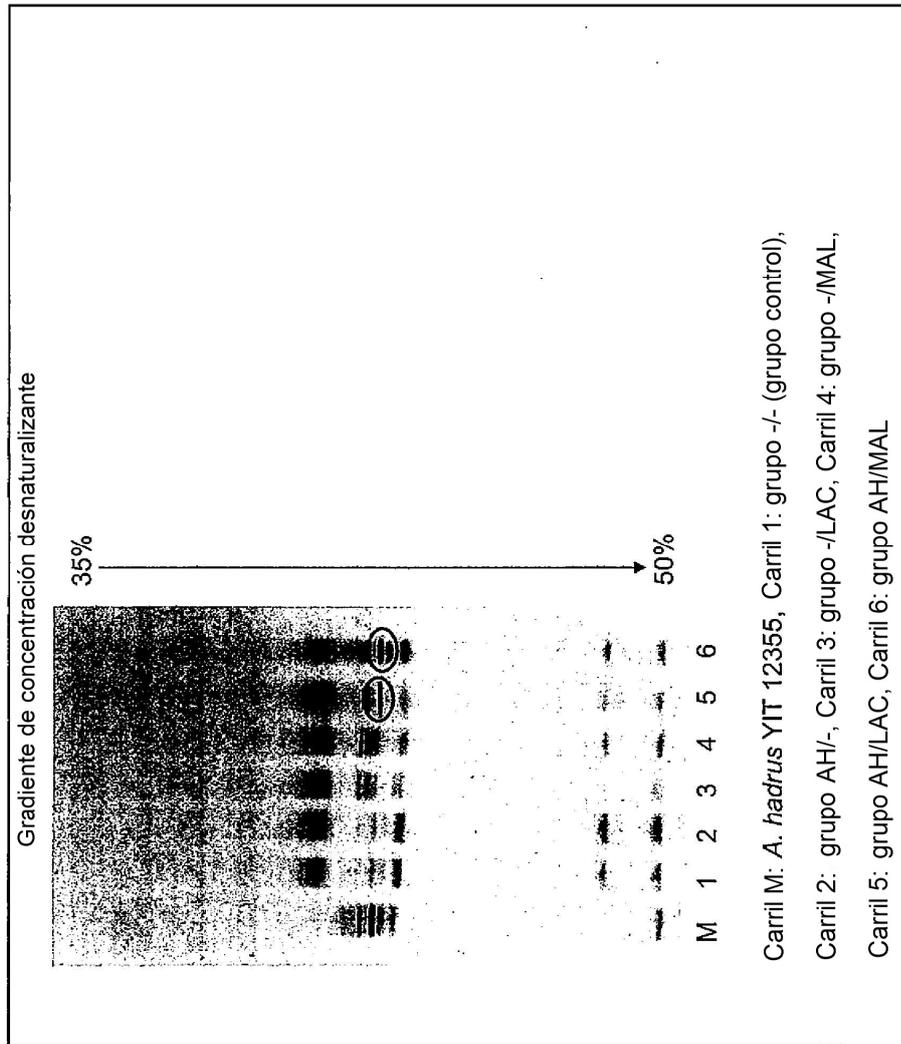
[Figura 5]



[Figura 6]



[Figura 7]



[Figura 8]

