

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 052**

51 Int. Cl.:

A61K 35/57 (2015.01)

A23L 33/18 (2006.01)

A23L 13/50 (2006.01)

A61K 35/744 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2016** **E 16152839 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 3047853**

54 Título: **Composiciones del caldo y su uso como prebióticos**

30 Prioridad:

26.01.2015 US 201562108008 P

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

15.04.2020

73 Titular/es:

LYNCH, STEPHANIE (20.0%)
1455 East Meadowmere Street
Springfield, MO 65804, US;
DAKE, ROGER L. (20.0%);
DURHAM, PAUL L. (20.0%);
NORTON, RHY (20.0%) y
HAWKINS, JORDAN L. (20.0%)

72 Inventor/es:

LYNCH, STEPHANIE;
DAKE, ROGER L.;
DURHAM, PAUL L.;
NORTON, RHY y
HAWKINS, JORDAN L.

74 Agente/Representante:

URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel

ES 2 754 052 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 del caldo y su uso como prebióticos

ANTECEDENTES

5 [0001] La presente divulgación tiene que ver con el campo de los suplementos nutricionales y dietéticos así como con el campo general de la microbiología.

[0002] Se sabe que los microorganismos colonizan el tracto gastrointestinal de los mamíferos. Algunos microorganismos proporcionan ciertos beneficios para la salud del huésped. Estos microorganismos beneficiosos también se conocen como “microorganismos probióticos” o “probióticos”. Las bacterias beneficiosas (o bacterias “buenas”) también se conocen como “bacterias probióticas”. Ciertos microorganismos probióticos pueden existir de forma natural en el intestino del huésped.
10 Otros pueden introducirse en el huésped a través de suplementos dietéticos.

[0003] El término “prebiótico” se refiere, por lo general, a sustancias que inducen el crecimiento (y, por ende, el recuento de microorganismos vivos o UFC) o la actividad de microorganismos probióticos (p. ej., bacterias u hongos). Con todo, la mayoría de los prebióticos (si no todos ellos) son carbohidratos y pueden contener gluten de origen vegetal diverso.

15 [0004] US 2013/345139 A1 se relaciona con una composición con fines nutricionales que, aparentemente, poseen una eficacia mejorada con respecto al desarrollo de matriz medular, comprendiendo entre 1 y, aproximadamente, 99% en peso de colágeno hidrolizado y entre 1 y, aproximadamente, 99% en peso de uno o más prebióticos, en cada caso en base a la masa en seco de la composición.

[0005] US 2015/011500 A1 divulga composiciones de caldo preparadas a partir de materia avícola. La materia prima avícola seleccionada se procesa para obtener un caldo con alto contenido proteínico. Ciertos aminoácidos específicos
20 están aparentemente presentes en una concentración relativamente alta, en comparación al caldo casero y otros productos comerciales. Las composiciones de caldo divulgadas son aparentemente efectivas para prevenir y/o tratar enfermedades articulares y también pueden proporcionar otros beneficios nutricionales y para la salud.

[0006] Federica Meli et al., Curr. Microbiol. 68, 2013, 82-87, informan del efecto de los hidrolizados de proteína sobre la cinética de crecimiento y las actividades aminopeptidasa del Lactobacillus.

25 RESUMEN

[0007] La presente divulgación supone un avance en la técnica al proporcionar una composición para su uso en un método para proporcionar beneficios para la salud del individuo mejorando el microbioma de dicho individuo mediante la optimización de una o más bacterias probióticas en dicho individuo de acuerdo con la reivindicación 1. El método comprende la administración a dicho individuo de una composición en una cantidad que resulte efectiva para mejorar
30 dichas una o más bacterias probióticas. De acuerdo con la presente invención, dicha composición comprende fibra de colágeno soluble preparada a partir de material avícola, y dicha composición se obtiene mediante un método que comprende los pasos de separación y molienda mecánica de partes de aves con huesos y cartílago hasta convertirlas en finos fragmentos de menos de 5 mm, y el cocinado de dichos fragmentos a una temperatura de entre 70 y 150 °C durante un período de entre 8 minutos y 6 horas o más. Más concretamente, en una realización, la composición prebiótica
35 divulgada no contiene gluten. Otras realizaciones preferidas son el objeto de las reivindicaciones dependientes y la descripción que sigue.

[0008] De acuerdo con la presente invención, la composición se prepara a partir de material avícola, como pollo, pavo u otras aves.

En otra realización, la composición divulgada puede aparecer en forma de caldo, caldo concentrado, extracto o polvo.

[0009] Como se ha dicho ya, la composición de acuerdo con la presente invención se proporciona para su uso en un método para mejorar el microbioma de un individuo mediante la optimización de una o más bacterias probióticas en dicho individuo. Dicho método comprende la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva de una composición preparada a partir de partes de aves. En un aspecto, la cantidad efectiva es una cantidad que resulta efectiva para mejorar al menos una bacteria probiótica en el individuo. En otro aspecto, la mejora de la bacteria probiótica implica la mejora del bienestar o el aumento del recuento de microorganismos vivos (esto es, de unidades formadoras de colonias o UFC) de la bacteria probiótica en el tracto gastrointestinal (o intestino) del individuo. Las UFC de una bacteria en el individuo pueden medirse directa o indirectamente. Las mediciones indirectas pueden incluir, sin límite, la medición de las UFC en muestras fecales del individuo. En un aspecto, el método de recuentos de secuencia metagenómica puede usarse para medir las UFC de una bacteria en una muestra.

[0010] En otra realización, la cantidad efectiva a administrar puede ser una cantidad de la composición de caldo que aumente el recuento de microorganismos vivos de al menos una bacteria probiótica en el intestino del individuo en 2-200 veces, en 5-200 veces, en 10-200 veces, en 20-200 veces o en aproximadamente 200 veces, tras la administración de la composición al individuo. En otro aspecto, la cantidad efectiva puede ser una cantidad de la composición de caldo que aumente la proporción (o el porcentaje) de al menos una bacteria probiótica (esto es, que aumente selectivamente el recuento de al menos una bacteria probiótica beneficiosa) en el microbioma intestinal del individuo. En otro aspecto, la cantidad efectiva puede ser una cantidad de la composición de caldo que aumente la diversidad del microbioma intestinal del individuo.

[0011] En una realización, la composición de caldo divulgada para su uso de acuerdo con la presente invención puede serle administrada al individuo de forma consecutiva a razón de una cantidad efectiva diaria durante 1 día, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o 14 o más días. En otra realización, la composición puede serle administrada al individuo de forma no consecutiva, por ejemplo, en días alternos durante un período de 4, 6, 8, 10, 12, 14 o más días.

[0012] La composición para el uso de acuerdo con la presente invención tiene una más elevada concentración de ciertos componentes beneficiosos. La composición para el uso de acuerdo con la presente invención contiene fibras de colágeno solubles. A efectos de la presente divulgación, el término "fibra de colágeno soluble" se usa para hacer referencia a fragmentos de proteína de colágeno solubles en un caldo tras haber estado individuos al proceso de preparación del caldo. En un aspecto, los fragmentos pueden representar la longitud total o la longitud parcial de la proteína de colágeno. En otro aspecto, los fragmentos pueden contener pequeños péptidos o aminoácidos únicos derivados del colágeno. En otro aspecto, al menos el 20%, 30%, 40%, o al menos el 50% de las fibras de colágeno solubles contiene fragmentos o péptidos compuestos por 20 o más aminoácidos. En otro aspecto, las fibras de colágeno solubles pueden actuar como prebióticos mejorando o fomentando las bacterias probióticas en el individuo. En otro aspecto, las fibras de colágeno solubles se derivan, primigeniamente, del cartílago de las aves. En otro aspecto, las fibras de colágeno solubles constituyen al menos el 20% (w/w sobre base sólida) de la composición de caldo final. En otro aspecto, las fibras de colágeno solubles pueden constituir al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o al menos el 90% (w/w sobre base sólida), o hasta el 100% de la composición de caldo final. En otro aspecto, las fibras solubles de colágeno pueden derivarse de colágeno Tipo I, II o III.

[0013] En otra realización, ciertos compuestos beneficiosos pueden enriquecerse en las composiciones divulgadas en mayor medida en comparación con otros productos de caldo disponibles actualmente en el mercado.

[0014] En otra realización, pueden añadirse al caldo uno o más ingredientes para obtener ciertos beneficios para la salud que no se asocian generalmente con el caldo de pollo. Los ejemplos de dichos suplementos pueden incluir, sin límite, jengibre, extracto de café, ginseng, té verde, otras plantas como la corteza de sauce o la boswellia, curcumina/cúrcuma, ácidos grasos omega-3, aceite de pescado, aceite de krill, aceite de algas, picnogenol (extracto de corteza de pino marítimo francés), extracto de semilla de uva, extracto de semillas de lino, ribonucleasa, angiogenina, lactoferrina, lactoferrina enriquecida con ribonucleasa, S-adenosil metionina, colágeno, proteínas de colágeno (p. ej., colágenos tipo I, II o III) o péptidos de colágeno, gelatina, insaponificables de aguacate/soja (ASU), extracto de conos de lúpulo, fárfara de huevo, polipéptidos derivados de la leche, como la caseína o el lactosuero, MSM (Metilsulfonilmetano), yuca, garra del diablo, bromelina, ácido glutámico, cacao, ortiga, vitamina E, vitamina D3, extracto de nuez, etc. En un aspecto, el caldo divulgado puede contener una cantidad significativa de colágeno, proteínas de colágeno y/o péptidos de colágeno. En otro aspecto, una cantidad significativa de colágeno, proteínas de colágeno y/o péptidos de colágeno puede estar presente de forma natural en el caldo divulgado. En otro aspecto, una cantidad significativa de colágeno, proteínas de colágeno y/o péptidos de colágeno puede añadirse como suplemento al caldo divulgado.

[0015] En otra realización, de acuerdo con los métodos de uso de la composición de acuerdo con la presente invención, se identifica primero un individuo que necesite un mayor recuento de bacterias probióticas antes de administrarse la composición del caldo. Dichos individuos que necesiten la composición del caldo divulgado pueden incluir, sin límite, individuos con desequilibrio del microbioma en su sistema GI, e individuos que necesiten un mayor número (UFC) de ciertas bacterias probióticas deseables, como las que producen el ácido láctico. Ejemplos de dichas bacterias deseables pueden incluir, sin límite, *Lactobacillus*, *Parasutterella*, *Morganella*, *Oscillospira*, *Coprococcus*, *Oscillibacter*, *Odoribacter*, *Gastranaerophilales*, *Allabaculum*, o *Faecalibacterium*. En otra realización, un ejemplo de bacteria probiótica deseable puede ser *Lactobacillus rhamnosus*. En otra realización, la composición del caldo proporciona no solo proteínas (y aminoácidos) como nutrientes, sino también proteínas (y aminoácidos) en forma de fibras de colágeno que permiten aumentar el número y el porcentaje de las bacterias probióticas en el microbioma intestinal del individuo. Así, en un aspecto de la presente divulgación, la administración de las composiciones del caldo divulgadas puede eliminar la necesidad de proporcionar suplementos de probióticos de forma continua a un individuo que, de lo contrario, tendría que tomar suplementos probióticos de forma regular. El término "de forma regular" significa al menos una vez al mes, una vez a la semana o al menos una vez al día.

[0016] A efectos de la presente divulgación, el término "mejorar" significa aumentar el crecimiento (y, por ende, el recuento de microorganismos vivos o UFC) o la actividad de un microorganismo. En una realización, la composición divulgada puede mejorar una o más bacterias probióticas nativas del individuo. El término "nativo" significa que el microorganismo existe de forma natural en el intestino del individuo. En otra realización, la composición divulgada puede mejorar una o más bacterias probióticas nativas del individuo. Tanto las bacterias probióticas nativas como las no nativas pueden proporcionarse al individuo en forma de suplementos.

[0017] En un aspecto, la composición divulgada puede administrarse al individuo por vía oral. En otro aspecto, la composición divulgada puede administrarse junto con una o más bacterias probióticas. En otro aspecto, la composición revelada puede mezclarse con una o más bacterias probióticas y administrarse al individuo como mezcla.

[0018] En otro aspecto, la composición prebiótica se prepara de acuerdo con el proceso especificado y luego se le da forma líquida o sólida (p. ej., polvo) para su ingesta como suplemento dietético.

[0019] En una realización, una o más bacterias probióticas mejoradas por la composición divulgada pueden incluir al menos una bacteria productora de ácido láctico. En otra realización, las bacterias productoras de ácido láctico pueden

incluir, por ejemplo, una bacteria *Lactobacillus*. En otra realización, las bacterias productoras de ácido láctico pueden incluir, *Lactobacillus rhamnosus*.

[0020] En el cocinado de estilo casero, los caldos de pollo o pavo pueden prepararse cocinando durante un largo período en un recipiente abierto o a gran temperatura en un recipiente a presión. Como contraste, esta divulgación proporciona productos de caldo con una composición y unos métodos de preparado únicos. También se divulgan aquí métodos de selección y preparación de materias primas, de cocinado de materias primas y de separación y purificación de los caldos resultantes.

[0021] De acuerdo con una realización que no forma parte de la presente invención, las materias primas de origen avícola se trituran bien para maximizar la extracción de diversos compuestos beneficiosos. En un aspecto que no forma parte de la invención, la materia prima puede reducirse a un tamaño inferior a unos 2cm, 1 cm, 5mm, 4mm, 3mm, 2mm, o inferior a 2mm. El procesado mecánico de las partes de las aves para la obtención de pequeñas partículas antes de su cocinado puede ayudar a maximizar la extracción de ciertos compuestos. En otra realización que no forma parte de la invención, debido al procesado mecánico de las partes de las aves para la obtención de pequeñas partículas antes de su cocinado, pueden emplearse unas condiciones de cocinado más suaves (p. ej., a una temperatura de 60-100°C) y un tiempo de cocinado más breve (de entre aproximadamente 8 a 300 minutos) para obtener el caldo a partir de las partes de aves procesadas. Dicho cocinado más suave y breve puede ayudar a evitar la inactivación de ciertos compuestos que quedarían inactivados si se emplearan métodos de procesado y cocinado convencionales. La preservación de dichos compuestos puede explicar los mayores beneficios para la salud observados cuando se comprueban los caldos que no forman parte de la invención y se comparan con otros productos de caldo no preparados de acuerdo con los métodos divulgados en la presente.

[0022] De acuerdo con la presente invención, las partes de aves con hueso y cartílago se separan mecánicamente y se trituran para obtener finos fragmentos de menos de 5mm (milímetros), 4mm, 3mm, 2mm, o 1 mm de tamaño. En un aspecto, no se retira la carne residual de los huesos. Estos pequeños fragmentos se cocinan a unos 70 °C, 100 °C, 110 °C, 120 °C, o como máximo 150 °C, durante al menos 8 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, o 6 horas o más para maximizar la extracción de cierta fracción de caldo y/o de ciertos compuestos del caldo.

[0023] En otra realización, el caldo preparado de acuerdo con los métodos divulgados muestra perfiles proteínicos distintos de los obtenidos a partir de otros productos de caldo comercial en el análisis por SDS-PAGE. En un aspecto, al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, o un 90% de las proteínas totales en las composiciones divulgadas tienen un peso molecular de entre 10 kD (kilo-Dalton) y 70 kD. En otro aspecto, al menos un 95% de las proteínas de las composiciones divulgadas tienen un peso molecular inferior a 100 kD. En otro aspecto, puede utilizarse algún método para seguir reduciendo el peso molecular de las proteínas del caldo a menos de 10 kD, 5 kD, o incluso a menos de 3 kD para mejorar su asimilación por parte del individuo. Por ejemplo, pueden emplearse una o más enzimas de las que digieren las proteínas para reducir el peso molecular de las proteínas del caldo.

[0024] En otra realización, la composición divulgada puede contener al menos un 40% de proteína por peso de sólidos totales. Por ejemplo, la composición divulgada puede contener un 50%, 60%, 70%, o un 80% o más de proteínas por peso de sólidos totales en la composición. En otra realización, la composición divulgada puede contener menos de un 10% de carbohidratos por peso de sólidos totales. Por ejemplo, la composición divulgada puede contener un 8%, 5%, 2%, o un 1% o menos carbohidratos por peso de sólidos totales en la composición. En otra realización, la composición divulgada se prepara a partir de material de origen animal y no contiene proteínas de origen vegetal. En otra realización, la composición prebiótica divulgada no contiene una cantidad detectable de gluten. En otra realización, la composición

prebiótica divulgada no contiene una cantidad detectable de gluten que pudiera causar reacciones adversas en un individuo con intolerancia o alergia al gluten.

5 **[0025]** En otra realización, la composición divulgada puede contener los aminoácidos prolina e histidina, donde el ratio entre la prolina y la histidina es de al menos 4:1 por peso. En un aspecto, la prolina está presente en la composición en al menos un 8% (w/w), 10% o más sobre base sólida. En otro aspecto, el ratio entre la prolina y la histidina es de al menos 6:1 por peso.

10 **[0026]** En otra realización, la composición divulgada puede contener los aminoácidos glicina e histidina, donde el ratio entre la glicina y la histidina es de al menos 6:1 por peso. En un aspecto, la glicina está presente en los aminoácidos totales de las composiciones divulgadas en al menos un 12%, 14% o más (w/w) sobre base sólida. En otro aspecto, el ratio entre la glicina y la histidina es de al menos 10:1 por peso.

[0027] En otra realización, la composición divulgada puede contener los aminoácidos hidroxiprolina e histidina, donde el ratio entre la hidroxiprolina y la histidina es de al menos 4:1 por peso. En un aspecto, la hidroxiprolina está presente en los aminoácidos totales de las composiciones divulgadas en al menos un 7%, 8% o más (w/w) sobre base sólida. En otro aspecto, el ratio entre la hidroxiprolina y la histidina es de al menos 6:1 por peso.

15 **[0028]** En otra realización, la composición divulgada puede contener prolina, glicina hidroxiprolina e histidina. En un aspecto, el ratio entre la glicina y la histidina es de al menos 6:1 por peso. En otro aspecto, la glicina está presente en la composición en al menos un 12% (w/w) sobre base sólida. En otro aspecto, el ratio entre la prolina y la histidina es de al menos 4:1 por peso. En otro aspecto, el ratio entre la hidroxiprolina y la histidina es de al menos 6:1 por peso.

20 **[0029]** En otra realización, la composición divulgada puede contener prolina y otros aminoácidos, y la cantidad de prolina es de al menos 8%, 10% o mayor por peso de aminoácidos totales en la composición. En otra realización, la composición divulgada puede contener glicina y otros aminoácidos, y la cantidad de glicina es de al menos 20% por peso de aminoácidos totales en la composición. En otra realización, la composición divulgada puede contener hidroxiprolina y otros aminoácidos, y la cantidad de hidroxiprolina es de al menos 8% por peso de aminoácidos totales en la composición.

25 **[0030]** En otra realización, la composición divulgada puede contener uno o más aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) (p. ej., valina, leucina e isoleucina), y los BCAA de la composición están presentes a niveles más elevados que el nivel de BCAA en otros productos de caldo. En un aspecto, la cantidad de BCAA totales, incluidas la valina, leucina e isoleucina, es de al menos 5%, 6%, o 7% por peso de aminoácidos totales en la composición.

30 **[0031]** En otra realización, los productos de caldo preparados de acuerdo con la presente divulgación pueden tener un ratio de humedad/proteína (MPR) de entre 999:1 y 1:999, o de entre 200:1 y 10:1. Por ejemplo, un MPR de 200:1 significa que el producto contiene 200 partes de agua y 1 parte de carne (proteína). En otra realización, los productos de caldo preparados de acuerdo con la presente divulgación pueden tener un ratio de humedad/proteína (MPR) de entre 150:1 y 40:1, o de entre 135:1 y 67:1.

35 **[0032]** El sulfato de condroitina (CS) es rico en cartilago y se ha determinado que resulta beneficioso para la salud de las articulaciones. La selección de materias primas y el proceso de preparación del caldo pueden contribuir a los niveles relativamente altos de sulfato de condroitina en la composición divulgada. En una realización de la presente divulgación, la composición del caldo puede contener al menos un 6%, 7%, 8%, o un 10% de sulfato de condroitina por peso de sólidos secos totales en la composición, según una medición mediante digestión enzimática y un ensayo de detección LC-UV. Véase, por ejemplo, Ji et al., Journal of AOAC International, Vol. 90, No. 3, 659-69 (2007), que se incorpora aquí por referencia en la presente divulgación.

[0033] En un aspecto, la composición puede tener forma líquida, lista para su consumo, o puede tener forma de líquido concentrado, como caldo concentrado. En otro aspecto, la composición puede tener forma sólida, como polvo o pasta.

[0034] En una realización, la composición puede contener uno o más polifenoles, donde la concentración de polifenoles es de al menos 4.000 mg/ml GAE (equivalente de ácido gálico) según un estudio de Folin-Ciocalteu.

- 5 **[0035]** En otra realización, la composición puede contener aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, donde la glicina constituye al menos el 12% (w/w), la prolina constituye al menos el 8% (w/w), y la hidroxiprolina constituye al menos 7% (w/w) de los aminoácidos totales de la composición. En otra realización, la composición prebiótica divulgada no contiene una cantidad detectable de gluten. En otra realización, la composición prebiótica divulgada no contiene una cantidad detectable de gluten que pudiera causar reacciones adversas en un individuo con intolerancia o alergia al gluten.
- 10 **[0036]** Las bacterias probióticas se cultivan típicamente en medios de cultivo antes de ser cosechadas y empleadas como suplemento dietético. En una realización, la composición prebiótica divulgada puede utilizarse para cultivar una bacteria probiótica. Las bacterias probióticas pueden cultivarse en un medio que contenga, entre otros, la composición prebiótica divulgada preparada a partir de material avícola. En un aspecto, la composición prebiótica divulgada contiene fibra de colágeno soluble preparada a partir de material avícola.
- 15 **[0037]** Las composiciones de caldo aquí divulgadas pueden caracterizarse por la composición única descrita aquí. Las composiciones de caldo también pueden caracterizarse por los métodos mediante los que son preparadas. Además, los caldos divulgados también son únicos en cuanto a los beneficios para la salud que pueden proporcionarle al individuo. Puede dividirse a los individuos en dos grupos, uno grupo ingiere (o consume) una cantidad efectiva del producto de caldo revelado cada día, mientras que el otro grupo ingiere agua u otros productos de caldo. Pueden medirse a continuación
20 los diversos indicadores y realizarse la comparación entre los dos grupos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0038]

La Figura 1 muestra el dendrograma UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) de muestras fecales.

La Figura 2 muestra el dendrograma UPGMA de muestras cecales.

- 25 La Figura 3 muestra el perfil DGGE (electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización) generado para la selección de bandas de ADN representativas de especies influenciadas por la adición de AAC1 a su dieta. Las bandas numeradas indican regiones de interés potenciales. Los carriles quedan como sigue: (1) Cecal - Agua; (2) Cecal - AAC1; (3) Cecal - Producto comercial; (4) Cecal - Casero; (5) Fecal - Agua; (6) Fecal - AAC1; (7) Fecal - Producto comercial.

- 30 La Figura 4 muestra que los distintos productos de caldo de pollo no alteran significativamente los Bacterioidetes: Ratio de Firmicutes.

La Figura 5 muestra que el AAC1 selecciona Proteobacteria en el tracto GI inferior.

La Figura 6 muestra que el AAC1 selecciona o mantiene Lactobacillus en el tracto GI inferior.

La Figura 7 muestra que el AAC1 selecciona o mantiene Lactobacillus en el intestino ciego.

La Figura 8 muestra que el AAC1 aumenta la diversidad de la microbiota en el intestino.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0039] La sopa de pollo y el caldo de pollo llevan siglos disponibles para consumo humano. Los estudios han demostrado diversos beneficios para la salud de la sopa o el caldo de pollo. De acuerdo con el método de estilo casero convencional, la sopa o el caldo de pollo se preparan hirviendo un pollo entero o grandes partes de un pollo en una olla con agua durante un largo período. La sopa o el caldo así preparados pueden no poseer efectos maximizados de mejora para la salud puesto que algunos de los compuestos pueden perderse durante el cocinado o durante el procesado, mientras que otros compuestos pueden no llegar a extraerse de las partes del pollo.

[0040] En una realización, esta divulgación proporciona métodos de uso del caldo de pollo como prebiótico. Los prebióticos difieren de los probióticos (esto es, las llamadas "bacterias buenas") en que los prebióticos no son organismos vivos, sino ingredientes que pueden servir de base a o mejorar los probióticos. Los prebióticos sortean típicamente el sistema digestivo superior y llegan al intestino intactos tras su ingesta. También es posible que los prebióticos influyan en las bacterias de la sección superior del GI, de forma que dichas bacterias de la sección superior del GI comiencen a fermentar nutrientes, que, a su vez, proporcionan metabolitos que sirven de base selectivamente para las "bacterias buenas" de la sección inferior del intestino. Una vez en el intestino, los prebióticos pueden desempeñar un papel importante en la fermentación por parte de la microbiota normal del intestino. El proceso de fermentación puede estimular y promover la proliferación de las "bacterias buenas", como el *Lactobacillus*.

[0041] Según se utiliza aquí, el término "probiótico" puede hacer referencia a diversos microorganismos que puede consumir un individuo en forma de suplementos para obtener beneficios. El término "probiótico" también puede hacer referencia a diversos microorganismos distintos que habitan de forma natural el cuerpo de un huésped y proporcionan beneficios para su salud. Ejemplos de dichas bacterias deseables pueden incluir, sin límite, *Lactobacillus*, *Parasutterella*, *Morganella*, *Oscillospira*, *Coprococcus*, *Oscillibacter*, *Odoribacter*, *Gastranaerophilales*, *Allabaculum*, o *Faecalibacterium*. Por ejemplo, se ha demostrado que muchas bacterias *Lactobacillus* son beneficiosas para el ser humano. También se ha demostrado que las bacterias *Faecalibacterium* son antiinflamatorias. Véase "*Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(43): 16731-6 (2008)

[0042] Los métodos divulgados pueden ayudar a preservar ciertos componentes mediante el procesado de las partes del pollo antes de su cocinado y mediante el control de la temperatura de procesado y su tiempo de cocinado para maximizar la extracción de compuestos beneficiosos, minimizando al mismo tiempo la pérdida de actividad debida a las duras condiciones de procesado.

[0043] La materia prima de origen avícola especialmente seleccionada puede procesarse de acuerdo con los métodos divulgados para obtener un caldo con un alto contenido proteínico. Ciertos aminoácidos están presentes en una concentración relativamente mayor en comparación con el caldo casero y los productos comerciales. En un aspecto, según se demuestra en varios estudios con animales aquí descritos, las composiciones de caldo divulgadas pueden ser efectivas para mejorar el bienestar de los probióticos del huésped. En otro aspecto, las composiciones de caldo divulgadas pueden aumentar el recuento de microorganismos vivos de los probióticos del huésped. En otro aspecto, las composiciones de caldo divulgadas pueden mejorar de forma selectiva ciertos microorganismos, pero no otros. En otro aspecto, las composiciones de caldo divulgadas pueden aumentar la diversidad de microorganismos en el intestino del huésped.

[0044] Los términos "caldo" y "sopa" hacen referencia a una composición líquida que contiene al menos un soluto y también puede utilizarse para hacer referencia a una forma lista para servir, un concentrado, un caldo concentrado bien en forma líquida o sólida.

[0045] El caldo de ave de la divulgación puede contener una cantidad significativa de distintos aminoácidos. Dichos aminoácidos pueden estar presentes en forma de proteína o como aminoácidos libres en el caldo. Los aminoácidos totales incluyen tanto los presentes en forma de proteínas como los presentes en forma de aminoácidos libres. A efectos de esta divulgación, el ratio de los distintos aminoácidos en una composición de caldo hacer referencia al ratio de los aminoácidos totales.

[0046] El término "sólido seco" o "sólido", según se utiliza aquí, hace referencia a los componentes de una composición líquida que permanecen tras la eliminación de todo el líquido libre de la composición líquida. En el caso de un caldo acuoso, el líquido libre es agua.

[0047] El término "administrar" significa proporcionar un material a un individuo, por ejemplo, mediante ingesta oral.

[0048] El término "no detectable" significa que un producto químico o un ingrediente puede estar presente en una cantidad tan pequeña que no puede ser medida mediante los instrumentos analíticos disponibles en la actualidad.

[0049] El término "sujeto" o "individuo" se emplea para hacer referencia a un mamífero, incluidos los seres humanos.

[0050] El término "sustancialmente" significa en al menos un 10-20%.

Ejemplos

[0051] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar las realizaciones y no son limitativos. El alcance de la presente invención está limitada por las reivindicaciones. Las materias primas, los reactivos, los productos químicos y demás materiales se presentan como componentes ejemplares o reactivos, y pueden realizarse diversas modificaciones en función de la discusión precedente dentro del ámbito de la presente divulgación. A menos que se especifique lo contrario en la presente divulgación, los componentes, los reactivos, el protocolo y demás métodos empleados en el sistema y los ensayos, según lo descrito en los Ejemplos, son meramente ilustrativos.

Ejemplo 1 Preparación de caldo a partir de partes de pavo

[0052] En este ejemplo, se usaron partes de pavo para preparar un caldo y se determinaron la calidad general del caldo y sus potenciales beneficios para la salud. En breve, el pavo crudo se separó mecánicamente y se molieron las partes para obtener fragmentos de menos de 2mm de tamaño para maximizar la extracción. Los pequeños fragmentos de las partes de pavo se cocinaron en condiciones suaves a 91°C (195°F) al vapor durante unos 15 o menos. A continuación, se separó el caldo de la fracción insoluble por decantado. La gasa liberada en el caldo también se retiró con un separador centrífugo. El caldo se concentró en un evaporador comercial, se congeló y se empaquetó para su venta.

Ejemplo 2 Preparación de caldo a partir de partes de pollo

[0053] En este estudio, las partes de pollo separadas con huesos y cartílago se cocinaron en agua a una temperatura superior a 121 °C (250 °F) durante más de 6 horas para maximizar la extracción de ciertas fracciones y/o compuestos de caldo. El caldo obtenido a partir de este proceso se designó "AAC1" para referencia interna. Más concretamente, los huesos de pollo crudos inspeccionados por USDA y separados que quedaron tras retirar los principales músculos se cocinaron en agua en un gran tanque de cocinado industrial de acero inoxidable. Tras cocinarlos, la parte líquida del caldo se separó de los sólidos de pollo mediante decantado. El caldo se concentró en un evaporador comercial y se secó por atomización y se empaquetó en envases etiquetados.

Ejemplo 3 Comparación de los perfiles de proteína y aminoácidos de distintos caldos

[0054] Las proteínas son moléculas grandes compuestas por una o más cadenas de aminoácidos que realizan un amplio abanico de funciones en sistemas biológicos como, por ejemplo, funcionar como enzimas, facilitar la comunicación celular y proporcionar soporte estructural a las células. Los seres humanos, al igual que otros animales obtienen estos aminoácidos esenciales de la proteína consumida como parte de su dieta, puesto que carecen de las enzimas necesarias para sintetizarlos. El objetivo del presente estudio era determinar la concentración y el rango de tamaño de las proteínas en el caldo de pollo AAC1 en comparación con un producto casero.

[0055] Se comparó una muestra preparada de acuerdo con la presente divulgación (AAC1) con otra preparada de acuerdo con métodos de cocinado de estilo casero (Casero). El porcentaje sólido (w/v) para AAC1 fue 8% sólido, mientras que el porcentaje (w/v) para Casero fue 1,7% sólido.

10 **[0056]** Antes de determinar la cantidad de proteína mediante el método Bradford, cada muestra se diluyó en agua destilada a una solución final de 1% w/v. Se preparó una curva estándar empleando albúmina de suero bovino (0-3,5mg/mL). Se analizaron todas las muestras por triplicado. La cantidad de proteína total se determinó empleando un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Cantidad de proteína total en las muestras de caldo

promedio					
0,446	1,558	1,691	1,691	0,132	7,8
0,461	1,693				
0,474	1,821				
0,544	2,496	2,52	2,52	0,034	1,3
0,549	2,544				

15

[0057] Para corregir las diferencias en el porcentaje de sólidos en las muestras de AAC1 (8%) y Casero (1,7%), los valores de proteína basados en una solución al 1% para AAC1 y Casero se multiplicaron por sus respectivos % sólidos de partida. Las cantidades finales ajustadas de proteína total para AAC1 y Casero aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2 Concentración de proteína total ajustada en AAC1 y caldo casero

13,6 mg/ul -	
4,3 mg/ul	31,6%

20

[0058] Para determinar el perfil proteínico de cada muestra, se mezclaron volúmenes iguales de muestras de AAC1 y Casero (15,6ml) con un tampón de muestra de Laemmli y un agente reductor, calentados a 95 °C durante 5 minutos, y

separados en un gel 4-12% Bis Tris. El rango de tamaño relativo de las proteínas se determinó por comparación con un estándar proteínico disponible en el mercado (de 4,5 kDa a 300 kDa). Se aplicó una tensión constante de 150V al gel durante 30 minutos, permitiendo la separación de las proteínas en cada muestra. Las proteínas se visualizaron en el gel utilizando SimplyBlue™ SafeStain.

- 5 **[0059]** Los resultados aparecen en la Figura 1. El carril 1 muestra el perfil proteínico para el caldo casero, el carril 2 para el caldo AAC1, y el carril 3 es el estándar de peso molecular. En base a los perfiles proteínicos, AAC1 está compuesto por aproximadamente tres veces más proteína que un producto casero. Las proteínas en el producto casero mostraron una distribución del peso molecular de más amplio espectro, y contenían tanto proteínas grandes (de hasta unos 300-500 kD) como pequeñas (de unos 5-15kD). Como contraste, la mayoría (esto es, más del 50%) de las proteínas en AAC1
- 10 tiene un peso molecular de entre 70 kDa y 15 kDa.

[0060] También se analizó el contenido de aminoácidos individuales. La Tabla 3 que aparece a continuación muestra el contenido de aminoácidos individuales de las composiciones de caldo preparadas de acuerdo con los métodos divulgados en comparación con las preparadas empleando métodos de tipo casero así como otros productos comerciales.

Tabla 3 Composición en aminoácidos de distintos caldos

anteriores calculados al 100% sobre base sólida:	3823	Producto comercial	Casero- 1	Casero- 2	AAC1-1	AAC1-2	AAC1-3
-	W/W%	%					
Taurina	2,50						
Ácido aspártico	3,63	2,44	3,63	3,47	7,04	5,34	5,38
Treonina	1,44	0,76	1,52	1,42	1,75	2,13	1,79
Serina	1,56	1,34	1,96	1,89	2,08	1,88	2,40
Ácido glutámico	10,25	6,98	9,44	9,26	10,52	9,50	10,14
Prolina	3,53	3,05	5,93	5,57	9,59	10,66	11,07
Hidroxiprolina	2,19	2,99	5,31	4,92	Na	7,00	9,39
Glicina	5,97	7,38	8,79	9,47	18,02	15,41	17,68
Lantionina	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Alanina	3,91	3,37	4,60	4,58	8,06	7,53	7,53
Cistina	0,44	0,29	0,34	0,40	0,00	0,25	0,17
Valina	1,44	0,73	1,43	1,42	2,44	2,19	2,21

Isoleucina	1,13	0,47	1,18	1,02	1,54	1,59	1,59
Leucina	2,72	1,51	2,48	2,32	3,38	3,47	3,43
Metionina	0,81	0,52	0,93	0,77	1,01	1,06	1,10
Tirosina	0,88	0,44	0,81	0,65	1,09	1,00	0,09
Fenilalanina	1,00	0,73	9,53	7,03	2,30	2,16	1,98
Hidroxilisina	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Histidina	2,03	2,56	2,70	1,73	1,32	1,16	1,00
Ornitina	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lisina	3,75	2,67	3,07	3,00	3,96	3,66	3,05
Arginina	3,06	2,79	4,01	3,75	8,24	6,69	6,61
Triptófano	0,16	0,06	0,12	0,09		0,22	0,15
Total	54,84	41,08	67,80	62,79	82,35	82,88	87,55

Ejemplo 4 Comparación de los niveles de sulfato de condroitina (CS) en distintos caldos

[0061] El sulfato de condroitina (CS) es un componente estructural importante que se encuentra en el cartílago y está implicado en la salud articular. Se ha demostrado que el CS reduce los niveles de muchos mediadores inflamatorios como iNOS, PGE2, COX-2 (Gwendolyn, Spine 2011), y NFkB (Vallières, Osteoarthritis Cartilage, 2010). El objetivo del presente estudio era determinar la cantidad de CS en diversas muestras de caldo de pollo. Los caldos de pollo se analizaron para ver el CS total utilizando digestión enzimática y detección LCUV (Ji, Journal of AOAC International, 2007). Los resultados se calcularon como un área en la curva en comparación con las muestras estándar y el límite de cuantificación como 8 mg de sulfato de condroitina/g material seco (Tabla 4). Entre los caldos de pollo comprobados, AAC1 resultó tener la mayor cantidad de CS (8,797% w/w).

Tabla 4 Cantidades de sulfato de condroitina (CS)

Muestras	Media (mng)	Seco mg/g	Seco % w/w
Caldo de pollo en polvo AAC1	17.480	87.971	8.797
Caldo de pollo en polvo H814	15.443	67.553	6.755
TSN Concentrado congelado	10.886	52.059	5.206

(continuación)

Muestras	Media (mng)	Seco mg/g	Seco % w/w
Concentrado congelado de pollo IDF 823	8.627	42.104	4.210
Caldo casero a partir de espinazos	5.866	28.258	2.826
Concentrado congelado de pavo 824	5.243	26.227	2.623
Caldo de pollo en polvo HML 34511	4.979	24.335	2.434
Caldo de pollo en polvo A1004	3.817	18.305	1.830
Caldo de pollo en polvo P1301	3.075	15.054	1.505
Caldo casero a partir de partes de pollo	2.185	10,99	1,09
Caldo casero a partir de cuellos de pollo	1.937	9.361	0.936

Ejemplo 5 Comparación de la concentración de polifenoles en distintos caldos de pollo

- 5 [0062] La concentración de polifenoles en distintos caldos de pollo se determinó empleando un método Folin-Ciocalteu modificado (Slinkard, American Journal of Enology and Viticulture, 1977). Los polifenoles son una clase de compuesto químico conocido por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Mientras los caldos AAC1 y de estilo casero contenían polifenoles, el caldo AAC1 contenía 4828,8 mg/mL GAE de polifenoles, que es aproximadamente siete veces más GAE de polifenoles que un caldo casero (687,7 mg/mL GAE) hecho con el mismo tipo de partes de pollo.

Ejemplo 6 Efectos de la ingesta de caldo sobre el microbioma del GI inferiorPreparación de CGTasa

- 10 [0063] Se proporcionaron diversas composiciones de caldo a roedores y se recogieron muestras fecales el Día 0 (basal) y el Día 14. Se empleó electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) para analizar los cambios en los perfiles microbianos. Las composiciones de caldo comprobadas incluyen: el caldo divulgado AAC1, agua (como control negativo), caldo de estilo casero y un producto de caldo comercial. Se compararon los perfiles DGGE del microbioma el Día 0 y el Día 14 tras haber alimentado a los animales con las composiciones de caldo.
- 15 [0064] Todas las muestras basales mostraban un grado relativamente alto de similitud. Como mucho, había una diferencia del 9% entre las muestras basales de los grupos de AAC1 y agua. La diferencia media entre todas las muestras basales fue de 6,1%. La introducción de los distintos caldos de pollo, así como el período de dos semanas, dieron como resultado

una variabilidad adicional entre las muestras. Como mucho, AAC1 y el producto de caldo comercial difirieron en un 15%. Por el contrario, el caldo Casero difirió del agua y el caldo comercial en un 9%. La diferencia media entre todas las muestras basales fue de 12%.

5 [0065] Todas las muestras cambiadas en composición entre el Día 0 (basal) y el Día 14. Por ejemplo, la diferencia entre el control de agua el Día 0 (basal) y el Día 14 fue de 7%. Este cambio del 7% mostró un microbioma intestinal relativamente estable durante un período de dos semanas y sirve como un excelente control. La varianza media entre todas las muestras desde el Día basal al Día 14 fue del 13,5%.

10 [0066] Se agruparon y clasificaron los distintos perfiles en base a las similitudes de banda (esto es, presencia/ausencia de bandas de ADN) en DGGE. Los animales que recibieron caldo de pollo AAC1 experimentaron un cambio notable en sus microbiomas intestinales en comparación con los animales que recibieron agua o los otros dos caldos. Este resultado se muestra más claramente en la Figura 1, puesto que la agrupación jerárquica revela que las disimilitudes observadas en los animales alimentados con AAC1 son exclusivas de esta administración. Los animales alimentados con AAC1 el Día 14 no se agrupan con ninguno de los otros grupos, ni el basal ni el del Día 14. Esto indica que el caldo AAC1 causa un cambio único en el microbioma intestinal del roedor. La escala en la parte inferior de la Figura 1 indica la similitud
15 porcentual entre agrupaciones.

Ejemplo 7 Efectos de la ingesta de caldo sobre el microbioma del intestino ciego

[0067] También se recogieron muestras cecales para cada grupo de alimentación el Día 14 y se analizaron de acuerdo con los mismos protocolos arriba descritos. Aunque muchos microorganismos encontrados en las heces también se encuentran en el intestino ciego, el contenido del intestino ciego ofrece una visión adicional del microbioma intestinal y de cualquier cambio asociado que pueda tener lugar en el animal por una función/unas condiciones distintas del órgano. La desventaja del análisis cecal es que el animal debe ser sacrificado para la recolección, por lo que no se recogieron muestras basales. El análisis DGGE del material cecal revela un alto grado de similitud entre los animales alimentados con agua, caldo casero y producto de caldo comercial (diferencia media del 4,6% entre las tres muestras). Es interesante
20 notar que el grupo AAC1 mostró una diferencia de más del 14% con respecto al grupo alimentado con caldo comercial, casero y agua.

[0068] Se agruparon y clasificaron los distintos perfiles en base a las similitudes de banda (esto es, presencia/ausencia de bandas) en DGGE. La escala en la parte inferior de la Figura 2 indica la similitud porcentual entre agrupaciones.

[0069] Los resultados del análisis del material cecal reflejan los de las muestras fecales. Si bien no hay información de base disponible con respecto a la composición de la microbiota cecal, los 14 días de ingesta de caldo AAC1 produjeron
30 una composición cecal única (Figura 2).

[0070] En un intento de comparar los cambios entre el material fecal y cecal, se creó el gel de la Figura 3. Este gel permitió la comparación directa entre todas las muestras fecales y cecales seleccionadas. A partir de este resultado, se seleccionaron once regiones de interés, cada una de ellas correspondiente a una especie bacteriana única. La secuenciación directa del ADN de las bandas permitió la identificación de varias especies alteradas como resultado de la ingesta de AAC1 (Tabla 5). Dada la gran diversidad de la microbiota intestinal, algunas especies no pudieron ser
35 identificadas, puesto que no habían sido caracterizadas previamente.

Tabla 5 Resultados de la secuenciación de ADN de bandas alteradas por alimentación con AAC1

1	Acholeplasma sp.	Encontrado en todas las muestras fecales y cecales, pero parece haberse reducido en heces AAC1.	Saprotrofico o patógeno. Se sabe poco de su papel en el intestino.	Firmicutes
2	Lachnospiraceae no cultivadas	Exclusiva de las muestras fecales y cecales de AAC1. No se encontró en ningún otro control o grupo de tratamiento.	Estrechamente relacionado con Clostridium	Firmicutes
3	Lactobacillus rhamnosus	Exclusivo del intestino ciego AAC1. No se encontró en ninguna otra muestra, fecal ni cecal.	Probiótico famoso. Ciertas cepas han demostrado producir una serie de efectos beneficiosos para la salud.	Firmicutes
4	Lachnospiraceae no cultivadas	Exclusiva de las muestras fecales y cecales de AAC1. No se encontró en ningún otro control o grupo de tratamiento.	Estrechamente relacionado con Clostridium.	Firmicutes
5	Muestra mixta/No secuencia conocida	N/D	No procede	No procede
6	Clostridium sp. no cultivado	Exclusivo del intestino ciego AAC1. No se encontró en ninguna otra muestra, fecal ni cecal.	Residentes habituales de la microbiota intestinal. Metabólicamente diverso.	Firmicutes
7	Muestra mixta/No secuencia conocida	N/D	No procede	No procede
8	Clostridiales no cultivados	Encontrado en todas las muestras fecales y cecales, pero parece haber aumentado en las heces AAC1.	Residentes habituales de la microbiota intestinal. Metabólicamente diverso.	Firmicutes
9	Muestra mixta/No secuencia conocida	Exclusiva de las muestras fecales y cecales de AAC1. No se encontró en ningún otro control o grupo de tratamiento.	No procede	No procede

(continuación)

10	Muestra mixta/No secuencia conocida	Exclusivo del intestino ciego AAC1. No se encontró en ninguna otra muestra, fecal ni cecal.	No procede	No procede
11	Clostridium polysaccharolyticum	Presente en todas las muestras fecales, pero también aparece en el intestino ciego tratado con AAC1. No aparece en ninguna otra muestra cecal.	Capaz de degradar un amplio abanico de polisacáridos complejos, incluidos la celulosa y el xilano.	Firmicutes

[0071] La banda tres es una secuencia de especial interés, que se identificó como *Lactobacillus rhamnosus*. Esta especie se encontró solamente en el contenido cecal de los animales alimentados con caldo AAC1. *L. rhamnosus* es un probiótico famoso disponible en el mercado, pero también es un residente nativo de la microbiota intestinal. Varios estudios han indicado que hay numerosos beneficios para la salud asociados con la ingesta de ciertas cepas de *L. rhamnosus*. Por ejemplo, las investigaciones han demostrado que la ingesta de *L. rhamnosus* por parte de los ratones puede llevar a niveles más bajos de las hormonas de la ansiedad y el estrés.

Ejemplo 8 Uso de secuenciación de última generación para identificar bacterias probióticas en muestras fecales

- [0072] En un humano adulto sano, el 80% de la microbiota fecal identificada puede clasificarse en tres filos dominantes: Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria. El ratio de Firmicutes:Bacteroidetes se ha considerado como buen indicador de composición y equilibrio de la microbiota intestinal. Véase Ley et al. (2006). Se midió el ratio de Firmicutes: Bacteroidetes para los grupos de roedores alimentados con distintos productos de caldo. Según se muestra en la Figura 4, el ratio de Firmicutes:Bacteroidetes no cambió significativamente entre los distintos grupos.
- [0073] Los perfiles de microbiota fecal son buenos indicadores de la microbiota del tracto GI inferior. La Figura 5 muestra la relativa cantidad de Proteobacteria en el tracto GI inferior de animales alimentados con distintas composiciones de caldo. AAC1 seleccionado para Proteobacteria en el tracto GI inferior de los animales. También se midieron las cantidades relativas de *Lactobacillus* en el tracto GI inferior de los animales alimentados con distintas composiciones de caldo. Según se muestra en la Figura 6, AAC1 seleccionado para (o específicamente mantenido) *Lactobacillus* en el tracto GI inferior de los animales. Además, un género, *Faecalibacterium*, se encontró solamente en el grupo alimentado con AAC1 durante 14 días, pero no en otros grupos ni en la medición basal. Tres géneros, *Parasutterella*, *Morganella* y *Oscillospira*, estaban presentes a niveles significativamente más elevados tras 14 días en AAC1 en comparación con el nivel basal.

Ejemplo 9 Uso de secuenciación de última generación para identificar bacterias probióticas en muestras cecales

- [0074] Se midieron los perfiles de la microbiota cecal en los grupos de roedores alimentados con distintos productos de caldo. Según se muestra en la Figura 7, AAC1 seleccionado para (o específicamente mantenido) *Lactobacillus* en el intestino ciego de los animales. Además, cuatro géneros, *Odoribacter*, *Gastranaerophilales*, *Faecalibacterium* y *Allabaculum*, se encontraron solamente en el grupo alimentado con AAC1 durante 14 días, pero no en otros grupos ni en la medición basal. Tres géneros, *Lactobacillus*, *Coprococcus* y *Oscillibacter*, estaban presentes a niveles significativamente más elevados tras 14 días en AAC1 en comparación con el nivel basal. Un género, *Intestimonas*, estaba presente a niveles significativamente más elevados tras 14 días en AAC1 en comparación con el nivel basal.

Ejemplo 10 La composición divulgada mejora la biodiversidad intestinal

[0075] Otra consideración importante en el análisis de datos NGS es la biodiversidad. En la literatura específica hay acuerdo general con respecto que una microbiota intestinal más diversa es beneficiosa. Dos de las mediciones más comúnmente utilizadas de la biodiversidad en el análisis NGS son los índices Chao y Shannon-Weiner. Cada índice genera un valor representativo del grado de diversidad de la microbiota. La Figura 8 demuestra que el grado de diversidad tras 14 días era mucho más elevado en animales alimentados con AAC1 en comparación con la diversidad en grupos alimentados con Casero, otro producto comercial y los grupos de control con agua.

[0076] Todos los estudios con animales aquí descritos se realizaron empleando protocolos aprobados y cumpliendo con las normas y regulaciones gubernamentales.

10 Referencias

[0077]

Arumugam, M., et al. "Enterotypes of the human gut microbiota." *Nature* (2011).

Bravo, J. A., et al. "Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve." *Proceedings of the National Academy of Science* (2011): doi: 10.1073/pnas. 1102999108.

15 Larsen, N., et al. "Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults." *PLOS One* (2010).

Ley, R. E., et al. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proceedings of the National Academy of Science* (2005): 11070-11075.

Mariat, D., et al. "The Firmicutes/Bacteroides ratio of the human microbiota changes with age." *BMC Microbiology* (2009).

20 Ley RE, Tumbaugh P, Klein S, Gordon JI: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006, 444:1022-1023.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método para proporcionar beneficios para la salud a un individuo mejorando el microbioma de dicho individuo mediante la mejora de una o más bacterias probióticas en dicho individuo. El método comprende la administración a dicho individuo de una composición en una cantidad que resulte efectiva para mejorar
5 dichas una o más bacterias probióticas, y se caracteriza por que dicha composición comprende fibra de colágeno soluble preparada a partir de materia avícola, donde dicha composición se obtiene mediante un método que incluye los pasos de separación y triturado mecánico de partes de aves con huesos y cartílago para obtener pequeños fragmentos de menos de 5 mm, y el cocinado de dichos fragmentos a una temperatura de entre 70 y 150 °C durante un período de entre 8 minutos a 6 horas o superior.
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, donde dichas pequeñas partes de aves procesadas mecánicamente son de menos de 4 mm, 3 mm, 2 mm o 1 mm.
3. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición contiene al menos un 40% de proteína por peso de sólidos totales.
4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición contiene menos
15 de un 10% de carbohidratos por peso de sólidos totales.
5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho método comprende la administración diaria de la composición a dicho individuo en dicha cantidad efectiva durante al menos 14 días.
6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha cantidad efectiva para mejorar dichas una o más bacterias probióticas es la cantidad de dicha composición que aumenta el recuento de microorganismos
20 vivos de dichas una o más bacterias probióticas en el sistema gastrointestinal de dicho individuo cuando se le administra a dicho individuo.
7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición aumenta la diversidad microbiana en el sistema gastrointestinal de dicho individuo.
8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el método además comprende la
25 identificación de un individuo que necesite un aumento en el recuento de dichas una o más bacterias probióticas.
9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el método además comprende la medición del recuento de microorganismos vivos de dichas una o más bacterias probióticas en el sistema gastrointestinal de dicho individuo tras la administración diaria de la composición a dicho individuo en dicha cantidad efectiva durante al menos 14 días.
- 30 10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichas una o más bacterias probióticas comprende una bacteria productora de ácido láctico, especialmente una bacteria *Lactobacillus*, especialmente *Lactobacillus rhamnosus*.
11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición aumenta el recuento de microorganismos vivos de dichas una o más bacterias probióticas en el sistema gastrointestinal de dicho
35 individuo en comparación con un individuo comparable que no reciba dicha composición, y dichas una o más bacterias probióticas comprenden al menos un miembro seleccionado de entre el grupo formado por *Parasutterella*, *Morganella*, *Oscillospira*, *Faecalibacterium* y una combinación de las mismas.

12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición aumenta el recuento de microorganismos vivos de dichas una o más bacterias probióticas en las secciones superior y/o media del intestino de dicho individuo, y dicha al menos una bacteria probiótica comprende al menos un miembro seleccionado de entre el grupo formado por *Lactobacillus*, *Coprococcus*, *Oscillibacter*, *Odoribacter*, *Gastranaerophilales*, *Faecalibacterium*,
5 *Allabaculum* y una combinación de las mismas.
13. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho método comprende la administración de la composición al individuo como mezcla con una o más bacterias probióticas.
14. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición contiene aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, donde la glicina constituye al menos el 12% (w/w), la prolina constituye al
10 menos el 8% (w/w), y la hidroxiprolina constituye al menos 7% (w/w) de los aminoácidos totales de dicha composición.
15. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición no contiene una cantidad detectable de gluten.
- .

Fig.1

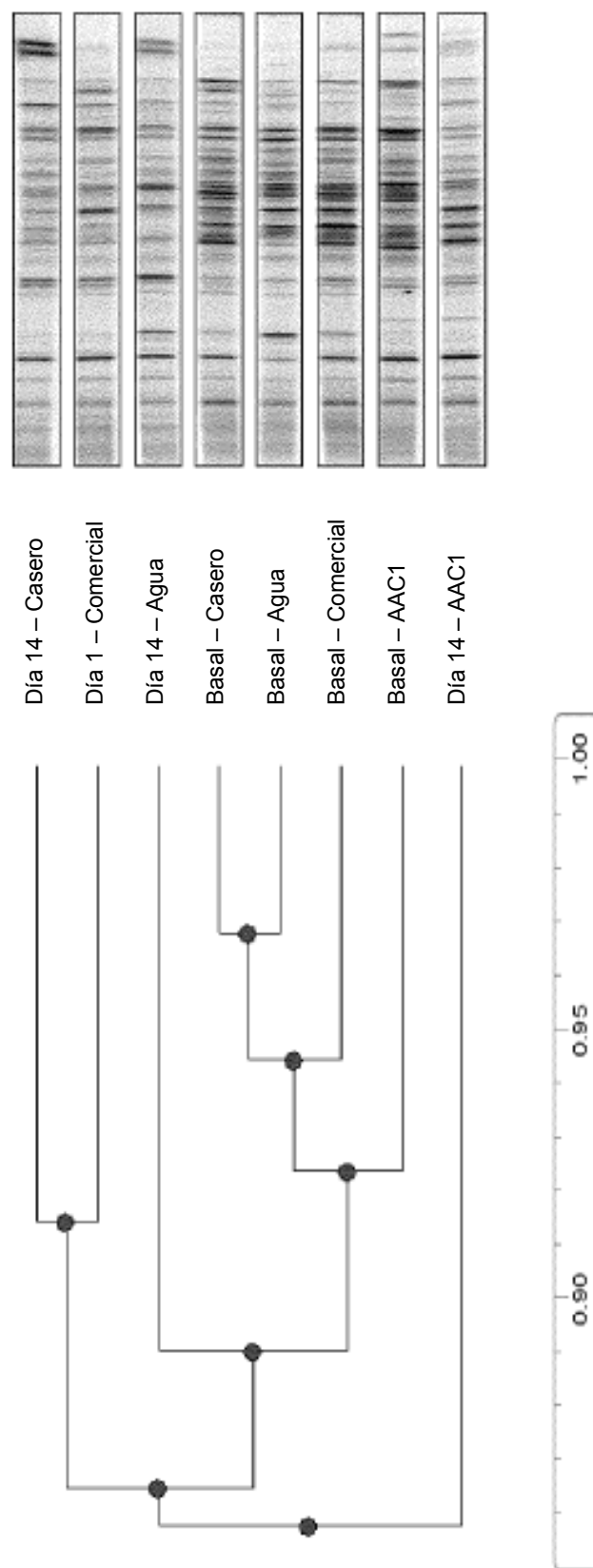


Fig.2

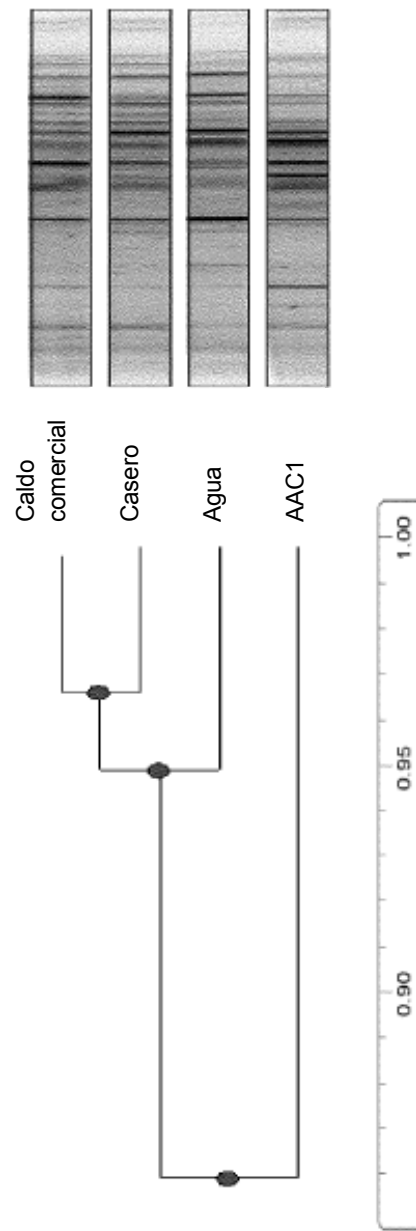
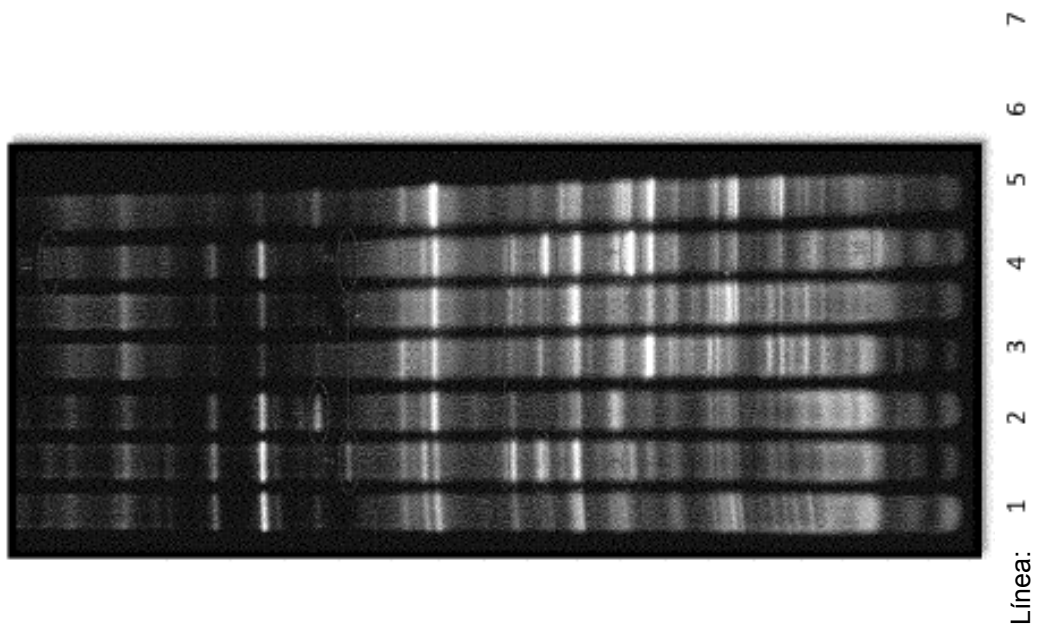


Fig.3



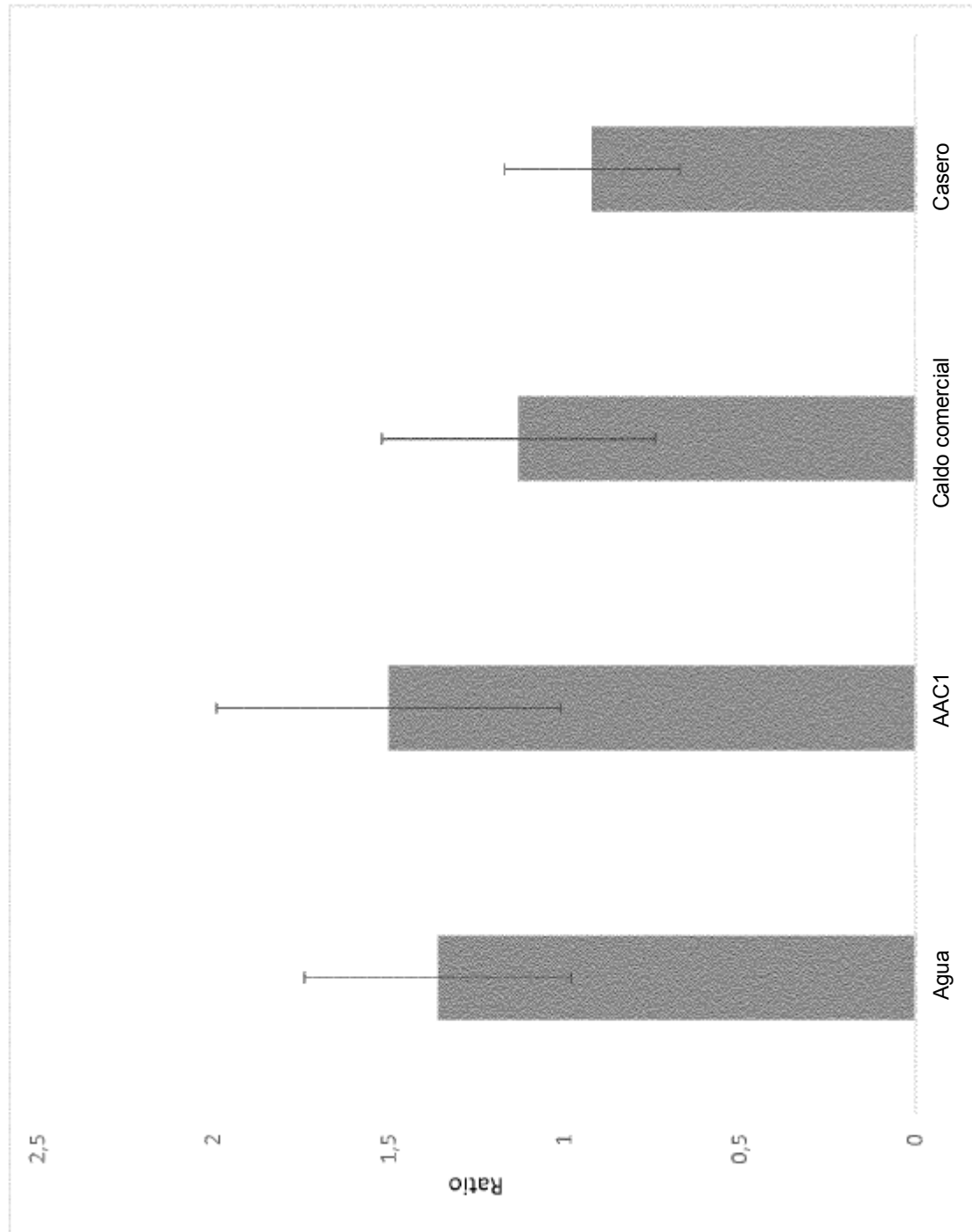


Fig.4

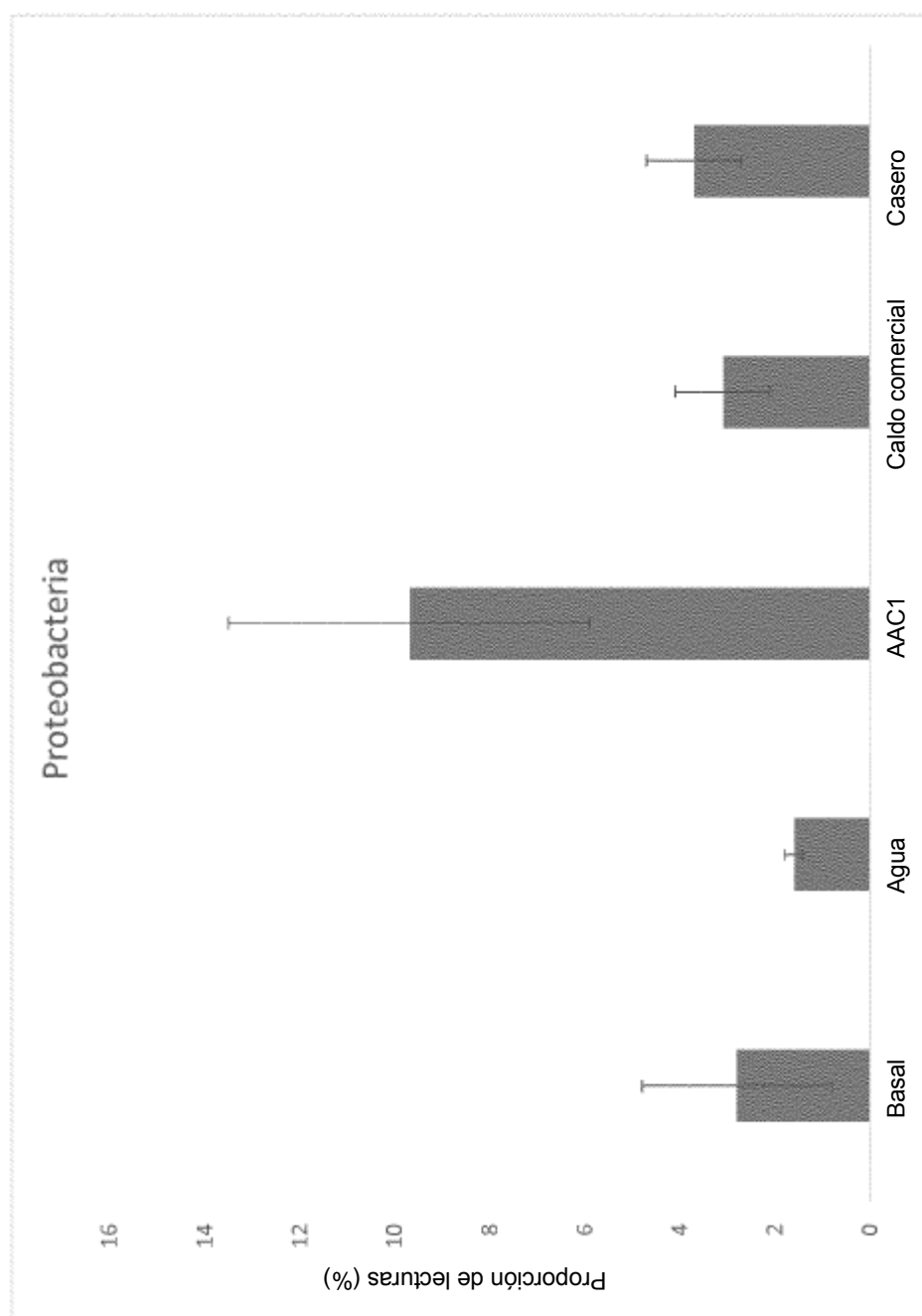


Fig.5

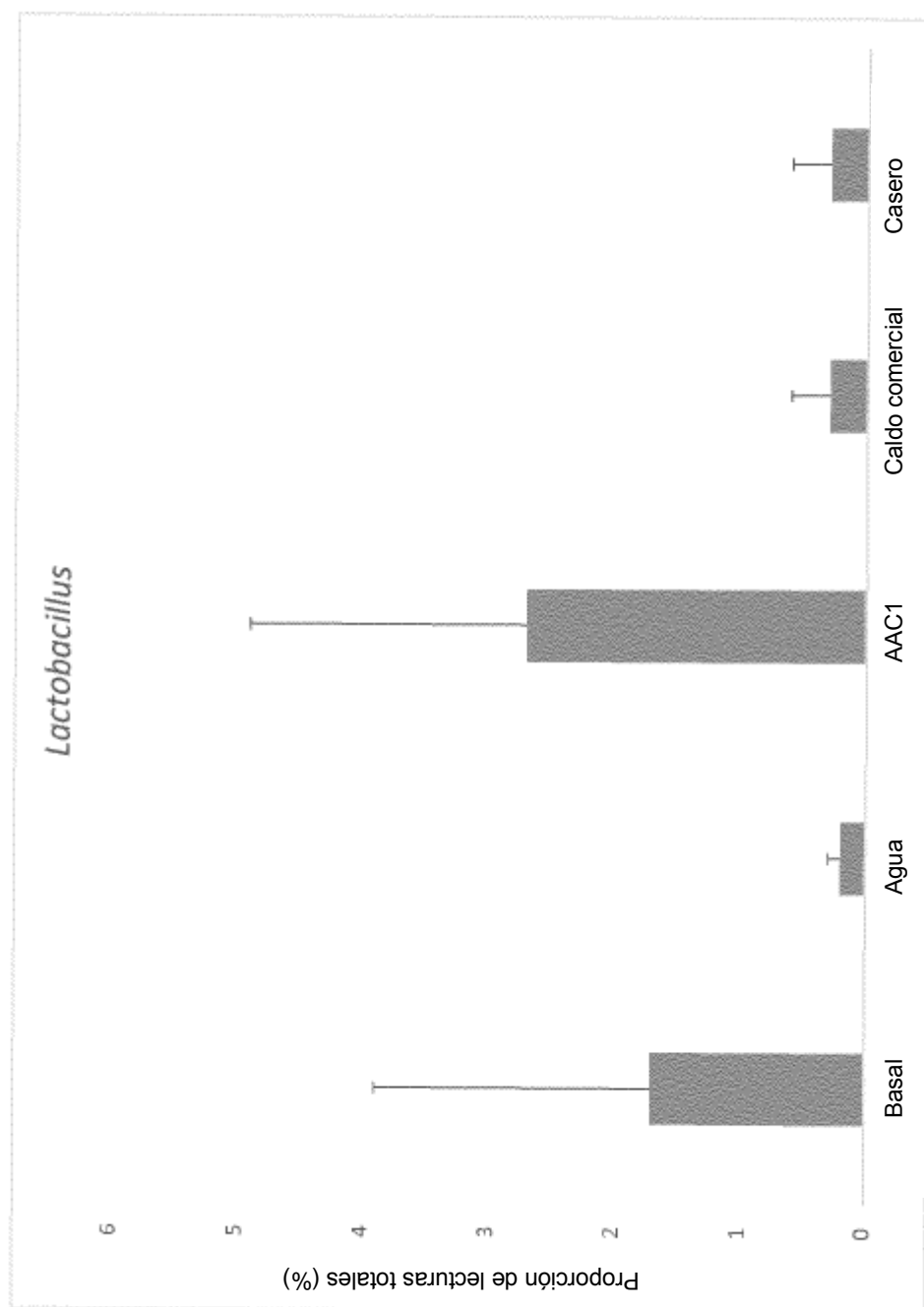


Fig.6

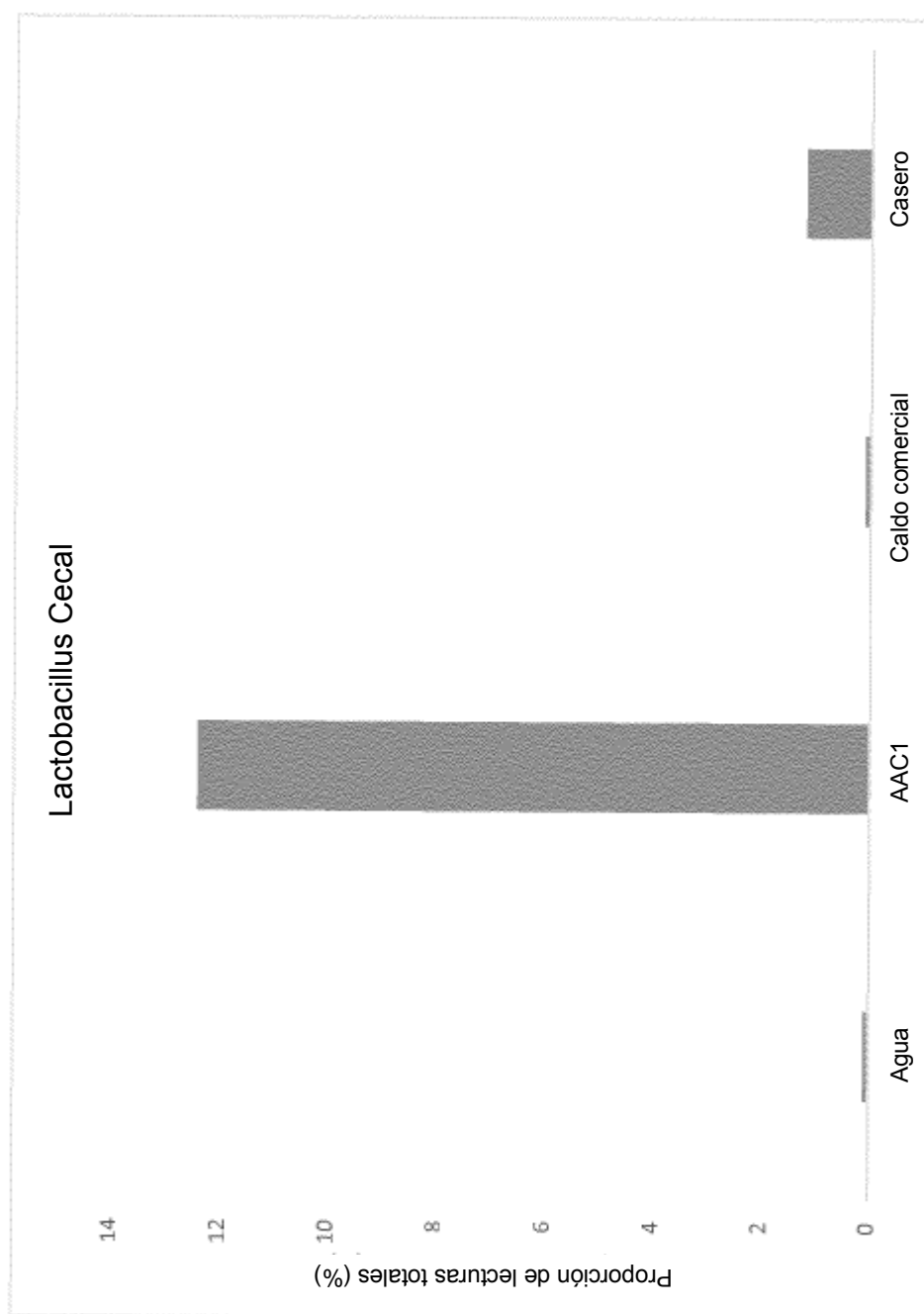


Fig.7

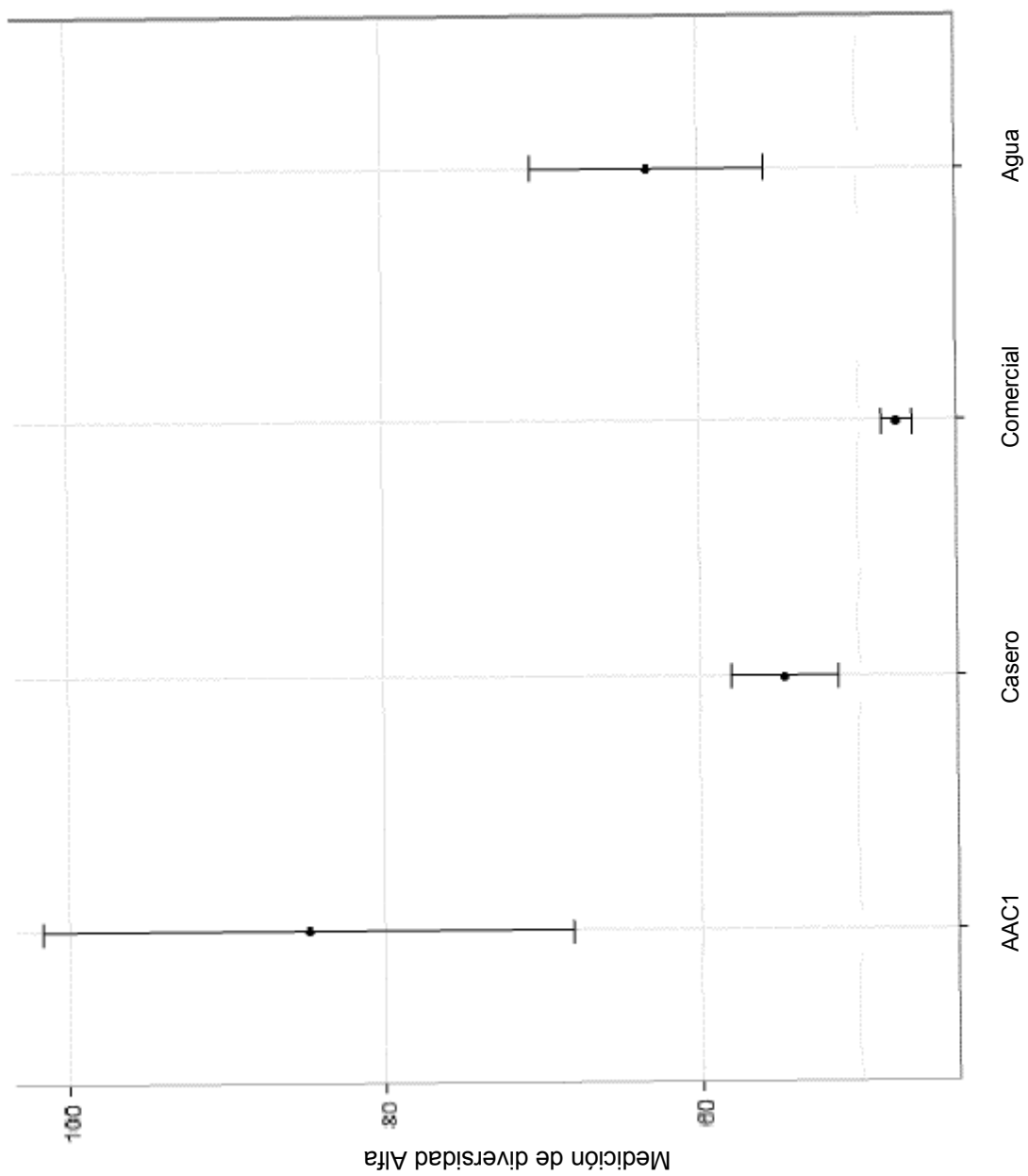


Fig.8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La presente lista de referencias citada por el solicitante se proporciona para comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado a la hora de recopilar las referencias, puede haber errores u omisiones y la EPO renuncia a cualquier responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patente citados en la descripción

- US 2013345139 A1 [0004]
- US 2015011500 A1 [0005]

Literatura no-patente que se cita en la descripción

- **FEDERICA MELI et al.** *Curr. Microbiol.*, 2013, vol. 68, 82-87 [0006]
- **JI et al.** *Journal of AOAC International*, 2007, vol. 90 (3), 659-69 [0032]
- *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, vol. 105 (43), 16731-6 [0041]
- **JI.** *Journal of AOAC International*, 2007 [0061]
- **SLINKARD.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977 [0062]
- **ARUMUGAM, M. et al.** Enterotypes of the human gut microbiota. *Nature*, 2011 [0077]
- **BRAVO, J. A. et al.** Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2011 [0077]
- **LARSEN, N. et al.** Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLOS One*, 2010 [0077]
- **LEY, R. E. et al.** Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2005, 11070-11075 [0077]
- **MARIAT, D. et al.** The Firmicutes/Bacteroides ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 2009 [0077]
- **LEY RE ; TUMBAUGH P ; KLEIN S ; GORDON JI.** Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006, vol. 444, 1022-1023 [0077]