

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 300**

51 Int. Cl.:

A23L 7/10	(2006.01)
A23L 7/104	(2006.01)
A23L 7/117	(2006.01)
A23L 7/20	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)
A61K 36/899	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010 PCT/SE2010/051464**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11078781**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10839902 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2515937**

54 Título: **Composiciones no fermentadas que comprenden una fracción a base de cereal y un probiótico y usos de las mismas**

30 Prioridad:

22.12.2009 SE 0951011

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2020

73 Titular/es:

**PROBI AB (100.0%)
Sölvegatan 41
223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**BRÄNNING, CAMILLA y
NYMAN, MARGARETA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 766 300 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 no fermentadas que comprenden una fracción a base de cereal y un probiótico y usos de las mismas

Campo técnico de la invención

5 La presente divulgación se refiere a una composición no fermentada que tiene la capacidad de aumentar la formación de ácido butírico en el colon, así como a diferentes usos de dicha composición no fermentada, tal como para el mantenimiento de una mucosa intestinal sana proporcionando una función de barrera aumentada.

Antecedentes de la técnica

10 Se ha propuesto que el ácido butírico y la glutamina son importantes para la salud colónica. Se ha demostrado que los β -glucanos puros de la cebada proporcionan cantidades comparativamente elevadas de ácido butírico y se ha informado de que los alimentos de cebada germinada, obtenida del grano usado de cervecería (GUC), que contienen altas cantidades de β -glucanos y glutamina, reducen la respuesta inflamatoria en el colon de sujetos con colitis ulcerosa.

Recientemente ha habido gran interés en la relación entre la fibra dietética, las bacterias promotoras de la salud y la prevención de enfermedades inflamatorias del intestino, que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

15 La fibra dietética es resistente a la digestión en el intestino delgado y por lo tanto, se encuentra disponible para la fermentación por la flora microbiana en el intestino grueso, formando ácidos grasos de cadena corta (AGCC), junto con gases y calor. Los principales AGCC formados son los ácidos acético, propiónico y butírico, mientras que los ácidos valérico, caproico y heptanoico y los ácidos ramificados isobutírico e isovalérico se forman en menores cantidades. Los AGCC se absorben y transportan a través de la vena porta al hígado y la fracción no absorbida se excreta en las heces. El ácido propiónico es un sustrato para la gluconeogénesis hepática y se ha comunicado que inhiere la síntesis de colesterol, mientras que se ha demostrado que el ácido acético estimula la gluconeogénesis y la formación de colesterol por medio de la acetil-CoA. El ácido butírico es la principal fuente de energía para los colonocitos y se ha elaborado la hipótesis de que reduce el riesgo de cáncer de colon y es beneficioso para la EII. Recientemente, también se ha sugerido que el ácido butírico tiene efectos metabólicos.

25 Aparte de la fibra dietética, pequeñas cantidades de proteína también llegarán al colon. En este sentido, la glutamina es un aminoácido de interés especial. La glutamina, junto con el ácido butírico, es un sustrato importante para las células epiteliales del colon. Esto es interesante, debido a que la presencia de altas cantidades de ácido butírico en el colon reducirá la necesidad de glutamina por parte de las células epiteliales y de este modo, aumenta los niveles de glutamina en la sangre. Se ha descubierto que son positivos altos niveles de glutamina en el sistema circulatorio, ya que mejora la defensa inmunitaria.

30 Los alimentos a base de cereales se han usado desde hace mucho tiempo y los granos de cereales contienen las proteínas, grasas y carbohidratos que los seres humanos necesitan para su crecimiento y mantenimiento. La fermentación de la cebada puede producir elevadas cantidades de ácido butírico, debido a su elevado contenido de β -glucanos y se ha demostrado que los productos alimentarios de cebada germinada (ACG) contienen elevadas cantidades de glutamina. Se ha comunicado que la glutamina en los ACG está unida a la fibra dietética y llega al intestino grueso, donde puede liberarse durante la fermentación y ser un sustrato para la mucosa colónica. En estudios en los que se han usado ACG, se mejoraron los síntomas e inflamaciones en ratas con colitis inducida con sulfato sódico de dextrano (DSS). Se observó el mismo efecto en seres humanos con colitis ulcerosa.

35 Las bacterias probióticas se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, afectan de manera beneficiosa al hospedador. Los lactobacillus y las bifidobacterias son las bacterias más frecuentemente usadas en los productos probióticos. Estas bacterias son generalmente seguras, al igual que lo son los probióticos a base de estos organismos. La falta de patogenicidad se extiende a lo largo de todos los grupos de edad y a individuos inmunocomprometidos. Se ha demostrado que la ingesta de diferentes bacterias probióticas tiene beneficios clínicos en diversas situaciones fisiológicas o patológicas. Los efectos más evidentes se han demostrado en la diarrea causada por la terapia con antibióticos o la infección por rotavirus. También hay estudios que muestran efectos clínicos positivos en las enteropatías inflamatorias, la dermatitis atópica y la hipercolesterolemia tras la ingesta de bacterias probióticas. No está claro el mecanismo mediante el cual las bacterias probióticas contribuyen a estas mejoras clínicas. *Lactobacillus rhamnosus* es uno de los mayores grupos de bacterias representados en el intestino de individuos sanos. Las cantidades elevadas de bacterias probióticas pueden obstruir la proliferación de bacterias patógenas. Una combinación de pre y probióticos puede no solo afectar a la microbiota, sino también optimizar la formación de CA.

El documento WO2007036230 desvela un producto listo para usar que comprende cereal fermentado y microorganismos no patógenos, en el que el cereal fermentado es preferentemente harina de avena.

55 El documento WO 2006/088923 se refiere a un producto alimentario que contiene un probiótico y β -glucano aislado de una fuente natural y procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno administrando el producto alimentario.

5 El documento WO 00/33854 se refiere a una preparación que tiene una acción promotora de la salud, en particular, para la prevención y/o el tratamiento de trastornos del tracto digestivo, que contiene uno o más probióticos y uno o más oligosacáridos no digeribles; los probióticos se seleccionan preferentemente entre cepas bacterianas, tales como una cepa de una especie de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* y de cepas de levadura, tales como una cepa de una especie de *Saccharomyces*.

10 El documento US 6241983 B1 se refiere a una composición para promover la salud gastrointestinal que contiene una cantidad eficaz de un microorganismo intestinal humano beneficioso y una cantidad eficaz de fibra dietética, seleccionada preferentemente entre el grupo que consiste en pentosanos, β -glucanos, pectinas y polisacáridos pécticos, mananos, arabinanos y galactanos, fructooligosacáridos y mezclas de los mismos; los microorganismos intestinales humanos beneficiosos preferidos incluyen *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*.

El documento WO 2004/022727 se refiere a una variante de la bacteria *Lactobacillus fermentum* y a su uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, de trastornos de las superficies mucosas o de alteraciones en el sistema inmunitario o del estado de un sujeto.

15 El documento EP 1769801 A1 se refiere a una estrategia de tratamiento para las enteropatías inflamatorias, el síndrome del intestino irritable y otros trastornos gastrointestinales, en la que se usan tanto microorganismos probióticos como el portador de los microorganismos probióticos en forma de una papilla de cereal fermentado como efectores del tratamiento.

Mussatto y col (2006), *Journal of Cereal Science* 43:1-14 se refiere a la generación, las características y las aplicaciones potenciales del grano gastado de cervecera.

20 Topping y Clifton (2001), *Physiological Reviews* 81(3):1031-1064 se refiere a ácidos grasos de cadena corta y a la función colónica humana, papeles del almidón resistente y polisacáridos distintos del almidón.

Di Sabatino y col (2005), *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* se refiere a butirato oral para enfermedad de Crohn de leve a moderadamente activa.

25 Nilsson y col (2007), *European Journal of Clinical Nutrition* 62:978-984 se refiere a la suplementación dietética con salvado de avena enriquecido con β -glucano que aumenta la concentración fecal de ácidos carboxílicos en sujetos sanos.

Existe la necesidad de nuevas estrategias para mantener la mucosa intestinal sana proporcionando una función de barrera aumentada del intestino.

30 El objetivo de la presente divulgación es investigar el papel potencial de unas pocas fracciones a base de cereal, tales como diferentes fracciones de la cebada, como producto prebiótico, en relación con la formación cecal de CA, los niveles de AGCC y aminoácidos en la sangre y la composición cecal de la flora bacteriana (*Lactobacillus*, *bifidobacterias*, *Enterobacteriaceae*), y si la adición de una cepa probiótica podría proporcionar cualquier efecto adicional.

Sumario de la invención

35 La invención es como se describe en las reivindicaciones.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición no fermentada para su uso como medicamento para aumentar la formación de ácido butírico en el colon, comprendiendo dicha composición al menos una fracción a base de cereal seleccionada entre el grupo que consiste en cebada integral, cebada malteada y grano gastado de cervecera y al menos una cepa probiótica aislada de *Lactobacillus rhamnosus*; caracterizada por que el uso aumenta la formación de ácido butírico en el colon, en comparación con el uso de la misma composición sin la al menos una cepa probiótica aislada de *Lactobacillus rhamnosus*.

La presente divulgación también se refiere, en un aspecto, a una composición fermentada que tiene la capacidad de aumentar la formación de ácido butírico en el colon y que comprende al menos una fracción a base de cereal y al menos una cepa probiótica aislada de *Lactobacillus*.

45 La presente divulgación se refiere, en un aspecto adicional, al uso de dicha composición no fermentada como un simbiótico.

La presente divulgación se refiere, en un aspecto adicional más, a dicha composición no fermentada, para su uso en el tratamiento del síndrome metabólico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable (SII) o enteropatía inflamatoria (EII).

50 La presente divulgación se refiere, en un aspecto adicional más, a dicha composición no fermentada, para su uso en el mantenimiento de una mucosa intestinal sana y/o para proporcionar una función de barrera aumentada de la mucosa intestinal.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* (barras blancas), *Bifidobacterium* (barras negras) y *Enterobacteriaceae* (barras jaspeadas) en el contenido cecal de ratas a las que se alimenta con cebada integral (CI), malta (Malta) o gran gastado de cervecería (GGC) y las mismas dietas suplementadas con *L. rhamnosus* (Lr). Los valores son medias y los valores de CI, Malta y GGC, es decir, aquellos sin ningún probiótico añadido, con letras en superíndice disímiles, fueron significativamente diferentes, $P < 0,05$. Los valores medios fueron significativamente diferentes respecto de aquellos para ratas a las que se dieron de comer dietas sin bacterias, $*P < 0,05$

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

La presente divulgación se refiere a una composición fermentada que tiene la capacidad de aumentar la formación de ácido butírico en el colon y que comprende al menos una fracción a base de cereal y al menos una cepa probiótica aislada de *Lactobacillus*. El significado de la frase "que tiene la capacidad de aumentar la formación de ácido butírico en el colon" significa que la presente composición no fermentada que comprende tanto un probiótico como una fracción a base de cereal aumentará la formación de ácido butírico en el colon y en la sangre, véanse las tablas 4 y 5, en comparación con cuando se administra una fracción a base de cereales únicamente sin un probiótico. En la tabla 4, la formación de ácido butírico en el colon ha aumentado un 157 % (de 7 a 18 $\mu\text{mol/g}$) para la cebada integral, un 50 % (de 12 a 18 $\mu\text{mol/g}$) para la cebada malteada y un 33 % (de 9 a 12 $\mu\text{mol/g}$) para el grano gastado de cervecería. Por lo tanto, un aumento de la formación de ácido butírico se encuentra en el intervalo del 30-200 %, preferentemente en el intervalo del 40-180 %, más preferentemente, en el intervalo del 50-160 %. Como alternativa, dicho de otro modo, el contenido de ácido butírico formado en el colon se encuentra en el intervalo de 14 - 20 $\mu\text{mol/g}$ o de $>14 \mu\text{mol/g}$.

En el presente contexto, la frase "composición no fermentada" ha de interpretarse como la composición aún no consumida. Se prevé que la fermentación se produzca en el tracto gastrointestinal después de consumir la composición. Los ácidos orgánicos formados durante la fermentación gastrointestinal se miden en la sangre y los contenidos cecales. En los productos secos de la invención, tales como cereales, muesli, panes, galletas, cereales, barras nutritivas o untables, los ácidos orgánicos no están presentes en la composición debido a la falta de fermentación. En los productos húmedos, las bacterias podrían estar presentes en una forma encapsulada que impida la fermentación de la composición antes de entrar en el tracto gastrointestinal. Otra estrategia para prevenir la fermentación es mantener la composición a una baja temperatura, es decir, mantener la composición refrigerada o congelada a temperaturas y condiciones de almacenamiento adecuadas. Las composiciones no fermentadas de la invención pueden ser una composición seca y una composición fluida.

En la tabla 5, se mide el contenido de ácido butírico formado en la sangre portal. El aumento para la CI es del 133 % (de 46 a 107 $\mu\text{mol/l}$), para la cebada malteada del 117 % (de 96 a 208 $\mu\text{mol/l}$) y para el GGC del 56 % (de 53 a 83 $\mu\text{mol/l}$). Por lo tanto, para las tres fracciones de la cebada, el contenido de ácido butírico es $>80 \mu\text{mol/l}$.

La fracción a base de cereal está presente en la composición no fermentada desvelada en el presente documento en el intervalo del 40-100 % en peso. El contenido restante de la composición desvelada en el presente documento es evidente para un experto en la técnica de formulación de composiciones simbióticas.

Los resultados de la presente invención son muy inesperados y el aumento de la formación de ácido butírico que se ha observado se ha duplicado cuando se administra una composición de acuerdo con la invención en comparación con cuando se administra únicamente la fracción a base de cereal, véanse las tablas 4 y 5.

En una realización de la divulgación, la al menos una fracción a base de cereal de la composición es una fracción de cereal integral, tal como cebada integral, avena integral, trigo integral, centeno integral o una combinación de los mismos. La al menos una fracción a base de cereal usada en la composición de la invención puede haberse procesado de diferentes maneras antes de añadirse a la presente composición, por ejemplo, la fracción a base de cereal podría ser una fracción a base de cereal molida y/o tratada con calor o una fracción a base de cereal extruida, expandida o una fracción a base de cereal secada en tambor o una fracción a base de cereal en copos o una fracción a base de cereal cocida al vapor.

En una realización adicional de la divulgación, la al menos una fracción a base de cereal se selecciona entre el grupo que consiste en una fracción de cebada,

una fracción de avena, una fracción de trigo, una fracción de centeno y cualquier combinación de las mismas. La al menos una fracción a base de cereal puede maltearse adicionalmente y en una realización de la invención, la fracción a base de cereal malteado es malta o grano gastado de cervecería (GGC), que es un subproducto del procedimiento de producción de cerveza. En la primera etapa, cuando se produce la cerveza, se germina la cebada y posteriormente se tuesta. La malta se tritura y se mezcla con agua y la mezcla se calienta. El GGC es el subproducto cuando se filtra la mezcla y el filtrado avanza hasta la siguiente etapa de procesamiento de la cerveza. El GGC normalmente se ha usado como pienso para ganado, pero resultados de estudios anteriores indican que es interesante examinar si el GGC puede usarse como prebiótico en alimentos para humanos.

En una realización de la invención, la fracción a base de cereal se ha molido a fin de que tenga un tamaño adecuado en la composición, en la que el tamaño de al menos una fracción a base de cereal se encuentra en el intervalo de

aproximadamente 0,1 mm a 10 mm, preferentemente de 0,5 mm a 5 mm.

La al menos una cepa aislada de *Lactobacillus* desvelada en el presente documento está presente en una cantidad de 10^6 - 10^{14} UFC/día, preferentemente de 10^8 - 10^{12} UFC/día, más preferentemente, de 10^9 - 10^{11} UFC/día. UFC representa unidades formadoras de colonias y es una unidad bien conocida para un experto en la técnica de los probióticos.

En una realización de la divulgación, la al menos una cepa probiótica aislada se selecciona entre el grupo de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus fermentum*.

La al menos una cepa probiótica aislada es *Lactobacillus rhamnosus* 271 (DSM 6594). En otra divulgación, la al menos una cepa probiótica se selecciona entre el grupo de *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316.

Lactobacillus plantarum 299, DSM 6595 y *Lactobacillus rhamnosus* 271 (DSM 6594) se depositaron el 2 de julio de 1991 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, se depositó el 16 de marzo de 1995 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, fueron depositados el 27 de noviembre de 2002, en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. El al menos un probiótico puede estar presente en la composición en forma de un componente liofilizado, en forma de un probiótico en un aceite, en forma de un probiótico en una solución o suspensión acuosa, en forma de un probiótico secado por pulverización o en forma de probiótico en un estado de grasa sólida.

En una realización de la invención, dicha composición es una formulación líquida o una formulación sólida. Cuando se preparan las composiciones de la invención, ya sea en un estado líquido o sólido, se usarán aditivos convencionales como los usados en el campo técnico y se realizan por una persona experta en el campo técnico.

En otra realización, dicha composición es un alimento médico, un alimento funcional, un suplemento dietético, un producto nutricional, un alimento o un aditivo alimentario.

El aditivo alimentario podría añadirse, por ejemplo, a cereales, muesli, panes, galletas, cereales, barras dietéticas o untables en forma de una composición mixta en polvo. También se desvelan casos en los que se añade cada componente por separado. Un ejemplo de esto último es, por ejemplo, la dispersión de la fracción a base de cereal sobre el producto alimentario relevante, tal como muesli y posteriormente, añadir la cepa probiótica relevante. Los efectos beneficiosos de la invención se obtienen cuando se juntan la fracción a base de cereal y las cepas probióticas. De acuerdo con la presente divulgación, no es necesario que la combinación se administre como una composición. De acuerdo con la presente divulgación, es posible, por ejemplo, mezclar los componentes de manera precisa antes de la ingesta.

En otra realización de la invención, el alimento es una bebida, una bebida, un yogur, un zumo o un helado. Por lo tanto, se realiza que la composición puede tomarse fácilmente en forma de un alimento de manera diaria. Por lo tanto, también se desvelan casos en los que podría mejorarse la salud general de la humanidad mediante el uso de la composición de acuerdo con la invención.

También se desvelan casos en los que la composición de la presente invención se usa como simbiótico. Un simbiótico es un suplemento que contiene tanto un prebiótico como un probiótico que trabajan conjuntamente para mejorar la "flora amiga" del intestino humano.

Además se desvela el uso de una composición, para el tratamiento del síndrome metabólico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable (SII) o enteropatía inflamatoria (EII).

Además se desvela una composición como se define en el presente documento para su uso en el mantenimiento de una mucosa intestinal sana y/o para proporcionar una función de barrera aumentada de la mucosa intestinal.

Sección experimental

Materiales y procedimientos

Composición de materiales de ensayo

La materia prima usada fue cebada integral (Viking Malt AB, Halmstad, Suecia), malta y grano gastado de cervecería (Carlsberg, Falkenberg, Suecia). La cebada integral, la malta y el grano gastado de cervecería provinieron del mismo lote de harina. Las materias primas se molieron antes de incluirse en las dietas hasta un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 1 mm. La cepa bacteriana incluida en el experimento fue *L. rhamnosus* 271 (Probi AB, Lund Suecia) y se suministró en forma liofilizada.

Animales y diseño del experimento

Se prepararon seis dietas de ensayo de acuerdo con la tabla 1: una dieta de referencia que contenía cebada integral (CI) y 5 dietas de ensayo que incluían cebada integral y *L. rhamnosus* 271 (CI+Lr), malta (Malta), malta y *L. rhamnosus* 271 (Malta+Lr), grano gastado de cervecera (GGC) o grano gastado de cervecera y *L. rhamnosus* 271 (GGC+Lr). Las materias primas se añadieron a un nivel de 80 g de fibra dietética/kg de dieta (bps, basándose en peso seco). Se usó almidón de trigo para ajustar el contenido de materia seca y se ha demostrado que este tipo de almidón se digiere completamente y por lo tanto, no forma ningún CA. La cepa probiótica se incluyó a diario en la dieta en el momento de la alimentación para cada rata en una cantidad de 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/d.

La tabla 1 muestra la composición de las dietas de ensayo administradas a las ratas en los siguientes grupos: cebada integral (CI), malta (Malta) o grano gastado de destilería (GGC) con o sin la adición de *L. rhamnosus* (Lr) (tabla 1).

10

Tabla 1

Ingrediente de la dieta ¹	CI	CI+Lr	Malta	Malta+Lr	GGC	GGC+Lr
Cebada integral, ² g	519,5 ³	519,5 ³	0	0	0	0
Malta, ⁴ g	0	0	661,2 ³	661,2 ³	0	0
Grano gastado de cerv., ⁴ g	0	0	0	0	135,8 ³	135,8 ³
Caseína, g	120	120	120	120	120	120
DL-metionina, g	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Aceite de maíz, g	50	50	50	50	50	50
Mezcla de minerales, ⁵ g	48	48	48	48	48	48
Mezcla de vitaminas, ⁶ g	8	8	8	8	8	8
Cloruro de colina, g	2	2	2	2	2	2
Sacarosa, g	100	100	100	100	100	100
Almidón de trigo, ⁷ g	151,3	151,3	9,6	9,6	535,0	535,0

¹Los ingredientes de la dieta suman un total de 1000 g.

²Viking Malt AB (Halmstad, Suecia).

³Correspondiente a 80 g de fibra dietética/kg de dieta (bps).

⁴Carlsberg (Falkenberg, Suecia).

⁵Que contiene (g/kg): 0,37 CuSO₄·5H₂O, 1,4 ZnSO₄·7H₂O, 332,1 KH₂PO₄, 171,8 NaH₂PO₄·2H₂O, 324,4 CaCO₃, 0,068 KI, 57,2 MgSO₄, 7,7 FeSO₄·7H₂O, 3,4 MnSO₄·H₂O, 0,02 CoCl·6H₂O, 101,7 NaCl (Bie & Berntsen A-S, Rødovre, Dinamarca).

⁶Que contiene (g/kg): 0,62 menadiona, 2,5 clorhidrato de tiamina, 2,5 riboflavina, 1,25 clorhidrato de piridoxina, 6,25 pantotenato de calcio, 6,25 ácido nicotínico, 0,25 ácido fólico, 12,5 inositol, 1,25 ácido p-aminobenzoico, 0,05 biotina, 0,00375 cianocobalamina, 0,187 palmitato de retinol, 0,00613 calciferol, 25 acetato de d- α -tocoferilo, 941,25 almidón de maíz (Apoteket, Malmö, Suecia).

⁷Almidón de trigo (Cerestar, Krefeld, Alemania).

15 Se obtuvieron ratas Wistar macho (peso inicial, 134 ± 1 g) de Scanbur (Sollentuna, Suecia). Se dividieron aleatoriamente en seis grupos, siete ratas en cada uno y se alojaron individualmente en jaulas de metabólica, en una habitación mantenida a 22 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. La ingesta de pienso se restringió a 12 g/d (bps) y se proporcionó libre acceso a agua a las ratas. Se dejó que los animales se adaptasen a la dieta durante 7 d y después siguió un periodo experimental de 5 días de longitud, cuando las heces y los restos de pienso se recogieron diariamente. Las muestras fecales se almacenaron a -20 °C y después se liofilizaron y se molieron antes del análisis de la fibra dietética. Al final del experimento, se anestesió a los animales mediante una inyección subcutánea de una mezcla (1:1:2) de Hypnorm (División de Janssen-Cilag Ltd., Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica), Dormicum (F. Hoffman-La Roche AG, Basilea, Suiza) y agua estéril a una dosis de 0,15 ml/100 g y se recogieron sangre y tejido y contenido cecal. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena porta y se muestrearon en dos tubos: uno para plasma que contenía EDTA y uno para suero. Las muestras de plasma y suero se centrifugaron durante 15 min (2500 x g) y después se almacenaron a -40 °C hasta el análisis de los aminoácidos y AGCC. El peso del tejido cecal, del contenido y el pH se midieron directamente. El contenido cecal se dividió en un tubo estéril que contenía medio de congelación y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para el análisis de la microbiota y la otra parte del contenido cecal se congeló y almacenó a -40 °C hasta el análisis de CA, que también se efectuó para las diferentes partes del tracto bajo del intestino.

Análisis

30 *Fibra dietética.* Se usó un procedimiento gravimétrico para determinar la cantidad de fibra dietética soluble e insoluble en las materias primas. La composición del resto de fibra aislada se analizó usando cromatografía de gas-líquido (GLC) de los azúcares neutros en forma de sus acetatos de alditol y se analizó el contenido de ácidos urónicos con un procedimiento espectrofotométrico. Los monómeros de fibra en las heces se caracterizaron directamente sin aislamiento previo de la fibra dietética.

5 *CA en las heces.* Se usó un procedimiento de GLC para analizar los AGCC (ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, caproico y heptanoico) en el contenido intestinal (ciego, colon proximal y distal). Se añadieron solución de dilución (HCl 2,5 M) y ácido 2-etilbutírico (patrón interno, 1 mM) a las muestras antes de la homogeneización. Después, se centrifugaron las muestras antes de su inyección en una columna capilar de sílice fundido.

El ácido succínico y láctico se cuantificaron espectrofotométricamente con kits enzimáticos disponibles comercialmente (n.º de cat 10176281035 y 1112821, respectivamente; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 *AGCC en suero.* Los AGCC en suero se analizaron con un procedimiento de GLC. Se añadieron agua y ácido 2-etilbutírico (patrón interno, 1 mM) junto con ácido clorhídrico a las muestras y después se sumergió una fibra hueca en la solución de suero para extraer el AGCC. Después de la extracción, se descargaron los AGCC de la luz de la fibra y después se inyectaron en una columna capilar de sílice fundido (DB-FFAP 125-3237, J&W Scientific, Agilent Technologies Inc., Folsom, CA, EE. UU.). Para el análisis se usó el programa informático GC ChemStation (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, EE. UU.).

15 *Contenido de aminoácidos en el plasma.* Se añadió ácido sulfosalicílico a las muestras de plasma para purificar los aminoácidos libres precipitando las proteínas de alto peso molecular. Se usó un analizador de aminoácidos (Biochrom 30, Biochrom Ltd, Cambridge, Inglaterra) basado en cromatografía de intercambio iónico para cuantificar la cantidad de aminoácidos. Se usó el paquete informático EZChrom Elite (Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, EE. UU.) para el análisis.

20 *Microbiota intestinal.* Las muestras cecales se descongelaron y tras la homogeneización, se completó un procedimiento de dilución seriada convencional y se dispersaron las diluciones adecuadas sobre placas de agar. Los recuentos viables se obtuvieron de agar de Rogosa (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, R. U.) incubado anaeróticamente a 37 °C durante 72 h (recuentos de *Lactobacillus*), a partir de agar de Wilkins-Chalgren modificado (Oxoid) incubado anaeróticamente a 37 °C durante 72 h (recuentos de bifidobacterias) y a partir de agar de glucosa de bilis roja VRBG (Oxoid) incubado anaeróticamente a 37 °C durante 24 h (recuentos de *Enterobacteriaceae*). Se contó el número de colonias formadas en cada placa y se corrigieron respecto del peso de las muestras originales.

Cálculos y análisis estadísticos

30 Se multiplicó la concentración de cada CA ($\mu\text{mol/g}$) por la cantidad de contenido cecal para obtener los grupos cecales (μmol). Para corregir respecto de las pequeñas cantidades de restos de pienso, se extrapolaron los valores de grupo a la ingesta completa de fibra dietética (4,8 g). La ganancia de peso corporal durante el periodo experimental se calculó por gramo de pienso consumido.

35 Para determinar los efectos de la fibra dietética (Fibra), probióticos (Pro) y sus interacciones (Fibra \times Pro) se usó ANOVA de 2 vías (tablas 3-5 y 7). Se usó ANOVA de una vía para las medias individuales para evaluar el efecto de la fibra dietética o el efecto probiótico usando el procedimiento de Tukey. Cuando se observó que el error en la varianza era heterogéneo, los datos se transformaron mediante transformación de BoxCox antes de la ANOVA. Los valores se presentan como medias \pm EEM y se consideraron significativas las diferencias que dieron como resultado valores de P menores de 0,05. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo con el programa informático estadístico Minitab (Compilación 14).

Resultados

40 *Excreción fecal de la fibra dietética*

45 El contenido de fibra dietética fue similar en la cebada integral y la malta (15,4 y 12,1 g/100 g, bps, respectivamente), mientras que el grano gastado de cervecera contenía 4-5 veces más fibra dietética (58,2 g/100 g, bps). Los principales componentes de los polisacáridos de la fibra dietética fueron glucosa (35-49 %), xilosa (29-35 %) y arabinosa (16-22 %). Los polisacáridos de la fibra dietética en la cebada integral y el grano gastado de cervecera estaban más fermentados en el colon de rata que la malta (tabla 2). Un cincuenta y seis por ciento de la fibra en la malta se excretó en las heces, mientras que un 38 % y un 49 %, respectivamente, de la fibra en la cebada integral y el grano gastado de cervecera se excretó ($P < 0,001$). De los componentes principales, la xilosa se fermentó de manera similar 45 ± 4 %, mientras que la arabinosa y sobre todo la glucosa se fermentaron en diferentes grados ($P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente). Los polímeros que contenían glucosa fueron los más resistentes a la fermentación en la malta (se excretó un 72 % en las heces) y los más fermentados en la cebada integral (se excretó un 36 % en las heces). No pudieron observarse diferencias en el grado de fermentación cuando se añadió Lr a las dietas, siendo una excepción las pequeñas cantidades de ácidos urónicos presentes, que se fermentaban más con Lr en la dieta que solo con la cebada integral ($P = 0,040$).

55

Tabla 2

	CI	CI	CI+Lr	Malta	Malta	Malta+Lr	GGC	GGC	GGC+Lr
	g/100 g	% de la ingesta		g/100 g	% de la ingesta		g/100 g	% de la ingesta	
Ramnosa	tr ¹	tr ¹							
Arabinosa	2,0	33 ^a	35	1,7	40 ^b	37	7,7	36 ^{a,b}	36
Xilosa	3,5	43	41	2,7	49	48	12,1	45	45
Manosa	0,3	19 ^a	18	0,2	34 ^b	33	0,5	37 ^b	40
Galactosa	0,2	66 ^a	72	0,2	68 ^a	67	1,1	51 ^b	54
Glucosa	5,9	36 ^a	35	2,7	72 ^b	68	13,8	57 ^c	58
Ácido urónico	0,3	64	56*	0,3	56	55	1,3	59	60
Polisacáridos de la fibra dietética	12,2	38 ^a	38	7,8	56 ^b	54	36,7	49 ^c	49
Lignina	3,2	nd ²	nd ²	4,3	nd ²	nd ²	21,5	nd ²	nd ²
Total	15,4	nd ²	nd ²	12,1	nd ²	nd ²	58,2	nd ²	nd ²

¹tr = trazas, menos de 0,05 g/100 g.

²nd = no determinado.

Ingesta de comida y ganancia de peso corporal

Las ratas en los diferentes grupos se comieron la mayor parte de la dieta proporcionada (56,6-59,3 g/5d). Además, la ganancia de peso corporal y el contenido cecal, el peso del tejido y el pH fueron bastante similares entre estos grupos (tabla 3). Cuando se añadieron probióticos a las dietas, se pudieron observar algunas diferencias. Hubo una mayor ganancia de peso corporal en las ratas con GGC (P = 0,044) y un mayor contenido y peso del tejido cecal junto con la CI (P=0,019 y P=0,004, respectivamente). Pudo observarse un menor pH cecal con la CI (P=0,011) y con la malta (P=0,032). La capacidad de aglomeración fue mayor en ratas a las que se alimentó con malta en comparación con los otros productos (P<0,001).

Tabla 3

	CI	CI+Lr	Malta	Malta+Lr	GGC	GGC+Lr		Valor de P	
							Fibra	Pro	Fibra × Pro
GPC	0,21	0,25	0,17	0,21	0,18	0,25*	NS	0,006	NS
CC	1,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1*	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,002	NS	NS
PTC	0,56 ± 0,01	0,63 ± 0,01**	0,57 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,011	NS	NS
pH cecal	7,1	6,7*	7,0	6,8*	7,1	7,0	NS	0,001	NS
CA	0,8 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0 ^b	0,9 ± 0,0*	0,8 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,0	<0,001	NS	NS

GPC significa ganancia de peso corporal g/g

CC significa contenido cecal, g

PTC significa peso del tejido cecal, g

CA significa capacidad de aglomeración, g/g de fibra ingerida

¹Los valores son medias ± EEM, n = 7. Malta+Lr, n = 6

²Valores de CI, Malta y GGC, es decir, aquellos sin ningún probiótico añadido, con letras en superíndice disímiles, fueron significativamente diferentes (P<0,05).

³Los valores medios fueron significativamente diferentes respecto de aquellos para ratas a las que se dieron de comer dietas sin bacterias: *P<0,05, **P<0,01.

La formación de CA en el intestino anterior de ratas

Las ratas a las que se alimentó con malta tenían un mayor nivel y reservas de CA que las ratas alimentadas con CI (79 frente a 62 μmol/g, P=0,027 y 173 frente a 116 μmol, P=0,037, respectivamente), mientras que las otras dos fracciones de cebada tenían niveles cecales similares (62-66 μmol/g) y reservas (123-173 μmol) de CA (tabla 4). En general, la cepa probiótica afectó a los niveles cecales de CA más individualmente que las diferentes fracciones de fibra. Sin embargo, solo se observaron diferencias significativas individuales entre las dietas que contenían *L. rhamnosus* y sus dietas correspondientes sin esta cepa probiótica en ratas alimentadas con CI. El principal ácido formado en el ciego de las ratas alimentadas con las seis dietas de ensayo fue el ácido acético (62 ± 3 %), seguido de ácido butírico (15 ± 4 %) y ácido propiónico (14 ± 1 %).

Tabla 4:

	CI	CI+Lr	Malta	Malta+Lr	GGC	GGC+Lr	Valor de P		
							Fibra	Pro	Fibra × Pro
Nivel cecal									
Acético	39 ± 1 ^a	55 ± 7*	49 ± 3 ^b	61 ± 6	41 ± 4 ^{a,b}	51 ± 3	NS	0,001	NS
Propiónico	9 ± 1	13 ± 1*	11 ± 0	13 ± 1	9 ± 1	11 ± 1	0,021	<0,001	NS
Butírico	7 ± 0 ^a	18 ± 5*	12 ± 1 ^b	18 ± 3	9 ± 1 ^{a,b}	12 ± 2	NS	0,001	NS
Láctico	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,1	0,013	NS	NS
Succínico	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	NS	NS	NS
Menor	4 ± 0	6 ± 1*	5 ± 0	5 ± 0	5 ± 0	5 ± 0	NS	0,010	0,026
Total	62 ± 2 ^a	94 ± 13*	79 ± 4 ^b	99 ± 10	66 ± 6 ^{a,b}	80 ± 5	NS	0,001	NS
Grupo total	116 ± 11 ^a	228 ± 41*	173 ± 10 ^b	225 ± 34	123 ± 20 ^{a,b}	141 ± 6	0,009	0,002	NS
Nivel distal									
Acético	37 ± 1	39 ± 3	38 ± 2	46 ± 2*	37 ± 5	29 ± 2	0,004	NS	0,013
Propiónico	8 ± 0	10 ± 1*	10 ± 1	13 ± 1*	8 ± 1	7 ± 0	<0,001	NS	0,015
Butírico	6 ± 0 ^a	8 ± 1	9 ± 1 ^b	10 ± 1	6 ± 1 ^{a,b}	6 ± 0	<0,001	NS	NS
Menor	4 ± 0	4 ± 0	4 ± 0	4 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	0,044	NS	NS
Total	55 ± 1	61 ± 4	62 ± 3	73 ± 4*	55 ± 6	44 ± 3	<0,001	NS	0,016

¹Los valores son medias ± EEM, n = 7. Malta+Lr, n = 6. Distal: Malta+Lr, n = 6; CI, GGC, n = 5.
²Valores de CI, Malta y GGC, es decir, aquellos sin ningún probiótico añadido, con letras en superíndice disímiles, fueron significativamente diferentes (P<0,05).
³Los valores medios fueron significativamente diferentes respecto de aquellos para ratas a las que se dieron de comer dietas sin bacterias: *P<0,05, **P<0,01.
El nivel cecal se proporciona en µmol/g.

El nivel cecal de ácido acético en ratas alimentadas con malta fue mayor que en ratas alimentadas con CI (P=0,035), lo que también se pudo observar con el ácido butírico (P=0,016) y láctico (P=0,024). Además, las ratas a las que se administró GGC tuvieron un mayor nivel de ácido láctico que las del grupo de CI (P=0,003). Los niveles de todos los ácidos, a excepción de los niveles de ácido láctico y succínico, fueron mayores cuando se añadieron probióticos al grupo de CI (P=0,011-0,033).

Los niveles en la parte proximal y distal del colon (datos no mostrados) fueron muy similares a las diferentes dietas de ensayo (46-56 µmol/g y 44-73 µmol/g, respectivamente). En la parte distal del colon, la fracción de fibra tuvo generalmente un mayor impacto en los niveles de CA que *L. rhamnosus*. Sin embargo, solo hubo una diferencia individual entre los materiales de ensayo en lo referente a los niveles de ácido butírico, es decir, las ratas alimentadas con CI tuvieron un menor nivel de ácido butírico que las ratas alimentadas con malta (P=0,025). Los niveles de ácido acético y propiónico y el nivel distal total fueron mayores en ratas alimentadas con malta suplementada con *L. rhamnosus* en comparación con solo malta (P=0,02, P=0,048 y P=0,038, respectivamente). También se observó un nivel de ácido propiónico mayor en ratas a las que se administró CI+Lr que en ratas alimentadas solo con CI (P=0,047).

Nivel de AGCC en la sangre portal

El ácido acético (976-1596 µmol/l), el ácido propiónico (72-195 µmol/l) y el ácido butírico (46-208 µmol/l) fueron los principales ácidos en la sangre portal (tabla 5). Las ratas alimentadas con malta tuvieron mayores niveles de ácido propiónico y ácido butírico en la sangre portal que las ratas alimentadas con CI (P=0,039 y P=0,011, respectivamente) y GGC (P=0,020 y P=0,032, respectivamente). Las ratas a las que se administró Malta+Lr tuvieron un nivel muy elevado de ácido butírico en la sangre portal, en comparación con el grupo de malta. La diferencia en el nivel de ácido butírico no fue significativa, pero muy próxima a serlo (P=0,055). Los ácidos menores (ácidos isobutírico, isovalérico y valérico) se encontraban a mayores niveles en la sangre portal de ratas alimentadas con CI+Lr que en aquellas ratas alimentadas solo con CI (P=0,040).

Tabla 5:

μmol/l	CI	CI+Lr	Malta	Ma+Lr	GGC	GGC+Lr	Valor de P		
							Fibra	Pro	Fibra x Pro
Acético	1193 ± 95	1223 ± 156	1175 ± 94	1596 ± 307	976 ± 35	1185 ± 215	NS	NS	NS
Propiónico	77 ± 10 ^a	131 ± 24	131 ± 18 ^b	195 ± 56	72 ± 7 ^a	102 ± 23	0,028	0,043	NS
Butírico	46 ± 5 ^a	107 ± 27	96 ± 14 ^b	208 ± 84	53 ± 7 ^a	83 ± 22	0,023	0,009	NS
i-Butírico	15 ± 1 ^{a,b}	22 ± 3	21 ± 3 ^b	32 ± 5	13 ± 1 ^a	17 ± 2	0,003	0,006	NS
i-Valérico	16 ± 1	25 ± 3*	21 ± 2	25 ± 3	16 ± 3	19 ± 2	NS	0,016	NS
Valérico	6 ± 1 ^{a,b}	13 ± 3	11 ± 2 ^b	16 ± 4	5 ± 1 ^a	8 ± 2	NS	0,026	NS
Menor	37 ± 2	60 ± 9*	53 ± 6	73 ± 7	35 ± 5	45 ± 6	0,004	0,002	NS
Total	1354 ± 100	1520 ± 186	1454 ± 130	2071 ± 451	1136 ± 45	1414 ± 263	NS	NS	NS

¹Los valores son medias ± EEM, Malta, n = 6; CI, CI+Lr, Malta+Lr, GGC, n = 5; GGC+Lr, n = 4.
²Valores de CI, Malta y GGC, es decir, aquellos sin ningún probiótico añadido, con letras en superíndice disímiles, fueron significativamente diferentes (P<0,05).
³Los valores medios fueron significativamente diferentes respecto de aquellos para ratas a las que se dieron de comer dietas sin bacterias: *P<0,05.

Composición de aminoácidos en productos de la cebada

Las cantidades totales de aminoácidos fueron aproximadamente las mismas en la cebada integral y la malta (9,7 g/100 g y 9,5 g/100 g), mientras que el grano gastado de cervecera contenía considerablemente más (24,3 g/100 g) (tabla 6). El patrón de aminoácidos de los productos de la cebada fue similar a la máxima proporción de ácido glutámico, seguido de prolina, leucina y ácido de asparagina.

5

Tabla 6

	Cebada integral	Malta	Grano gastado de cerv.
Ácido de asparagina, %	6	7	7
Treonina, %	3	4	4
Serina, %	5	4	4
Ácido glutámico, %	23	20	20
Prolina, %	12	11	10
Glisina, %	4	4	4
Alanina, %	4	5	5
Valina, %	5	6	6
Cisteína, %	3	3	2
Metionina, %	2	2	2
Isoleucina, %	4	4	4
Leucina, %	7	7	8
Tirosina, %	3	3	4
Fenilalanina, %	5	5	6
Lisina, %	4	4	4
Histidina, %	2	3	2
Arginina, %	5	5	5
NH ₄ , %	3	3	2
Total, g/100 g	9,7	9,5	24,3
Ingesta total, g/5 d	3,0	3,8	2,0

Distribución de aminoácidos en la sangre porta

Hubo cantidades detectables de 19 aminoácidos en todos los grupos, pero solo se muestran los aminoácidos con diferencias significativas en la tabla 7. Las fracciones de fibra afectaron a los aminoácidos en una medida similar a como lo hizo la cepa probiótica, aunque no afectaron a los mismos aminoácidos.

10

	CI	CI+Lr	Malta	Ma+Lr	GGC	GGC+Lr	Valor de P		
							Fibra	Pro	Fibra × Pro
Serina, %	6,3 ± 0,2	5,9 ± 0,2	6,2 ± 0,2	6,0 ± 0,2	7,0 ± 0,2	6,5 ± 0,3	0,008	NS	NS
Ácido glutámico, %	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,2	3,0 ± 0,3	2,5 ± 0,2	2,9 ± 0,1*	NS	0,037	NS
La glutamina, %	14,0 ± 0,4 ^a	11,8 ± 0,3 ^{**}	11,6 ± 0,3 ^b	11,4 ± 0,6	12 ± 0,7 ^{a,b}	13,0 ± 0,7	0,030	NS	NS
Tirosina, %	1,6 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,0 ^{a,b}	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1 ^b	1,6 ± 0,1*	NS	0,038	NS
Lisina, %	11,3 ± 0,3 ^{a,b}	10,7 ± 0,5	10,4 ± 0,3 ^a	10,5 ± 0,3	11 ± 0,4 ^b	10,9 ± 0,6	NS	NS	NS
Histidina, %	1,9 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1 ^{a,b}	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1 ^b	2,1 ± 0,2	NS	NS	0,024
NH ₄ , %	8,2 ± 0,3 ^a	10,7 ± 0,8*	11,4 ± 0,9 ^b	12,5 ± 0,5	8,1 ± 0,2 ^a	10,1 ± 1,1	0,001	0,004	NS
Total, mmol/l	5,0 ± 0,5	5,6 ± 0,6	4,8 ± 0,5	4,3 ± 0,4	5,5 ± 0,6	5,4 ± 0,7	NS	NS	NS

(continuación)

¹Los valores son medias \pm EEM, n = 7; Malta, Malta+Lr, n = 6; GGC, n = 5.²Valores de CI, Malta y GGC, es decir, aquellos sin ningún probiótico añadido, con letras en superíndice disímiles, fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$).³Los valores medios fueron significativamente diferentes respecto de aquellos para ratas a las que se dieron de comer dietas sin bacterias: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Las ratas a las que se administró CI tuvieron la máxima proporción de glutamina ($P=0,01$ en comparación con el grupo al que se administró malta) y tirosina ($P=0,027$ en comparación con el grupo al que se administró GGC), mientras que la proporción de histidina y NH_4 fue la menor de las tres fracciones ($P=0,01$ en comparación con ratas alimentadas con BSG y $P=0,01$ en comparación con malta y GGC, respectivamente). La proporción de glutamina y tirosina fue mayor en el grupo de GGC+Lr que en el grupo de GGC ($P=0,046$ y $P=0,025$, respectivamente). En general, la proporción portal de seronina fue mayor en ratas alimentadas con GGC que con las otras dietas de ensayo, aunque no se pudieron observar significaciones individuales entre ratas alimentadas con las diferentes fracciones de fibra.

Bacteriología

En general, los recuentos cecales viables de bifidobacterias y *Enterobacteriaceae* se vieron ambos afectados por las fracciones de fibra y los recuentos de bifidobacterias también se vieron afectados por *L. rhamnosus* (Fig. 1). Las ratas alimentadas con malta tuvieron un menor recuento de bifidobacterias que las ratas a las que se administró CI o GGC ($6,3 \pm 0,2$ log UFC/g de contenido cecal frente a la media de $7,0 \pm 0,1$ log UFC/g de contenido cecal, $P < 0,006$) y cuando se añadió *L. rhamnosus* a la dieta con CI, los recuentos de bifidobacterias fueron menores que en las ratas alimentadas solo con CI ($6,3 \pm 0,2$ log UFC/g de contenido cecal frente a $6,9 \pm 0,1$ log UFC/g de contenido cecal, $P=0,021$). Aunque los recuentos viables de *Enterobacteriaceae* en el grupo de malta no fueron significativamente menores a aquellos en el grupo de CI, el valor de p fue muy próximo al nivel de significación ($P=0,059$).

Se ha propuesto que el ácido butírico es importante para la salud colónica, por ejemplo, reduciendo el riesgo de enteropatías inflamatorias y del cáncer de colon. Estos efectos pueden deberse a su función como la principal fuente de energía de las células epiteliales y su papel principal en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Se ha informado que la glutamina es también una fuente de energía principal de las células epiteliales y como tal, es capaz de recuperar y preservar la mucosa intestinal y prevenir la traslocación bacteriana. Se ha informado que los AGC, conocidos por contener altas cantidades de β -glucanos y glutamina, reducen la respuesta inflamatoria epitelial tanto en sujetos con colitis ulcerosa como en ratones con colitis inducida por DSS. Se ha demostrado con anterioridad que los β -glucanos puros de la cebada proporcionan cantidades comparativamente elevadas de ácido butírico en ratas y se ha sugerido que la glutamina en los AGC es un sustrato para la mucosa, ya que se une a la fibra de la cebada. En este experimento, se usaron tres fracciones diferentes de cebada sola o en combinación con una cepa probiótica, *L. rhamnosus* para evaluar el papel potencial del grano gastado de cervecera (GGC) como producto prebiótico, en relación con la formación cecal de CA, los niveles de AGCC y aminoácidos en la sangre y la composición cecal de la flora bacteriana (*Lactobacillus*, bifidobacterias, *Enterobacteriaceae*) en comparación con cebada integral (CI) y malta (Malta) y si la suplementación con *L. rhamnosus* proporcionó cualquier efecto adicional.

La malta proporcionó mayores niveles de ácido butírico en el ciego, la parte distal del colon y la sangre portal de ratas, en comparación con la CI y en la sangre portal, también en comparación con el GGC. El nivel de ácido propiónico también fue mayor en la sangre portal. Se han asociado los niveles circulantes aumentados de ácido tanto butírico como propiónico con efectos metabólicos. Recientemente, se ha sugerido que estos ácidos pueden modular marcadores proinflamatorios y de este modo afectan a parámetros relacionados con trastornos metabólicos. También se ha comunicado que una mayor ingesta de fibra de cebada por la tarde mejora la tolerancia a la glucosa en un desayuno estándar posterior, lo que podría relacionarse con niveles plasmáticos aumentados de AGCC. Podría especularse con que el cambio en la microbiota cecal en ratas alimentadas con malta facilitó el transporte de AGCC a través de la mucosa, en comparación con CI y GGC. La importancia de la composición de la microbiota, a este respecto, se establece adicionalmente por el hecho de que la cepa probiótica, *L. rhamnosus* 271, tuvo una influencia general en el nivel y el patrón de AGCC formados. Por lo tanto, los niveles de ácido butírico tanto en el ciego como en la sangre portal fueron mayores cuando se añadió la cepa a las dietas. Incluso a pesar de que se pudieron observar unas pocas diferencias individuales entre los grupos, especialmente en la sangre, el probiótico añadido tuvo claramente un efecto y aumentó los niveles de AGCC, lo que se demostró por la significación general en las tablas 4 y 5 (Pro). El valor de p de la diferencia en el ácido butírico entre Malta y Malta+Lr fue muy próxima a la significación ($P=0,055$) y puede especularse si ratas adicionales en los grupos o un periodo experimental extendido podría haber ocasionado una diferencia significativa. Se ha mostrado con anterioridad un mayor nivel de AGCC en la sangre cuando se añadieron probióticos a dietas ricas en fibra. Sin embargo, ha de observarse que los niveles especialmente de ácido butírico, pero también de ácido propiónico en el ciego y la sangre portal fueron considerablemente mayores en ratas alimentadas con las fracciones de cebada, en comparación con este experimento anterior en el que se alimentó a las ratas con cáscara de arándanos. El grado aumentado de fermentación también se vio reflejado en el pH por los probióticos y fue menor en aquellos grupos que recibieron *L. rhamnosus* 271. A este respecto, cabe mencionar que a bajo pH, el crecimiento de los patógenos potenciales, tales como clostridios, se reduce y por tanto, parece ser que *L. rhamnosus* 271 puede contrarrestar a la flora patógena.

Las ratas alimentadas con malta tuvieron el mayor nivel de ácido butírico en la parte distal del colon ($P < 0,05$, en comparación con CI). Resulta de gran importancia que las fibras dietéticas sean capaces de alcanzar no solo al colon proximal, sino también a la parte distal, debido a que las enfermedades colónicas, tales como la colitis ulcerosa y el cáncer de colon se producen normalmente en este sitio del colon. Los sujetos con colitis ulcerosa tuvieron niveles fecales aumentados de ácido butírico tras 4 semanas con una dieta con salvado de avena enriquecido con β -glucano y a diferencia de los controles, se mejoraron las molestias iniciales con este tratamiento. Se obtuvieron resultados similares por Kanauchi y colaboradores con productos alimentarios de cebada germinada.

Las reservas y niveles cecales de CA fueron mayores en ratas alimentadas con malta en comparación con CI, lo que indica un alto grado de fermentación de la fibra. Sin embargo, la fibra, incluyendo los polisacáridos de fibra dietética que contienen glucosa, en la malta fue la menos fermentada de las tres fracciones de cebada estudiadas. Una explicación probable podría ser que la fibra en la cebada integral se degrada durante el malteado y no se precipita en etanol durante el análisis de la fibra dietética. Esto significa que la ingesta de fibra dietética para ratas alimentadas con malta, de hecho, fue mayor que con las otras preparaciones de cebada, lo que da lugar a una mayor formación de CA. Los valores en la tabla 2 están basados en un análisis de fibra, es decir, solo se miden los polisacáridos que tienen un mayor grado de polimerización (aproximadamente 20), dando como resultado un grado de fermentación aparente menor. Sin embargo, este no es un problema solo con este procedimiento, sino con todas las metodologías usadas con fibra dietética. La inclusión de los carbohidratos no digeribles con menor grado de polimerización en el cálculo de la fermentación reducirá la excreción fecal en aproximadamente un 36 %. El GGC fue el menos fermentado ($P < 0,05$, en comparación con la CI), probablemente debido a un enriquecimiento de polisacáridos que contienen celulosa, que se sabe que se fermentan escasamente.

El número de recuentos de bifidobacterias fue menor con la malta que con las otras fracciones de la cebada. Aunque las bacterias contadas en este experimento no conforman toda la microbiota, esta puede indicar que la microbiota estaba alterada. Una microbiota cambiada también puede dar como resultado otras vías de fermentación y una formación cambiada de productos de degradación, según se valora por los mayores niveles de ácido butírico en el ciego en la parte distal del colon en ratas alimentadas con malta, en comparación con los otros productos de la cebada.

El contenido total de proteína, medida como aminoácidos, fue aproximadamente tres veces mayor en el grano gastado de cervecera que en la malta y la cebada integral, mientras que la composición de la proteína fue muy similar en las tres fracciones de la cebada. El aporte de proteína de las fracciones de la cebada en las dietas, sin embargo, fue máximo con la malta (tabla 6). No obstante, no hubo diferencias en la cantidad total de aminoácidos en la sangre portal. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en la distribución de los aminoácidos y las ratas alimentadas con CI tuvieron una mayor proporción de glutamina en el plasma que en el grupo alimentado con malta. En este experimento, no se determinó si la cebada integral contenía proteína no digerible, incluyendo glutamina, que pudiera alcanzar el colon para su fermentación. Se ha sugerido que una formación aumentada de ácido butírico puede reducir la necesidad de glutamina, aumentando de este modo los niveles circulantes de glutamina. La malta, que proporciona altas cantidades de ácido butírico, no mostró mayores niveles de glutamina en plasma de ratas que las otras fracciones de la cebada, lo que indica que la glutamina no alcanza al colon en gran medida y por lo tanto, no se absorbe ahí. De hecho, se ha demostrado que las cáscaras de arándano en una dieta que contiene caseína como fuente de proteína proporcionan niveles plasmáticos de glutamina similares a los de este experimento, usando el mismo modelo animal (datos no publicados). Esto puede implicar que ninguna de las fracciones de cebada usadas en este experimento aumentó los niveles plasmáticos de glutamina más que de caseína. Los efectos beneficiosos de GFB en hombres con colitis ulcerosa y en ratas con colitis inducida por DSS se han adscrito parcialmente a la glutamina.

Hay ciertas dificultades cuando se analiza la glutamina en los materiales de ensayo. Durante la hidrólisis ácida, la glutamina se convierte en ácido glutámico y por lo tanto, la cantidad de ácido glutámico también incluye la cantidad de glutamina. Sin embargo, solo se pueden encontrar trazas de ácido glutámico en los productos alimentarios de cebada germinada y por consiguiente, la mayor parte de las cantidades medidas han de ser de glutamina. Además, se ha comunicado que la glutamina en la cebada está unida a la fibra dietética, alcanzando el colon y después de la fermentación de la fibra siendo un sustrato para la mucosa colónica. Sin embargo, se sabe que la glutamina es un aminoácido muy frágil y la mayor parte de la glutamina no unida a la fibra dietética se degrada por el ácido gástrico. El grupo de malta tuvo menores niveles plasmáticos de glutamina y se podría especular si esto estaba conectado en algún modo con el procedimiento de malteado. Como se ha analizado anteriormente, parece ser que la fibra dietética se degradó durante el malteado, lo que puede dar como resultado menores cantidades de glutamina unida.

El nivel plasmático de amoníaco en el grupo de malta fue mayor que en ratas alimentadas con CI y GGC. El origen del amoníaco en la vena porta es complejo, pero cierta cantidad surge del metabolismo de la glutamina. Este puede ser otro motivo para la menor proporción de glutamina en el grupo de malta. Estudios anteriores en seres humanos demostraron que el número aumentado de bifidobacterias fecales estaba asociado con un nivel reducido de amoníaco en las heces y la sangre. Se sabe que *Bifidobacterium* spp. usan amoníaco como fuente de nitrógeno para su crecimiento. Las ratas alimentadas con malta tuvieron un menor recuento viable de bifidobacterias cecales, lo que indica que esto podría explicar la mayor proporción de amoníaco, encontrado en la sangre portal. Se ha demostrado que el amoníaco es tóxico para las células y que altera la síntesis de ADN y por tanto, se ha propuesto que es un promotor de la carcinogénesis en seres humanos. Una forma de reducir el nivel de amoníaco en ratas alimentadas con malta puede ser añadir bifidobacterias. La *L. rhamnosus* usada en este experimento no redujo, sino que aumentó el nivel de amoníaco en la sangre.

5 En conclusión, en los experimentos llevados a cabo de acuerdo con la presente invención, la cebada en forma de
cebada integral, grano gastado de cervecería o cebada malteada en combinación con una cepa probiótica dio lugar a
un aumento considerable en la formación de ácido butírico en el colon, véase la tabla 4 y la sangre, véase la tabla 5,
en comparación con la situación cuando se administraron solas las fracciones de cebada. Como puede observarse en
la tabla 5, el aumento es más del doble para CI y malta y prácticamente del doble para GGC en sangre. El interés
comercial de una composición que comprende estos componentes se realiza en vista de los diversos efectos
beneficiosos conectados con el ácido butírico. Por lo tanto, la formación de CA, no solo de ácido butírico, aumentó
cuando se añadió la cepa probiótica *L. rhamnosus* a las fracciones de la cebada, aunque la mayoría de efectos se
10 mostraron junto con la CI, por ejemplo, niveles aumentados de ácido butírico en el ciego y la sangre portal. En vista
de las similitudes de los cereales cebada, avena y centeno, se espera que se obtengan los mismos resultados también
con los otros cereales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición no fermentada para su uso como medicamento para aumentar la formación de ácido butírico en el colon, comprendiendo dicha composición al menos una fracción a base de cereal seleccionada entre el grupo que consiste en cebada integral, cebada malteada y grano gastado de cervecería y al menos una cepa probiótica aislada de *Lactobacillus rhamnosus*;
caracterizada porque el uso aumenta la formación de ácido butírico en el colon, en comparación con el uso de la misma composición sin la al menos una cepa probiótica aislada de *Lactobacillus rhamnosus*.
- 10 2. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la al menos una fracción a base de cereal es una fracción a base de cereal molida y/o tratada con calor, una fracción a base de cereal extruida, expandida, una fracción a base de cereal secada en tambor, una fracción a base de cereal en copos o una fracción a base de cereal cocida al vapor.
3. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la al menos una fracción a base de cereal está adicionalmente malteada.
- 15 4. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la al menos una cepa probiótica aislada es *Lactobacillus rhamnosus* 271, DSM 6594.
5. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición es un alimento médico, un alimento funcional, un suplemento dietético, un producto nutricional, un alimento o un aditivo alimentario.
- 20 6. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el aditivo alimentario se añade a cereales, muesli, panes, galletas, barras dietéticas o untables.
7. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el alimento es una bebida, una bebida refrescante, un yogur, un zumo o un helado.
- 25 8. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el uso es en el tratamiento del síndrome metabólico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable (SII) o enteropatía inflamatoria (EII).
9. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el uso es como un simbiótico en el mantenimiento de una mucosa intestinal sana y/o para proporcionar una función de barrera aumentada de la mucosa intestinal.
- 30 10. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que al menos un 40 % en peso de la composición es una fracción a base de cereal.
11. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que al menos un 51,95 % en peso de la composición es una fracción a base de cereal y en la que la al menos una cepa probiótica aislada es *Lactobacillus rhamnosus* 271, DSM 6594.
- 35 12. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que al menos un 66,12 % en peso de la composición es una fracción a base de cereal y en la que la al menos una cepa probiótica aislada es *Lactobacillus rhamnosus* 271, DSM 6594.
- 40 13. Una composición no fermentada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que la composición consiste en al menos una fracción a base de cereal y la al menos una cepa probiótica aislada de *Lactobacillus rhamnosus*.

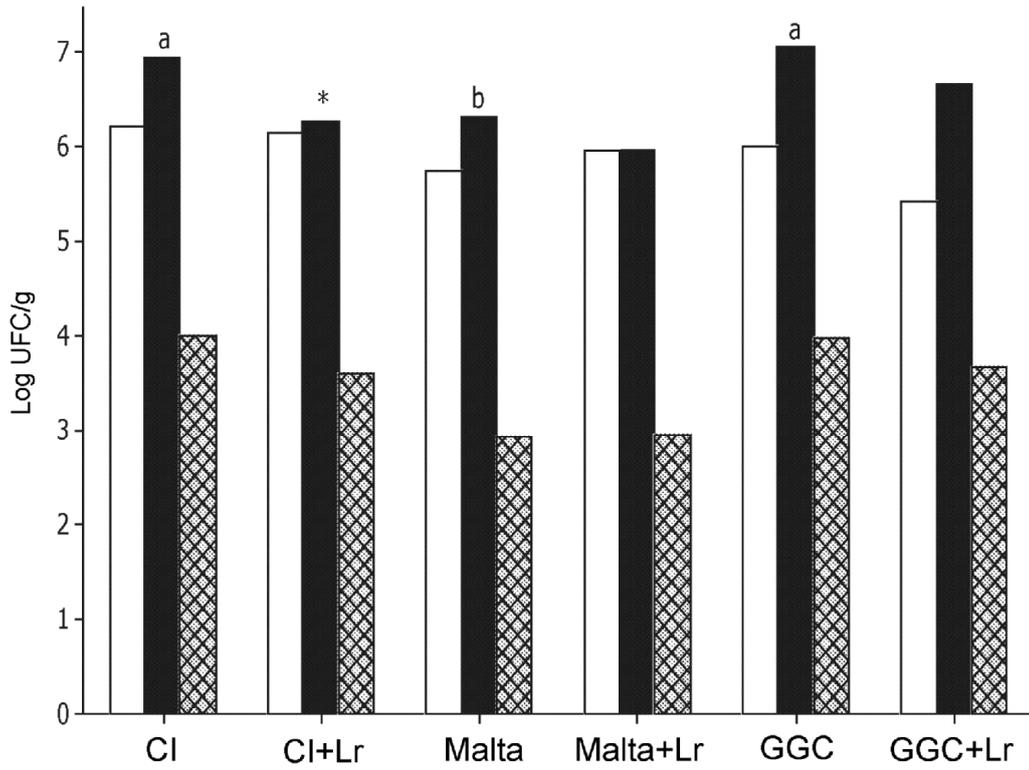


Figura 1.