

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 424**

51 Int. Cl.:

C12R 1/145 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2015** **PCT/EP2015/081148**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017** **WO17108126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015** **E 15820528 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** **EP 3394294**

54 Título: **Composiciones para aumentar o mantener las poblaciones de *Faecalibacterium prausnitzii***

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2021

73 Titular/es:

COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR

72 Inventor/es:

DERRIEN, MURIEL;
LEBAS, MATHILDE y
GARAULT, PEGGY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 806 424 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 para aumentar o mantener las poblaciones de *Faecalibacterium prausnitzii*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere la utilización no terapéutica de *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862 o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM I-1631 para aumentar o mantener las poblaciones de *Faecalibacterium prausnitzii*

Antecedentes de la técnica

10 La *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) es la bacteria más abundante en el intestino humano de adultos sanos, que representa más del 5 % de la población bacteriana total. En los últimos años, un número creciente de estudios ha descrito la importancia de esta bacteria comensal metabólicamente activa como un componente de la microbiota humana sana. Los principales productos finales de la fermentación de la glucosa por cepas de *F. prausnitzii* son formiato, pequeñas cantidades de D-lactato y cantidades sustanciales de butirato. En efecto, la *F. prausnitzii* es una de las bacterias productoras de butirato más abundantes en el tracto gastrointestinal. El butirato desempeña un papel importante en la fisiología intestinal y tiene efectos pleiotrópicos en el ciclo de vida de las células intestinales. Los cambios en la abundancia de *F. prausnitzii* han sido relacionados con la disbiosis en varios trastornos humanos.

15 A este respecto, la publicación internacional WO 2014/070014 informa que la administración oral de riboflavina, esto es vitamina B2, es capaz de aumentar la concentración absoluta y relativa de *F. prausnitzii*, así como de mejorar la producción de butirato, en voluntarios humanos.

20 Sin embargo, la vitamina B2 es muy sensible a la luz, al calor y al oxígeno, lo que limita los procedimientos de producción de alimentos en los que se puede utilizar. Además, no todos los productos alimenticios pueden ser complementados con una vitamina. La publicación WO2014/137211 describe qué cepas de *F. prausnitzii* pueden tener efectos antiinflamatorios y qué bacterias probióticas pueden ayudar a proteger a *F. prausnitzii* frente al oxígeno.

Por consiguiente, todavía existe la necesidad de alternativas a la riboflavina para aumentar o mantener las poblaciones de *F. prausnitzii*.

Sumario de la invención

25 La presente invención se deriva del hallazgo inesperado de que un cultivo de *Streptococcus thermophilus* o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, como se define en las reivindicaciones, puede ser utilizado para aumentar el crecimiento de *Faecalibacterium prausnitzii* o la producción de butirato por esta bacteria.

30 En consecuencia, la presente invención se refiere a la utilización no terapéutica de *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862 o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNM I-1631 para aumentar o mantener una población de *Faecalibacterium prausnitzii*, en particular una población intestinal de *Faecalibacterium prausnitzii* en un individuo, y/o para aumentar o mantener la producción de butirato, en particular la producción de butirato intestinal en un individuo.

La presente invención se refiere también a una cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en el CNCM con el número de referencia CNCM I-3862.

35 La presente invención se refiere también a un producto lácteo fermentado que comprende una cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en el CNCM con el número de referencia CNCM I-3862.

Descripción detallada de la invención

40 Como se usa en la presente memoria, el término "sobrenadante" se entenderá como el medio de cultivo en el que se han cultivado las bacterias en condiciones adecuadas para su crecimiento. Los medios de cultivo se pueden separar de las células bacterianas y fragmentos de las mismas por medios de centrifugación.

Como se usa en la presente memoria, el término "composición estable" se entenderá como una composición que no presenta sedimentación y/o separación de suero.

Como se usa en la presente memoria, el término "x % (p/p)" es equivalente a "x g por 100 g".

45 Como se usa en la presente memoria, el término "leche fermentada" se entenderá como un producto o composición derivados de la leche por la acción acidificante de al menos una bacteria de ácido láctico.

Como se usa en la presente memoria, el término "extraíble con una cuchara" se entenderá como un sólido o semisólido que se puede consumir con una cuchara u otro utensilio.

Como se propone en la presente memoria, un producto lácteo fermentado es el producto de fermentación de una composición a base de leche mediante un cultivo iniciador de microorganismos de fermentación, en particular

bacterias, más particularmente bacterias de ácido láctico. El producto lácteo fermentado según la invención puede ser, por tanto, una leche fermentada, un yogur, en particular un conjunto, yogur batido o para beber, o un queso fresco tal como un queso blanco o un petit-Suisse. También puede ser un producto lácteo fermentado colado, tal como un yogur colado, también llamado yogur concentrado o yogur estilo griego.

- 5 Los términos "leche fermentada" y "yogur" tienen sus significados usuales en el campo de la industria láctea, es decir, productos destinados al consumo humano y que se originan a partir de la fermentación láctica acidificante de un sustrato de leche. Estos productos pueden contener ingredientes secundarios tales como frutas, vegetales, azúcar, etc.

- 10 La expresión "leche fermentada" se reserva por tanto en la presente solicitud para un producto lácteo preparado con un sustrato de leche que ha sido sometido a un tratamiento al menos equivalente a la pasteurización, sembrado con microorganismos pertenecientes a las especies características o especies de cada producto.

- 15 El término "yogur" se reserva para la leche fermentada obtenida, según el uso local y constante, mediante el desarrollo de bacterias lácticas termófilas específicas conocidas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que deben estar en estado vivo en el producto terminado, en una tasa mínima. En ciertos países, las regulaciones requieren la adición de otras bacterias lácticas para la producción de yogur, y especialmente la utilización adicional de cepas de *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus casei*. Estas cepas lácticas adicionales se pretende que impartan diferentes propiedades al producto terminado, tales como la de favorecer el equilibrio de la flora intestinal o la de modular el sistema inmune.

- 20 En la práctica, la expresión "leche fermentada" se utiliza generalmente por tanto para designar leches fermentadas que no sean yogures. También, según el país, puede ser conocida por nombres tan diversos como, por ejemplo, "Kefir", "Kumtss", "Lassi", "Dahi", "Leben", "Filmjolk", "Villi", "Leche Acidophilus"

Finalmente, el nombre "queso blanco" o "petit-Suisse", en la presente solicitud, se reserva para queso sin sal, sin refinar, que ha sido fermentado solamente por bacterias de ácido láctico (y sin otra fermentación aparte de la fermentación láctica).

- 25 El producto lácteo fermentado puede ser hecho a partir de leche entera y/o de leche total o parcialmente desnatada, que se puede usar en forma de polvo que puede ser reconstituido mediante la adición de agua. Se pueden añadir otros componentes de la leche tales como crema, caseína, caseinato (por ejemplo, caseinato de calcio o de sodio), proteínas de suero de leche en particular en forma de concentrado (WPC), proteínas de leche en particular en forma de concentrado (MPC), hidrolizados de proteínas de leche y mezclas de los mismos. La leche y los componentes de la leche tienen típicamente un origen animal tal como procedentes de vaca, cabra, oveja, búfala, burra o camella.

- 30 Como se propone en la presente memoria, una "bacteria de ácido láctico" es una bacteria Gram-positiva, tolerante a los ácidos, generalmente sin esporulación ni respiración, en forma de bastones o de cocos, que es capaz de fermentar azúcares en ácido láctico.

- 35 Preferiblemente, dicha al menos una bacteria de ácido láctico según la invención es *Streptococcus thermophilus* o *Lactococcus* como se define en la reivindicación 1.

La bacteria de ácido láctico es *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862.

La cepa *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862 ha sido depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) (Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, París, Francia) en virtud del Tratado de Budapest, el 31 de octubre de 2007 con el número de referencia CNCM I-3862.

- 40 La bacteria de ácido láctico es *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM I-1631. La cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM I-1631 ha sido depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) (Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, París, Francia) en virtud del Tratado de Budapest, el 24 de octubre de 1995 con el número de referencia CNCM I-1631.

- 45 Como se propone en la presente memoria "aumentar o mantener" una población de *Faecalibacterium prausnitzii*, en particular una población intestinal de la misma, significa proteger, favorecer o estimular el crecimiento de bacterias *Faecalibacterium prausnitzii* para que el recuento de bacterias *Faecalibacterium prausnitzii*, o el número relativo de bacterias *Faecalibacterium prausnitzii* con respecto a otras bacterias, se mantenga o aumente.

Como se propone en la presente memoria, una población intestinal de *Faecalibacterium prausnitzii* se refiere a las bacterias *Faecalibacterium prausnitzii* presentes en el intestino, en particular en el colon, de un individuo.

- 50 La determinación de la cantidad de bacterias *Faecalibacterium prausnitzii* en una muestra se puede realizar por numerosos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. La determinación de la cantidad intestinal de bacterias *Faecalibacterium prausnitzii* en un individuo se puede realizar cultivando muestras de heces del individuo.

Como se propone en la presente memoria, el butirato incluye tanto sus formas ácidas como básicas, es decir, ácido butírico y butirato en sentido estricto. El butirato se denomina también butanoato y tiene la fórmula $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-COO}^-$.

5 Como se propone en la presente memoria "aumentar o mantener" la producción de butirato, en particular la producción intestinal del mismo, significa proteger, favorecer o estimular la producción de butirato para que se mantenga o aumente. Preferiblemente, dentro del marco de la presente invención, el butirato es producido por las bacterias *Faecalibacterium prausnitzii*, en particular en el intestino de un individuo.

10 Preferiblemente, el individuo según la invención es un individuo humano. En una realización, el individuo según la invención es un individuo sano o un individuo que no padece enfermedades intestinales ni enfermedades del tracto gastrointestinal.

Como se propone en la presente memoria "no terapéutico" significa que el individuo que recibe o consume la composición según la invención no es tratado de ninguna enfermedad por la composición. En otras palabras, dentro del marco de los usos y métodos no terapéuticos según la invención, la composición según la invención no es ni un medicamento ni una composición farmacéutica.

15 Métodos para la preparación de productos lácteos fermentados.

Los métodos para la preparación de productos lácteos fermentados, tales como yogures o equivalentes de los mismos, son bien conocidos en la técnica.

20 Preferiblemente, los productos lácteos fermentados se preparan utilizando leche que ha sido sometida a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización. Preferiblemente dicho tratamiento térmico se lleva a cabo antes de la preparación de la composición.

Típicamente, la leche se pasteuriza por medio de las siguientes etapas sucesivas:

- 1) estandarización de las sustancias grasas de la materia prima para obtener una sustancia estandarizada,
- 2) enriquecimiento con materia seca de la sustancia estandarizada obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia enriquecida,
- 25 3) precalentamiento de la sustancia enriquecida obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia de partida,
- 4) pasteurización y retención de la sustancia de partida obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia pasteurizada y retenida,
- 5) una etapa opcional de homogeneización de la sustancia pasteurizada y retenida obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogeneizada,
- 30 6) enfriamiento inicial de la sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogeneizada obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia de partida pasteurizada que haya sido retenida, opcionalmente homogeneizada, y enfriada.

35 Como se usa en la presente memoria, "estandarización de sustancias grasas" se entiende como una etapa de llevar la cantidad de grasas presentes en la sustancia de partida hasta un nivel predeterminado. El enriquecimiento con materia seca implica la adición de proteínas y sustancias grasas para modificar la firmeza de la cuajada.

Como se usa en la presente memoria, "retención" se entiende como una termalización rápida de la leche y hace posible destruir la flora microbiana vegetativa, incluidas las formas patógenas. Su duración típica es de 4 a 10 minutos, en particular de 5 a 8 minutos, y en particular aproximadamente 6 minutos.

40 Como se usa en la presente memoria, "homogeneización" se entiende como la dispersión de las sustancias grasas en la sustancia de tipo leche en pequeños glóbulos de grasa. La homogeneización se lleva a cabo, por ejemplo, a una presión de 100 a 280 bares, en particular de 100 a 250 bares, en particular de 100 a 200 bares, en particular de aproximadamente 200 bares. Esta etapa de homogeneización es puramente opcional. Está particularmente ausente del procedimiento de producción de productos con 0 % de sustancias grasas.

45 Típicamente, un producto lácteo fermentado se prepara por el cultivo de leches a una temperatura adecuada con microorganismos adecuados para proporcionar una reducción en el pH, preferiblemente a un pH igual o inferior a 5, preferiblemente entre aproximadamente 3 y 4,5; más preferiblemente entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5. El pH se puede ajustar controlando la fermentación por el microorganismo y parándola cuando sea apropiado, por ejemplo mediante enfriamiento.

50 La selección de las cepas adecuadas de bacterias de ácido láctico está dentro del alcance de los expertos y es típicamente una bacteria de ácido láctico termófila. Los ejemplos de bacterias de ácido láctico que se pueden usar incluyen pero no se limitan a *Lactobacilli* (por ejemplo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus*

delbrueckii, en particular *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johsonii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*); *Streptococci* (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*); *Lactococci* (por ejemplo, *Lactococcus lactis*, típicamente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Típicamente, se puede usar una mezcla o asociación de una pluralidad de especies de bacterias de ácido láctico, típicamente una mezcla o asociación de *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Para la preparación de yogur, esto típicamente incluye *Lactobacillus bulgaricus* (también conocido como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus*, opcionalmente con microorganismos adicionales tales como, pero sin limitarse a ellos, especies probióticas u otras especies que pueden proporcionar cualidades organolépticas u otras cualidades deseables para la composición, p. ej. *Lactococcus lactis*. Es particularmente preferible que las bacterias de ácido láctico se seleccionen del grupo que consiste en CNCM I-1631 y CNCM I-3862.

Las temperaturas adecuadas para la fermentación de la leche son típicamente de aproximadamente 36 °C a aproximadamente 44 °C y la temperatura se mantiene durante un tiempo de incubación suficiente para proporcionar la reducción deseada de pH.

Para la preparación de un producto lácteo fermentado, la temperatura al comienzo de la fermentación es típicamente de aproximadamente 36 °C a aproximadamente 43 °C, en particular de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 40 °C, la temperatura al final de la fermentación es típicamente de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 44 °C, en particular de aproximadamente 38 °C a aproximadamente 41 °C. El tiempo de fermentación es típicamente de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas.

Después de la fermentación, la leche fermentada se enfría. Opcionalmente, se puede realizar una etapa intermedia de enfriamiento de la leche fermentada para proporcionar una leche fermentada pre-enfriada que tenga una temperatura entre aproximadamente 22 °C y aproximadamente 4 °C. Típicamente, el tiempo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, en particular de aproximadamente 1 hora 30 minutos a aproximadamente 2 horas. La leche fermentada pre-enfriada se conserva típicamente durante un máximo de 40 horas o menos.

Preferiblemente, se realiza una etapa de enfriamiento final de la leche fermentada de tal manera que la temperatura al comienzo del enfriamiento final es inferior a aproximadamente 22 °C y la temperatura al final del enfriamiento final es de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C. El producto enfriado se puede almacenar entonces, transportar y/o distribuir a una temperatura de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C durante al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos aproximadamente 90 días.

El procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado como se ha definido antes, comprende opcionalmente una etapa de agitación a una presión de al menos 20 bares, o de realización de un suavizado dinámico, para obtener una composición que tiene la viscosidad deseada, típicamente una viscosidad de hasta 20 mPa.s. Las operaciones de agitación o de suavizado dinámico proporcionan cierto cizallamiento a la composición que típicamente permite una caída de la viscosidad. Tales operaciones son conocidas por los expertos en la técnica, y pueden ser llevadas a cabo con equipo convencional apropiado. Esta etapa se realiza típicamente a temperatura fría, por ejemplo a una temperatura desde 1 °C hasta 20 °C. Sin proponer limitarse a ninguna teoría, se cree que la aplicación de algo de cizallamiento a temperatura fría, típicamente agitando a alta presión o realizando un suavizado dinámico, puede llevar a la formación de un gel fluido dentro de la composición, lo que proporciona una mejor estabilidad incluso a una baja viscosidad de hasta 20 mPa.s.

El procedimiento para la preparación de un producto lácteo fermentado como se ha definido antes comprende opcionalmente una etapa de adición de una preparación intermedia antes o después de la fermentación, y dicha preparación intermedia comprende una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos tales como aromatizantes y/o colorantes.

La presente invención también da a conocer una cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en el CNCM con el número de referencia I-3862. La presente invención también da a conocer un producto lácteo fermentado que comprende una cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en el CNCM con el número de referencia I-3862.

Descripción de las figuras.

Figura 1

La Figura 1 representa la densidad óptica (OD) a 600 nm (eje vertical) de un cultivo de *Faecalibacterium prausnitzii* sin adición (barra negra, control) o con la adición de un sobrenadante de cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (barra punteada) o de *Streptococcus thermophilus* (barra rayada), después de un tiempo de cultivo de 40 horas y 65 horas (eje horizontal).

Figura 2

La Figura 2 representa la concentración de butirato (en mmol/L, eje vertical) de un cultivo de *Faecalibacterium prausnitzii* sin adición (barra negra, control) o con la adición de un sobrenadante de cultivo de *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* (barra punteada) o de *Streptococcus thermophilus* (barra rayada), después de un tiempo de cultivo de 40 horas (eje horizontal).

Ejemplo

Materiales y métodos

5 Producción de cepas bacterianas, medios y sobrenadantes

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se listan en la tabla 1. La pureza de todas las cepas se evaluó regularmente por observación microscópica después de tinción celular. La *Faecalibacterium prausnitzii* se adquirió de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (DSM 17677). Se cultivaron todas en caldo infusión cerebro-corazón (Becton Dickinson) complementado con extracto de levadura al 0,5 % (Becton Dickinson) y 5 mg/L de cloruro de hemina (Calbiochem), complementado con celobiosa (1 g/L; Sigma-Aldrich), maltosa (1 g/L; Sigma-Aldrich) y cisteína (0,5 g/L; Sigma-Aldrich) en una cámara anaeróbica, con la siguiente mezcla de gases, 80 % N₂ - 10 % CO₂-10 % H₂. Cuando creció el cultivo, se añadió solución de glicerol (16 g/L; Sigma-Aldrich). Se prepararon partes alícuotas de 2 mL y se mantuvieron a -20 °C. Para cada experimento, se utilizó una nueva alícuota. Para los ensayos de interacción de probióticos con *Faecalibacterium prausnitzii*, se cultivaron todas las cepas en medio YCFA (pH 6) que se optimizó para permitir el crecimiento de todas las cepas bacterianas (tabla 2). Este medio consistía en glucosa (20 g/L, Sigma-Aldrich), triptona (10 g/L, Becton Dickinson), extracto de levadura (5 g/L, Becton Dickinson), acetato de sodio (5 g/L, Sigma-Aldrich), lactosa monohidrato (5 g/L, Sigma-Aldrich), bicarbonato de sodio (4 g/L, Sigma-Aldrich), celobiosa (2 g/L, Sigma-Aldrich), cloruro de sodio (0,9 g/L, Sigma-Aldrich), sulfato de amonio (0,9 g/L, Sigma-Aldrich), cisteína (0,5 g/L, Sigma-Aldrich), fosfato de potasio dibásico (0,45 g/L, Sigma-Aldrich), sulfato de magnesio (0,09 g/L, Sigma-Aldrich), cloruro de calcio (0,09 g/L, Sigma-Aldrich), cloruro de hemina (0,01 g/L Sigma-Aldrich), resazurina sal sódica (0,001 g/L, Alfa Aesar). Este medio se redujo en cámara anaeróbica y se esterilizó en autoclave antes de su utilización.

Tabla 1: Lista de cepas utilizadas en este estudio

Nombre	Medio usual
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CNCM I-1631	M17 con lactosa
<i>Streptococcus thermophilus</i> CNCM I-3862	M17 con lactosa
<i>F. prausnitzii</i> DSM 17677	BHI

25 Tabla 2. Composición de YCFA optimizada para este estudio

Componente	g/L (1 L)
Extracto de levadura	5
Celobiosa	2
Triptona	10
Fosfato de potasio dibásico	0,45 (450 mg)
Cloruro de sodio	0,9 (900 mg)
Sulfato de amonio	0,9 (900 mg)
Sulfato de magnesio	0,09 (90 mg)
Cloruro de calcio	0,09 (90 mg)
Resazurina sal sódica al 0,01 %	10 mL
Bicarbonato de sodio al 4 %	100 mL
Acetato de sodio al 5 %	100 mL
Cloruro de hemina al 1 % + 0,4 mL de NaOH 5 M	1 mL
Lactosa monohidrato al 5 %	100 mL
Glucosa al 10 %	200 mL
Cisteína al 5 %	10 mL

Preparación de sobrenadantes bacterianos

Los sobrenadantes bacterianos se produjeron como sigue: Se cultivaron las cepas en 2 mL de medios de cultivo usuales y atmósfera (tabla 1) a 37 °C. Después de 24 h de crecimiento, se inocularon las células al 1 % en 10 mL de medios de cultivo usuales y atmósfera (tabla 1) a 37 °C. Finalmente, se inocularon estos cultivos al 1 % en 50 mL de

YCFA, previamente reducidos como se ha descrito anteriormente, a 37 °C durante 24 h. Se sedimentaron los cultivos a 7500 g durante 10 minutos, se filtraron los sobrenadantes a 0,2 µm y se congelaron directamente a -20 grados.

Ensayos de estimulación de *Faecalibacterium prausnitzii* DSM 17677 por bacterias de ácido láctico

Antes de su utilización, se dejó que los sobrenadantes bacterianos se redujeran en la cámara anaeróbica durante 2 horas. Después, se añadieron 4 mL de sobrenadantes reducidos procedentes de las cepas bacterianas a 50 mL de YCFA. Como control, se añadieron 4 mL de YCFA estéril a 50 mL de YCFA. Posteriormente, se inoculó un cultivo de 48 horas de *F. prausnitzii* al 1 % en el medio YCFA. Se controló el crecimiento durante 72 horas. Se midieron la OD y el pH a intervalos regulares durante el crecimiento (horas). Se recogieron las muestras y se conservaron para la extracción de DNA (véase más adelante). Se recogieron muestras adicionales para su posterior análisis (análisis de DNA, SCFA, metabolómica y transcriptómica).

Análisis de metabolitos.

Se recogieron 2 mL de cultivo fresco y se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos. Se filtraron los sobrenadantes (0,2 µm) y se conservaron a -20 °C hasta el análisis.

Se recogieron muestras para análisis de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y de ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) después de 16, 22 y 40 h. Se midieron cuantitativamente. Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) acetato, propionato, butirato, valerato, caproato y los ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) isobutirato, isovalerato e isocaproato así como lactato se midieron en Prodigest de la siguiente manera: se extrajeron los ácidos grasos de cadena corta de las muestras con éter dietílico, después de la adición de ácido 2-metilhexanoico como estándar interno. Se analizaron los extractos utilizando un cromatógrafo de gases GC-2014 (Shimadzu, 'S'-Hertogenbosch, Países Bajos), equipado con una columna capilar Econo-Cap EC-1000 libre de ácidos grasos (dimensiones: 25 mm, 0,53 mm, espesor de película 1,2 mM; Alltech, Laarne, Bélgica), un detector de ionización de llama y un inyector de fraccionamiento. El volumen de inyección fue de 1 mL y el perfil de temperatura se ajustó de 110 a 160 °C, con un aumento de temperatura de 6 °C/min. El gas portador fue nitrógeno y la temperatura del inyector y del detector fue de 100 y 220 °C, respectivamente. La producción de ácidos grasos de cadena corta no ramificados y ramificados se calculó sumando las concentraciones molares de acetato, propionato, butirato, valerato y caproato, y sumando las concentraciones molares de isobutirato, isovalerato e isocaproato, respectivamente. La producción total de ácidos grasos de cadena corta se definió como la suma de ácidos grasos de cadena corta no ramificados y ramificados. El lactato se midió utilizando un kit de D-lactato/L-lactato (R-Biopharm, Mannheim, Alemania), según los protocolos del fabricante.

Resultados

Los resultados de la estimulación del crecimiento de *F. prausnitzii* por los sobrenadantes de cultivo de *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se muestran en la Figura 1. Se puede ver que ambos sobrenadantes producen un aumento del crecimiento de *F. prausnitzii* después de 40 horas y 65 horas de cultivo.

Los resultados de la estimulación de la producción de butirato por el crecimiento de *F. prausnitzii* por los sobrenadantes de cultivo de *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se muestran en la Figura 2. Después de 40 horas de incubación, hubo un aumento del 15 % de la producción de butirato en presencia de sobrenadante de *S. thermophilus* y *L. lactis* en comparación con el cultivo único (19,2 mmol/L $\pm$ 3,6 mmol/L, 19,0 mmol/L $\pm$ 0,8 mmol/L y 16,7 mmol/L $\pm$ 1 mmol/L respectivamente).

REIVINDICACIONES

1. *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862 o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM I-1631, para su utilización no terapéutica para aumentar o mantener una población de *Faecalibacterium prausnitzii*.
- 5 2. *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862 o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM I-1631, para su utilización no terapéutica según la reivindicación 1, que comprende además aumentar o mantener la producción de butirato.
3. *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862 o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM I-1631, para su utilización no terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para aumentar o mantener una población de *Faecalibacterium prausnitzii* en un individuo.
- 10 4. *Streptococcus thermophilus* CNCM I-3862 o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNCM I-1631, para su utilización no terapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para aumentar o mantener la producción de butirato intestinal en un individuo.
5. Una cepa de *Streptococcus thermophilus* depositada en el CNCM con el número de referencia I-3862.
6. Un producto lácteo fermentado que comprende la cepa de *Streptococcus thermophilus* de la reivindicación 5.

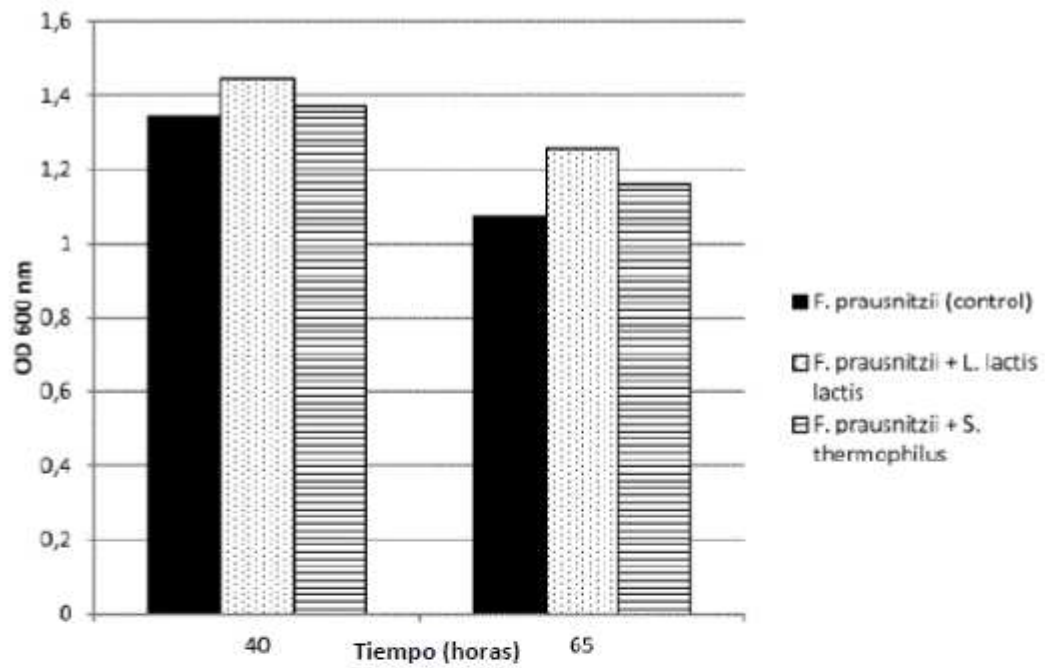


Figura 1

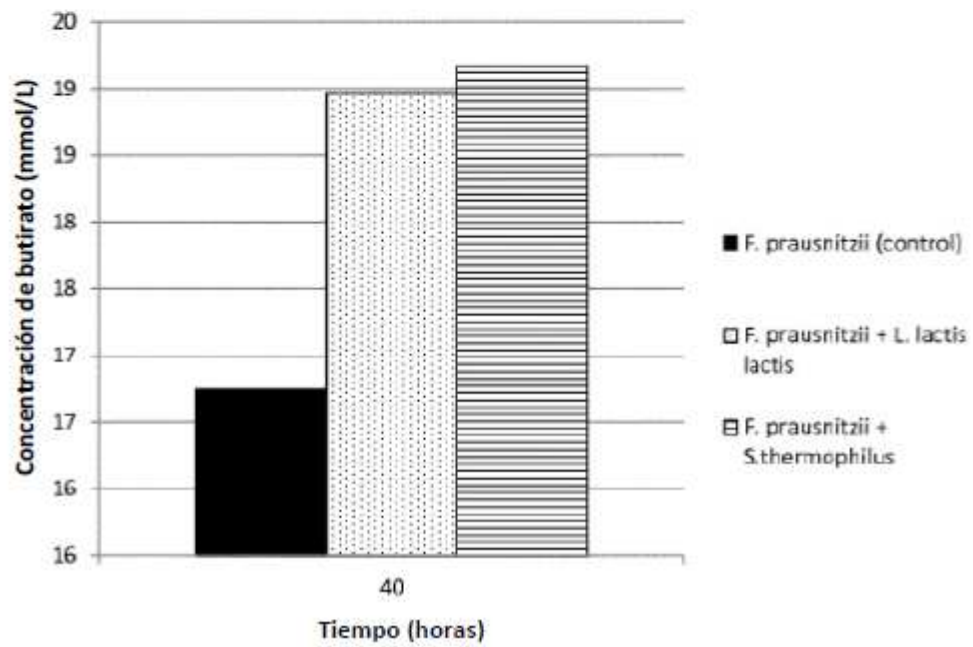


Figura 2