

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 909 102**

(51) Int. Cl.:

A61P 19/10 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/22 (2006.01)
A23L 33/21 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2014 PCT/US2014/031526**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153554**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2014 E 14721678 (2)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.12.2021 EP 2981180**

(54) Título: **Usos de fibra de maíz soluble para aumentar poblaciones de bacterias colónicas y aumentar la absorción de minerales**

(30) Prioridad:

22.03.2013 US 201361804584 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2022

(73) Titular/es:

TATE & LYLE SOLUTIONS USA LLC (50.0%)
5450 Prairie Stone Parkway
Hoffman Estates, IL 60192, US y
PURDUE RESEARCH FOUNDATION (50.0%)

(72) Inventor/es:

WEAVER, CONNIE, MARIE;
NAKATSU, CINDY, H.;
WILLIAMSON, PATRICIA;
HOFFMAN, ANDREW, JOSEPH y
SANDERS, LISA, MERLE

(74) Agente/Representante:

BALLESTER INTELLECTUAL PROPERTY S.L.P.U

ES 2 909 102 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

Usos de fibra de maíz soluble para aumentar poblaciones de bacterias colónicas y aumentar la absorción de minerales

5

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente provisional n.º de serie U.S. 61/804.584, presentada el 22 de marzo de 2013.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere en general a fibra de maíz soluble (SCF) y a sus usos y composiciones.

Sumario de la técnica relacionada

20 La microflora intestinal forma un ecosistema complejo que interactúa con las células huésped y los nutrientes. Un cuerpo humano adulto contiene una biomasa bacteriana viva de más de 10^{14} y más de 400 especies diferentes, lo que representa la comunidad microbiana más grande, densa y diversa del cuerpo humano. La presencia de bacterias intestinales es parte de la fisiología humana normal y es importante para el desarrollo de las funciones intestinales, recolectando energía de los carbohidratos de la dieta, recolectando vitaminas esenciales y metabolizando químicos ambientales en el intestino. Estudios recientes sugirieron además que las bacterias intestinales pueden estar involucradas en el almacenamiento de grasa y afectar el aumento y la pérdida de peso. Las bacterias intestinales también están involucradas en la maduración del sistema inmunológico, están en comunicación constante con el sistema inmunológico y protegen contra los patógenos. Dada la importancia de las bacterias intestinales en la salud y el bienestar, ha surgido un gran interés en los ingredientes de alimentos funcionales para mejorar las poblaciones de bacterias intestinales beneficiosas.

30

35 La adolescencia es una etapa importante de la vida para la salud de los huesos y brinda una oportunidad única para maximizar la retención de minerales y prevenir el riesgo de fracturas relacionadas con la osteoporosis más adelante en la vida. Debido a que el calcio es cada vez más deficiente en la dieta debido a la disminución del consumo de leche, ha surgido un gran interés en los ingredientes de los alimentos funcionales para mejorar la utilización del calcio.

40

45 El documento WO 2010/094789 A1 divulga cepas bacterianas productoras de butirato relacionadas con la especie *Butyricoccus pullicaecorum* para ser utilizadas en la prevención y/o tratamiento de problemas de salud intestinal, donde las cepas productoras de ácido butírico se eligen de *Butyricoccus pullicaecorum* depositadas en la colección bacteriana pública BCCM/LMG como *B. pullicaecorum* LMG24109 y cepas que muestran al menos 93 % de homología con la secuencia de ARNr 16S de *Butyricoccus pullicaecorum* caracterizada por la SEQ ID No 1 en la misma.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

45

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición comestible que comprende fibra de maíz soluble y una o más poblaciones bacterianas seleccionadas de los géneros *Butyricoccus* y *Oscilibacter*, como se define en las reivindicaciones 1 a 7.

50

En otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición comestible que comprende fibra de maíz soluble y una o más poblaciones bacterianas seleccionadas de los géneros *Butyricoccus* y *Oscilibacter* para uso en el aumento de una o más poblaciones de bacterias colónicas en un sujeto mamífero seleccionado de los géneros *Butyricoccus* y *Oscilibacter*, como se define en las reivindicaciones 8 y 9.

55

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende fibra de maíz soluble para usar en el aumento de una o más poblaciones de bacterias colónicas en un sujeto mamífero seleccionado de los géneros *Butyricoccus* y *Oscilibacter* en un sujeto, como se define en las reivindicaciones 10 a 14.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60

La invención expuesta en el presente documento se puede entender ventajosamente con respecto a los dibujos.

65

La figura 1 muestra el efecto de SCF en la absorción fraccional de calcio (media + SEM) durante el Día 1 y el Día 2 después de una prueba de absorción de calcio con isótopos duales estables en niños y niñas adolescentes. Un modelo lineal general que incluyó tratamiento, secuencia y fase para cada período de tiempo

(0-24 h y 24-48 h) indicó que la absorción de calcio para SCF fue mayor que la del control a las 24-48 h (P=0,02) pero no a las 0-24 h (P=0,09).

5 La **figura 2** muestra la comparación de los tratamientos SCF y Control sobre la absorción fraccional de calcio medida por las recolecciones de orina de 0-24 h y de 24-48 h.

10 La **figura 3** muestra una comparación de proporciones relativas promedio de familias bacterianas en sujetos al principio (B) y al final (E) de sesiones clínicas donde las dietas incluían fibra de maíz soluble (SCF) vs control (Con). Solo se representan familias que representan > 1,0% de la comunidad total en al menos un tratamiento. Las barras de error representan los errores estándar de las medias. Las letras representan diferencias significativas dentro de cada familia (p < 0,05).

15 La **figura 4** muestra un histograma que compara la proporción promedio de los principales filos bacterianos al principio (B) y al final (E) de cada tratamiento de dieta SCF.

20 La **figura 5** muestra el análisis de rarefacción de las medidas de diversidad de Chao1 realizadas a partir de muestras fecales iniciales (B) y finales (E) recolectadas de sujetos con diferentes tratamientos de dieta SCF.

25 La **figura 6** muestra el análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias Jackknife Bray Curtis (distancia Manhattan normalizada) de muestras de suplementos dietéticos SCF codificadas por composición comunitaria recolectadas al principio (B) y al final (E) del tratamiento SCF.

30 La **figura 7** muestra el análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias euclidianas de Jackknife Bray de muestras de suplementos dietéticos SCF codificadas de composición comunitaria recolectadas al principio (B) y al final (E) del tratamiento SCF.

35 La **figura 8** muestra el análisis de coordenadas principales (PCoA) del análisis Jackknife de distancias filogenéticas Unifrac G de composición comunitaria recopiladas de sujetos al principio (B) y al final (E) del tratamiento SCF.

40 La **figura 9** es un diagrama esquemático que demuestra un ejemplo de un método para hacer fibra soluble fermentable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Antes de que se describan los métodos y materiales divulgados, debe entenderse que los aspectos descritos en el presente documento no se limitan a realizaciones, métodos o composiciones específicos y, como tales, pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir aspectos particulares únicamente y, a menos que se defina específicamente en el presente documento, no pretende ser limitativa.

50 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprende" e "incluye" y sus variaciones (por ejemplo, "que comprende", "comprendiendo", "que incluye", "incluyendo") se entenderá que implica la inclusión de un componente, función, elemento o etapa o grupo de componentes, funciones, elementos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento esencial o etapa o grupo de elementos esenciales o etapas.

55 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

60 Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como desde "aproximadamente" un valor particular, y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otro aspecto incluye desde un valor particular y/o hasta otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final.

65 En vista de la presente divulgación, los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden ser configurados por un experto en la materia para satisfacer la necesidad deseada. En general, los métodos y composiciones divulgados proporcionan mejoras en la microbiota intestinal. Por ejemplo, en ciertos aspectos, los métodos de la divulgación aumentan una o más poblaciones de bacterias colónicas que son capaces de fermentar y producir ácidos grasos de cadena corta.

70 Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende fibra de maíz soluble aumenta la población de una o más

poblaciones de bacterias colónicas, cada una de un género seleccionado del grupo que consta de *Butyricicoccus* y *Oscilibacter* y combinaciones de estos. En un ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Parabacteroides*. En otra 5 realización de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende fibra de maíz soluble aumenta la población de *Butyricicoccus*. En otra realización de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende fibra de maíz soluble aumenta la población de *Oscilibacter*. En otro ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el 10 presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Dialister*. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende fibra de maíz soluble aumenta la población de *Butyricicoccus* y *Oscilibacter*. Por ejemplo, en un ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de 15 la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Parabacteroides* y *Dialister*. Por supuesto, se pueden aumentar adicionalmente otras poblaciones bacterianas. En ciertos ejemplos de este tipo, la absorción de calcio también aumenta (por ejemplo, como se describe a continuación).

20 Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende una fibra de maíz soluble aumenta la población de una o más poblaciones de bacterias colónicas, cada una de un género seleccionado del grupo que consta de *Butyricicoccus* y *Oscilibacter*, y combinaciones de estos. Por ejemplo, en un ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Bacteroides*. 25 En otra realización de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende fibra de maíz soluble aumenta la población de *Butyricicoccus*. En otra realización de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende fibra de maíz soluble aumenta la población de *Oscilibacter*. En otro ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble 30 fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Dialister*. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la administración de una composición que comprende fibra de maíz soluble aumenta la población de *Butyricicoccus* y *Oscilibacter*. Por ejemplo, en un ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble 35 fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Bacteroides* y *Dialister*. Por supuesto, se pueden aumentar adicionalmente otras poblaciones bacterianas. En ciertos ejemplos de este tipo, la absorción de calcio también aumenta (por ejemplo, como se describe a continuación).

40 En otras realizaciones de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, como la fibra de maíz soluble, aumenta la población de una o más poblaciones de bacterias colónicas, cada una de un género seleccionado de la grupo formado por *Parabacteroides*, *Bifidobacterium*, *Alistipes*, *Anaerococcus*, *Catenibacterium*, géneros dentro del orden Clostridiales (por ejemplo, no *Clostridium*, *Anaerofustis*, *Anaerococcus*, *Coprococcus*, *Peptostreptococcaceae*, *Sporacetigenium*); y géneros dentro de la familia Ruminococcaceae y 45 cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, en un ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Parabacteroides*. En otro ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble 50 fermentable, como la fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Bifidobacterium*. En otro ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, como la fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Alistipes*. En otro ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble 55 fermentable, como la fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Anaerococcus*. En otro ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, como la fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Catenibacterium*. En otro ejemplo de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble 60 fermentable, como la fibra de maíz soluble, aumenta la población del orden Clostridiales. Por ejemplo, en ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra 65

parte de la invención reivindicada, la administración de una composición que comprende una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble, aumenta la población de *Parabacteroides* y *Dialister*; *Parabacteroides* y *Akkermansia*; *Parabacteroides* y *Lachnospiraceae*; *Dialister* y *Akkermansia*; *Dialister* y *Lachnospiraceae*; *Akkermansia* y *Lachnospiraceae*; *Parabacteroides*, *Dialister*, y *Akkermansia*; *Parabacteroides*, *Dialister*, y *Lachnospiraceae*; *Parabacteroides*, *Akkermansia*, y *Lachnospiraceae*; *Dialister*, *Akkermansia*, y *Lachnospiraceae*; o *Parabacteroides*, *Dialister*, *Akkermansia*, y *Lachnospiraceae*. Por supuesto, se pueden aumentar adicionalmente otras poblaciones bacterianas.

5 En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, una o más de las 10 poblaciones de bacterias colónicas (por ejemplo, como se describe anteriormente) aumentan en al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 80 %, o incluso al menos 100 % en comparación con un sujeto no tratado. En ciertas realizaciones de este tipo, la 15 población de bacterias colónicas aumenta no más de aproximadamente 500 %. En otras realizaciones de este tipo, la población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 400 %. En otras realizaciones de este tipo, la población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 300 %. En otras realizaciones de este tipo, la población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 200 %. En otras 20 realizaciones de este tipo, la población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 100 %. En ciertas realizaciones de los métodos y composiciones descritos en el presente documento, cada una o más de las 25 poblaciones de bacterias colónicas (por ejemplo, como se describe anteriormente) aumentan en al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos 50 %, o incluso al menos 100 % en comparación con un sujeto no tratado. Esto significa que hay instancias en las que cada una de estas bacterias puede verse afectada independientemente una 30 de la otra a diferentes velocidades (por ejemplo, una bacteria puede aumentar en un 50 % en la población, mientras que otra bacteria puede aumentar solo en un 25 %). En ciertas realizaciones de este tipo, cada población de bacterias colónicas aumenta no más de aproximadamente 500 %. En otras realizaciones de este tipo, cada población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 400 %. En otras realizaciones de este tipo, cada población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 300 %. En otras realizaciones de este tipo, cada población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 200 %. En otras 35 realizaciones de este tipo, cada población de bacterias colónicas aumenta en no más de aproximadamente 100 %.

En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la proporción de una o más de las 40 poblaciones de bacterias colónicas (por ejemplo, como se describe anteriormente) como porcentaje de las bacterias colónicas totales aumentan en al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos 50 %, al menos aproximadamente 100 %, al menos aproximadamente 200 % o incluso al menos 300 % en comparación con un sujeto no tratado. En ciertas realizaciones de este tipo, la proporción de una o más de las 45 poblaciones de bacterias colónicas como porcentaje de las bacterias colónicas totales se incrementa en no más de aproximadamente 700 %. En otras realizaciones de este tipo, la proporción de una o más de las 50 poblaciones de bacterias colónicas como porcentaje de las bacterias colónicas totales se incrementa en no más de aproximadamente 600 %. En otras realizaciones de este tipo, la proporción de una o más de las 55 poblaciones de bacterias colónicas como porcentaje de las bacterias colónicas totales se incrementa en no más de aproximadamente 500 %. En otras realizaciones de este tipo, la proporción de una o más de las 60 poblaciones de bacterias colónicas como porcentaje de las bacterias colónicas totales se incrementa en no más de aproximadamente 400 %. En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la proporción (es decir, como un porcentaje del total de bacterias colónicas) de cada una o más de las poblaciones de bacterias colónicas (por ejemplo, como se describe anteriormente) aumenta en al menos aproximadamente 20 %, al menos 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 100 %, al menos 200 % o incluso al menos 300 % en comparación con un sujeto no tratado. Esto significa que hay instancias en las que cada una de estas bacterias puede verse afectada de forma independiente a diferentes velocidades (por ejemplo, una población de bacterias puede aumentar en un 50 % en proporción, mientras que otra población de bacterias puede aumentar solo en un 25 %). En ciertas realizaciones de este tipo, cada proporción se incrementa en no más de un 500 %. En otras realizaciones de este tipo, cada proporción se incrementa en no más de aproximadamente 400 %. En otras realizaciones de este tipo, cada proporción se incrementa en no más de aproximadamente 300 %. En otras realizaciones de este tipo, cada proporción se incrementa en no más de aproximadamente 200 %. En otras realizaciones de este tipo, cada proporción se incrementa en no más de aproximadamente 100 %.

En otro ejemplo que no forma parte de la invención reivindicada, un método para aumentar una o más 65 poblaciones de bacterias colónicas en un sujeto incluye la administración oral al sujeto de una fibra soluble fermentable, tal como fibra de maíz soluble. En ciertos ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada, la administración oral se realiza de tal manera que se produce una disminución del pH fecal (por ejemplo, como se describe a continuación, a un valor no superior a aproximadamente 5,5, por ejemplo, a partir de un valor de pH de aproximadamente 7 a un valor de pH de aproximadamente 4,5). Tal disminución puede, por ejemplo, dar como resultado un aumento en la biodisponibilidad de minerales (por ejemplo, minerales divalentes como el calcio, como se describe anteriormente).

En otro ejemplo que no forma parte de la invención reivindicada, los métodos de la divulgación también disminuyen el pH fecal en un sujeto mediante la administración oral al sujeto de una fibra soluble fermentable, tal como fibra de maíz soluble. Por ejemplo, en ciertos ejemplos de los métodos y composiciones que se describen en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el pH fecal se reduce en al menos aproximadamente 1,5 unidades de pH, al menos aproximadamente 2 unidades de pH, o incluso en al menos aproximadamente 2,5 unidades de pH, en comparación con un sujeto no tratado. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el pH fecal se reduce a no más de aproximadamente 5,5, no más de aproximadamente 5 o incluso no más de aproximadamente 4,5. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el pH fecal se reduce a un valor en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 5,5, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5, aproximadamente 4 a aproximadamente 5, o aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5. En determinadas realizaciones, el pH fecal se reduce a aproximadamente 4,5, por ejemplo, de aproximadamente 7 a aproximadamente 4,5.

En realizaciones de los usos y composiciones que se describen en el presente documento, la fibra soluble fermentable es fibra de maíz soluble. La fibra de maíz soluble es una fibra soluble derivada del almidón que está hecha de maíz y que comprende oligosacáridos que son resistentes a la digestión, oligosacáridos que son de digestión lenta o una combinación de estos. La fibra de maíz soluble puede obtenerse mediante hidrólisis de almidón de maíz y contiene más de aproximadamente 70 % de fibra y menos de aproximadamente 20 % de azúcares mono y disacáridos. Las unidades de glucosa de los oligosacáridos están unidas principalmente por enlaces glucosídicos α -1,4, pero también pueden incluir enlaces α -1,6, α -1,3 y α -1,2.

En determinadas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la fibra de maíz soluble tiene un contenido de fibra en el intervalo de aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 % (p/p). En otra realización, el contenido de fibra de la fibra de maíz soluble está en el intervalo de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 70 % a aproximadamente 95 %, o aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 %, o del 75 % al 90 %, o del 75 % al 95 %, o del 75 % al 100 %, o del 70 % al 85 % (p/p). En una realización, el contenido de fibra es de aproximadamente 70 % (p/p). En otra realización, el contenido de fibra es de aproximadamente 85 % (p/p). Un experto en la técnica apreciará que el contenido de fibra puede medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, como gravimetría enzimática, cromatografía líquida, cromatografía gas-líquido, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con Detección amperométrica pulsada (HPAE-PAD), y otros métodos enzimáticos y químicos. En una realización preferida, el contenido de fibra se mide por HPAE-PAD. Por ejemplo, se utiliza un cromatógrafo iónico Dionex, DX500, equipado con detector electroquímico y bomba de gradiente, para analizar muestras que se separan en columnas analíticas y precolumnas Dionex CarboPac PA1 con gradiente de suministro de disolventes, detectados mediante un electrodo de oro con cuatro potenciales, forma de onda, y se diluyó con agua y se pasó a través de dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra-4 antes del análisis.

En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, el contenido de monosacáridos y disacáridos de la fibra de maíz soluble es inferior al 20 % aproximadamente. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el contenido de monosacáridos y disacáridos de la fibra de maíz soluble es inferior al 15 %, inferior al 10 %, inferior al 5 % o incluso inferior al 2 %. En ciertas realizaciones de este tipo, el contenido de monosacáridos y disacáridos de la fibra de maíz soluble no es inferior al 0 %, no inferior al 0,001 %, no inferior al 0,01 %, o incluso no inferior al 0,1 %.

En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, los oligosacáridos de la fibra de maíz soluble tienen un grado medio de polimerización de al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 7 o al menos aproximadamente 9. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, los oligosacáridos de la fibra de maíz soluble tienen un grado medio de polimerización en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 20, aproximadamente 7 a aproximadamente 20 o de aproximadamente 9 a aproximadamente 20. En otras realizaciones, los oligosacáridos de la fibra de maíz soluble tienen un grado de polimerización promedio en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, aproximadamente 7 a aproximadamente 15, o aproximadamente 9 a aproximadamente 15. Por ejemplo, en una realización de los métodos y composiciones descritos en el presente documento, los oligosacáridos de la fibra de maíz soluble tienen un grado medio de polimerización de aproximadamente 10.

En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la porción de oligosacárido de la fibra de maíz soluble permanece sustancialmente sin digerir en el estómago y el intestino delgado de un sujeto cuando se ingiere.

Los productos comerciales de fibra de maíz soluble adecuados incluyen PROMITOR™ Fibra de maíz soluble 70 (contenido mínimo de fibra de aproximadamente 70 %, contenido máximo de monosacáridos y disacáridos de aproximadamente 20 %) y PROMITOR™ Fibra de maíz soluble 85 (contenido mínimo de fibra de aproximadamente

85 %, contenido máximo de monosacáridos y disacáridos de aproximadamente 2 %), disponible de Tate & Lyle Health & Nutrition Sciences, Hoffman Estates, IL.

- 5 Ciertas fibras de maíz solubles adecuadas para usar en los usos y composiciones descritos en el presente documento se describen con más detalle en Publicaciones de Solicitudes de Patentes de U.S. n.º 2008/0292766, 2006/0210696 y 2008/0175977. En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritas en el presente documento, la fibra de maíz soluble es como se describe en un aspecto o realización de Publicación de Solicitud de Patente de U.S. n.º 2008/0292766, 2006/0210696 o 2008/0175977.
- 10 En ciertas realizaciones de los usos y composiciones que se describen en el presente documento, la fibra de maíz soluble se produce mediante un proceso descrito en las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840. Por ejemplo, en una realización, el proceso para producir la fibra de maíz soluble incluye el uso de una composición de alimentación acuosa que comprende al menos un monosacárido o un oligómero de sacárido lineal, y que tiene una concentración de sólidos de al menos aproximadamente 70 % en peso. La composición de alimentación se calienta a una temperatura de al menos aproximadamente 40 °C y se pone en contacto con al menos un catalizador que acelera la velocidad de escisión o formación de enlaces glucosilo durante un tiempo suficiente para provocar la formación de oligómeros sacáridos no lineales. En una realización particular, el proceso incluye calentar una composición de alimentación acuosa que comprende al menos aproximadamente oligómero de monosacárido o sacárido lineal, y que tiene una concentración de sólidos de al menos aproximadamente 70 % en peso, a una temperatura de al menos aproximadamente 40 °C; y poner en contacto la composición de alimentación con al menos un catalizador que acelera la velocidad de escisión o la formación de enlaces glucosilo durante un tiempo suficiente para causar la formación de oligómeros de sacáridos no lineales, donde se produce una composición de producto que contiene una concentración más alta de oligómeros de sacáridos no lineales que de oligómeros de sacáridos lineales; en el que la composición del producto comprende oligómeros de sacáridos no lineales que tienen un grado de polimerización de al menos tres en una concentración de al menos aproximadamente 20 % en peso sobre una base de sólidos secos. En ciertas realizaciones de este tipo, la composición del producto se produce que contiene una mayor concentración de oligómeros de sacáridos no lineales que de oligómeros de sacáridos lineales. En una realización del proceso, el al menos un catalizador es una enzima que acelera la tasa de escisión o formación de enlaces glucosilo. En otra realización del proceso, el al menos un catalizador es un ácido. En algunas realizaciones del proceso, el ácido y la enzima se pueden usar en secuencia, tratándose la composición del alimento primero con enzima y luego con ácido, o viceversa.
- 35 En ciertas realizaciones de los procesos como se describe con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la composición de alimentación acuosa incluye al menos un monosacárido y al menos un oligómero de sacárido lineal, y puede contener varios de cada uno. En muchos casos, los monosacáridos y oligosacáridos constituirán al menos aproximadamente 70 % en peso sobre la base de sólidos secos de la composición de alimentación. En general, es útil que el material de partida tenga una concentración de monosacáridos lo más alta posible, para maximizar el rendimiento de los oligómeros deseados. Una alta concentración de sólidos tiende a conducir el equilibrio desde la hidrólisis hacia la condensación (reversión), produciendo así productos de mayor peso molecular. Por lo tanto, el contenido de agua del material de partida es preferiblemente relativamente bajo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la composición del pienso comprende al menos aproximadamente 75 % en peso de sólidos secos. ("Sólidos secos" a veces se abrevia en el presente documento como "ds"). En algunos casos, la composición de alimentación comprende aproximadamente 75-90 % de sólidos en peso, lo que generalmente dará la apariencia de un jarabe viscoso o polvo húmedo a temperatura ambiente.
- 40 45 Ejemplos de materiales de partida adecuados para los procesos descritos con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840 incluyen, pero no se limitan a, jarabes hechos por hidrólisis de almidón, tales como jarabe de dextrosa verde (es decir, corriente reciclado de licor madre de cristalización de dextrosa monohidrato), otros jarabes de dextrosa, jarabe de maíz y soluciones de maltodextrina. Si la composición de alimentación comprende maltodextrina, el proceso también puede incluir opcionalmente las etapas de hidrolizar la maltodextrina para formar una solución de sacárido hidrolizada y concentrar la solución de sacárido hidrolizada hasta al menos aproximadamente 70 % de sólidos secos para formar la composición de alimentación. La concentración y el contacto de la alimentación con el catalizador pueden ocurrir simultáneamente, o la concentración puede ocurrir antes de poner en contacto la composición de alimentación con el catalizador.
- 50 55 En ciertas realizaciones de los procesos como se describe con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la composición de alimentación se pone en contacto con el al menos un catalizador durante un período de tiempo que puede variar. En algunos casos, el período de contacto será de al menos unas cinco horas. En algunas realizaciones de la invención, la composición de alimentación se pone en contacto con al menos un catalizador durante aproximadamente 15-100 horas. En otras realizaciones, se pueden usar tiempos de contacto más cortos con temperaturas más altas, en algunos casos incluso menos de una hora.
- 60 65 En ciertas realizaciones de los procesos como se describe con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la reversión enzimática se usa para producir oligosacáridos no lineales. La enzima puede ser, por ejemplo, una que acelere la velocidad de escisión de los enlaces glucosilo alfa 1-2, 1-3, 1-4 o 1-6 para formar

residuos de dextrosa. Un ejemplo adecuado es una composición enzimática de glucoamilasa, tal como una composición enzimática comercial que se denomina glucoamilasa. Debe entenderse que dicha composición puede contener alguna cantidad de enzimas distintas de la glucoamilasa pura, y no debe suponerse que, de hecho, es la propia glucoamilasa la que cataliza la producción deseada de oligosacáridos no lineales. Por lo tanto, la composición del alimento puede ponerse en contacto con glucoamilasa o cualquier otra enzima que actúe sobre los polímeros de dextrosa. La cantidad de enzima puede ser adecuadamente del 0,5 al 2,5 % en volumen de la composición del pienso. En algunas realizaciones del proceso, la composición de alimentación se mantiene a aproximadamente 55-75 °C durante el contacto con la enzima, o en algunos casos aproximadamente 60-65 °C. A esta temperatura, dependiendo del contenido de agua, el material se convertirá en un líquido, o en una mezcla de líquido y sólido. Opcionalmente, la mezcla de reacción se puede mezclar o agitar para distribuir la enzima. La mezcla de reacción se mantiene a la temperatura deseada durante el tiempo necesario para lograr el grado deseado de reversión a oligómeros no lineales. En algunas realizaciones del proceso, la composición del alimento se pone en contacto con la enzima durante aproximadamente 20 a 100 horas antes de la inactivación de la enzima o, en algunos casos, durante aproximadamente 50 a 100 horas antes de la inactivación. Las técnicas para inactivar la glucoamilasa son bien conocidas en el campo. Alternativamente, en lugar de inactivar la enzima, puede separarse mediante filtración por membrana y reciclarse.

En ciertas realizaciones de los procesos como se describe con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la composición resultante tiene una alta concentración de oligosacáridos no lineales, como la isomaltosa. Esta composición de producto contiene una mayor concentración de oligómeros de sacáridos no lineales que de oligómeros de sacáridos lineales. En algunos casos, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales en la composición final es al menos el doble que la concentración de oligómeros de sacáridos lineales.

Otra realización procesa como se describe con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840 implica la reversión ácida de los monosacáridos. El material de partida es el mismo que el descrito anteriormente con respecto a la versión enzimática del proceso. Se puede utilizar una variedad de ácidos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o una combinación de estos. En algunas realizaciones del proceso, se agrega ácido a la composición del alimento en una cantidad suficiente para que el pH de la composición del alimento no supere aproximadamente 4 o, en algunos casos, en una cantidad suficiente para que el pH de la composición del alimento sea de aproximadamente 1,0-2,5, o aproximadamente 1,5-2,0. En algunas realizaciones, la concentración de sólidos de la composición de alimentación es de aproximadamente 70-90 %, la cantidad de ácido añadida a la alimentación es de aproximadamente 0,05 %-0,25 % (p/p) de sólidos ácidos sobre sólidos secos de jarabe, y la composición de alimentación es mantenido a una temperatura de aproximadamente 70-90 °C durante el contacto con el ácido. Como en la versión enzimática del proceso, las condiciones de reacción se mantienen durante un tiempo suficiente para producir los oligómeros deseados, que en algunas realizaciones del proceso será de aproximadamente 4-24 horas.

En una realización particular de los procesos descritos con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la concentración de sólidos de la composición de alimentación es de al menos aproximadamente 80 % en peso, se añade ácido a la composición de alimentación en una cantidad suficiente para que el pH de la composición sea de aproximadamente 1,8 y la composición de alimentación se mantiene a una temperatura de al menos aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 4-24 horas después de que se ponga en contacto con el ácido.

En otra realización particular de los procesos descritos con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la concentración de sólidos de la composición de alimentación es de aproximadamente 90-100 % en peso, y la composición de alimentación se mantiene a una temperatura de al menos aproximadamente 149 °C (300 °F) durante aproximadamente 0,1-15 minutos después de ponerse en contacto con el ácido. El ácido utilizado para tratar la alimentación puede ser una combinación de ácido fosfórico y ácido clorhídrico (en las mismas concentraciones discutidas anteriormente). En una realización particular, el contacto de la composición de alimentación con el ácido tiene lugar en un reactor de tubería continua / flujo continuo.

Con mucho, el enlace glucosídico más abundante en el almidón es el enlace alfa-1,4, y este es el enlace que se rompe con mayor frecuencia durante la hidrólisis ácida del almidón. Pero la reversión (condensación) catalizada por ácido puede tener lugar entre dos grupos hidroxilo cualesquiera y, dada la gran variedad de combinaciones y geometrías disponibles, la probabilidad de que se forme un enlace alfa-1,4 es relativamente pequeña. El sistema digestivo humano contiene alfa-amilasas que digieren fácilmente los enlaces alfa-1,4 del almidón y los jarabes de maíz. Reemplazar estos enlaces con enlaces no reconocidos por las enzimas en el sistema digestivo permitirá que el producto pase al intestino delgado prácticamente sin cambios. Se cree que las distribuciones de sacáridos resultantes del tratamiento con ácido son algo diferentes a las del tratamiento con enzimas. Se cree que estos productos de condensación catalizados por ácido serán menos reconocibles por las enzimas en el intestino humano que los productos producidos por enzimas y, por lo tanto, menos digeribles.

El tratamiento ácido progresó de manera diferente al tratamiento enzimático. Las enzimas hidrolizan rápidamente los oligómeros lineales y forman lentamente los oligómeros no lineales, mientras que con el ácido la reducción de los oligómeros lineales y el aumento de los oligómeros no lineales se producen a velocidades comparables. La dextrosa se forma rápidamente por hidrólisis enzimática de oligómeros y se consume lentamente a medida que se forman

productos de condensación no lineales, mientras que con la dextrosa ácida las concentraciones aumentan lentamente.

- 5 Opcionalmente, en determinadas realizaciones de los procesos descritos con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la reversión enzimática o ácida puede ir seguida de hidrogenación. El producto hidrogenado debería tener un contenido calórico más bajo que los hidrolizados de almidón hidrogenado actualmente disponibles. En una realización, la hidrogenación se puede usar para decolorar la composición del producto sin cambiar sustancialmente su equivalencia de dextrosa (DE). En una versión del proceso, la enzima y el ácido pueden usarse secuencialmente, en cualquier orden. Por ejemplo, el al menos un catalizador utilizado en el primer tratamiento 10 puede ser una enzima, y la composición del producto puede ponerse posteriormente en contacto con un ácido que acelera la velocidad de escisión o formación de enlaces glucosilo. Alternativamente, el al menos un catalizador utilizado en el primer tratamiento puede ser ácido, y la composición del producto puede ponerse en contacto posteriormente con una enzima que acelera la velocidad de escisión o formación de enlaces glucosilo.
- 15 La composición del producto producida por el tratamiento con ácido, enzima o ambos, tiene una concentración aumentada en base a sólidos secos de oligómeros de sacáridos no lineales. En algunos casos, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales que tienen un grado de polimerización de al menos tres (DP3+) en la composición del producto es al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 % o al menos aproximadamente 50 % en peso sobre una base de sólidos secos. En ciertas 20 realizaciones de este tipo, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales que tienen un grado de polimerización de al menos tres (DP3+) en la composición del producto no es más del 100 %, o no más del 99 %, o no más del 95%, o no más de aproximadamente 90 % en peso sobre una base de sólidos secos. En algunas realizaciones, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales en la composición del producto es al menos el doble que la concentración de oligómeros de sacáridos lineales.
- 25 En una realización particular de los procesos descritos con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales en la composición del producto es de al menos aproximadamente 90 % en peso sobre la base de sólidos secos, y la concentración de isomaltosa es de al menos 30 aproximadamente 70 % en peso sobre la base de sólidos secos.
- 30 La composición del producto a menudo contendrá alguna cantidad (típicamente menos del 50 % en peso sobre una base de sólidos secos, y a menudo mucho menos) de monosacáridos residuales. Opcionalmente, al menos algunos de los monosacáridos residuales (y otras especies) se pueden separar de los oligómeros (por ejemplo, mediante filtración por membrana, separación cromatográfica o digestión mediante fermentación) y la corriente de 35 monosacáridos se puede reciclar en la alimentación del proceso. De esta manera, los jarabes de azúcar simples se pueden convertir en aditivos alimentarios de alto valor.
- 40 La figura 1 muestra un ejemplo de un proceso que puede hacer uso de la técnica de reversión descrita anteriormente. El proceso puede comenzar con un almidón, por ejemplo, un almidón vegetal. El almidón de maíz convencional es un ejemplo adecuado. El proceso generalmente operará más eficientemente si el almidón inicial tiene una pureza relativamente alta. En una realización, el almidón de alta pureza contiene menos del 0,5 % de proteína en base a sólidos secos. Aunque parte de la siguiente discusión se centra en el maíz, debe entenderse que el presente proceso también es aplicable a los almidones derivados de otras fuentes, como la patata y el trigo, entre otros.
- 45 Ciertas realizaciones de los procesos como se describe en el presente documento con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840 se ilustran esquemáticamente en la figura 9. Como se muestra en la figura 9, al almidón 10 se le puede añadir ácido 12 y luego se puede gelatinizar 14 en un cocedor de almidón, por ejemplo, en un cocedor de chorro en el que los gránulos de almidón se ponen en contacto con vapor. En una versión del proceso, la suspensión de almidón, ajustada a un pH objetivo de 3,5 mediante la adición de ácido sulfúrico, se mezcla rápidamente con vapor en un horno de chorro y se mantiene entre 149 y 152 °C (entre 300 y 305 °F) durante 4 minutos en una línea de cola. El almidón gelatinizado 16 se hidroliza 18 por exposición a ácido a alta temperatura durante la cocción a chorro. La hidrólisis reduce el peso molecular del almidón y genera un mayor porcentaje de monosacáridos y oligosacáridos en la composición. (Como se mencionó anteriormente, el término "oligosacáridos" 50 se usa en el presente documento para referirse a sacáridos que comprenden al menos dos unidades de sacárido, por ejemplo, sacáridos que tienen un grado de polimerización (DP) de aproximadamente 2-30). Se puede agregar un agente neutralizante 20, como carbonato de sodio, para detener la hidrólisis ácida, y luego la composición se puede despolimerizar aún más 24 poniéndola en contacto con una enzima hidrolítica 22. Las enzimas adecuadas incluyen alfa amilasas tales como Termamyl, que está disponible en Novozymes. Esta hidrólisis enzimática aumenta aún más 55 el porcentaje de monosacáridos y oligosacáridos presentes en la composición. El resultado global de la hidrólisis por tratamiento ácido y enzimático es sacrificar el almidón. La composición sacarificada se puede isomerizar para cambiar el perfil de monosacáridos, por ejemplo, para aumentar la concentración de fructosa.
- 60 A continuación, la composición sacarificada 26 se puede purificar, por ejemplo, mediante fraccionamiento cromatográfico 28. En una realización que emplea un procedimiento de cromatografía secuencial de lecho móvil 65

simulado (SSMB), se bombea una solución de sacáridos mixtos a través de una columna llena de perlas de resina. Dependiendo de la naturaleza química de la resina, algunos de los sacáridos interactúan con la resina con más fuerza, lo que provoca un flujo retardado a través de la resina en comparación con los sacáridos que interactúan con la resina de manera más débil. Este fraccionamiento puede producir una corriente 30 que tiene un alto contenido de monosacáridos, como dextrosa y fructosa. El jarabe de maíz de alta fructosa es un ejemplo de este tipo de corriente. El fraccionamiento también produce una corriente de refinado 32 (es decir, componentes que se mueven más rápido a través del lecho de resina) que tiene una concentración relativamente alta de oligosacáridos (por ejemplo, aproximadamente 5 - 15 % de oligosacáridos en base a sólidos secos (d.s.b.)) y también contiene una concentración más pequeña de monosacáridos como dextrosa y fructosa. Aunque el término "corriente" se usa en el presente documento para describir ciertas partes del proceso, debe entenderse que el proceso no se limita a la operación continua. El proceso también se puede realizar en modo de lote o semi-lote.

El refinado 32 se puede fraccionar adicionalmente mediante filtración de membrana 34, por ejemplo, mediante nanofiltración, opcionalmente con diafiltración. Por ejemplo, estas etapas de filtración se pueden realizar utilizando un cartucho de nanofiltración enrollado en espiral Desal DK a aproximadamente 500 psi de presión y a una temperatura de 40-60 grados centígrados. El fraccionamiento descrito en la etapa 34 también podría lograrse mediante cromatografía secuencial de lecho móvil simulado (SSMB). La filtración por membrana produce un permeado 36 (es decir, componentes que pasan a través de la membrana) que comprende principalmente monosacáridos y un retenido 38 (es decir, componentes rechazados por la membrana) que comprende principalmente oligosacáridos. ("Principalmente", tal como se usa en el presente documento, significa que la composición contiene más del componente enumerado que de cualquier otro componente sobre una base de sólidos secos). El permeado 36 se puede combinar con la corriente de monómero 30 (por ejemplo, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa). El permeado es una corriente rica en monosacáridos y el retenido es una corriente rica en oligosacáridos. En otras palabras, la nanofiltración concentra los oligosacáridos en el retenido y los monosacáridos en el permeado, en relación con la alimentación de nanofiltración.

El retenido 38, que se puede describir como un jarabe de oligosacáridos 40, puede tener un contenido suficientemente alto de oligosacáridos que son de digestión lenta (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 % en peso d.s.b., o en algunos casos al menos aproximadamente 90 %) para que pueda secarse o simplemente evaporarse hasta obtener un jarabe concentrado y usarse como ingrediente en los alimentos. Sin embargo, en muchos casos, será útil seguir procesando y purificando esta composición. Tal purificación puede incluir uno o más de las siguientes etapas. (Aunque la figura 9 muestra cuatro de tales etapas de purificación 42, 44, 46 y 48 como alternativas, debe entenderse que dos o más de estas etapas podrían usarse en el proceso).

El jarabe de oligómeros 40 se puede someter a otro fraccionamiento 42, como una filtración por membrana, por ejemplo, una segunda nanofiltración, para eliminar al menos una parte de los monosacáridos residuales, como la fructosa y la dextrosa. Las condiciones y el equipo de nanofiltración adecuados son los descritos anteriormente. Esta nanofiltración produce un permeado, que es una segunda corriente rica en monosacáridos, que se puede combinar con la corriente de monómeros 30. Alternativamente, el fraccionamiento adicional 42 podría realizarse mediante separación cromatográfica, por ejemplo, mediante cromatografía de lecho mixto simulada.

El jarabe 41 puede isomerizarse 44 poniéndolo en contacto con una enzima como la dextrosa isomerasa. Esto convertirá al menos parte de la dextrosa residual presente en fructosa, que puede ser más valiosa en ciertas situaciones.

El jarabe se puede tratar con una enzima o un ácido para provocar la reversión o repolimerización 46, en la que al menos algunos de los monosacáridos que aún están presentes se unen covalentemente a otros monosacáridos u oligosacáridos, lo que reduce aún más el contenido de monómero residual del jarabe. Las enzimas adecuadas para usar en este etapa incluyen glucosidasas, tales como amilasa, glucoamilasa, transglucosidasa y pululanasa. Las enzimas de celulasa pueden producir productos de reversión valiosos para algunas aplicaciones.

El jarabe se puede hidrogenar 48 para convertir al menos algunos de los monosacáridos residuales en los alcoholes correspondientes (por ejemplo, para convertir la dextrosa en sorbitol). Cuando la hidrogenación se incluye en el proceso, normalmente (pero no necesariamente) será la etapa final de purificación.

El jarabe de oligómero purificado 49 producido por uno o más de las etapas de purificación anteriores se puede decolorar 50. La decoloración se puede realizar mediante tratamiento con carbón activado seguido de microfiltración, por ejemplo. En los sistemas de flujo continuo, las corrientes de jarabe se pueden bombear a través de columnas llenas de carbón activado granular para lograr la decoloración. Luego, el jarabe de oligómero decolorado se puede evaporar 52, por ejemplo, hasta aproximadamente más de aproximadamente 70 % de sólidos secos (d.s.), dando un producto que comprende un alto contenido de oligosacáridos (por ejemplo, más del 90 % en peso d.s.b., y en algunos casos superior a aproximadamente 95 %) y un contenido de monosacáridos correspondientemente bajo. El producto comprende una pluralidad de sacáridos que son digeridos lenta o incompletamente por humanos, si no totalmente indigeribles. Estos azúcares pueden incluir isomaltosa, panosa y oligómeros ramificados que tienen un grado de polimerización de cuatro o más.

Las condiciones del proceso se pueden modificar para recuperar la mayor parte de la maltosa en la alimentación, ya sea en las corrientes ricas en monómeros (30, 36) o en la corriente del producto oligómero. Por ejemplo, una membrana de nanofiltración con poros ligeramente más grandes, como Desal DL, que funciona a menos de 500 psi de presión, se puede usar para aumentar la cantidad de maltosa en corrientes ricas en monómeros.

- 5 Lentamente digerible, como se usa el término en el presente documento, significa que uno o más carbohidratos no se digieren en absoluto en el estómago y el intestino delgado humanos, o solo se digieren de forma limitada. Se pueden realizar pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* para estimar la tasa y el alcance de la digestión de carbohidratos en humanos. El "Englyst Assay" es una prueba enzimática *in vitro* que se puede usar para estimar las cantidades de un ingrediente carbohidrato que son de digestión rápida, de digestión lenta o resistentes a la digestión (European Journal of Clinical Nutrition (1992) Volumen 46 (Suplemento 2), páginas S33-S50). Por lo tanto, cualquier referencia en el presente documento a "al menos aproximadamente 50 % en peso sobre una base de sólidos secos" de un material que sea "de digestión lenta" significa que la suma de los porcentajes de ese material que se clasifican como de digestión lenta o resistentes según el Englyst el ensayo totaliza al menos aproximadamente 50 %. Los términos "oligosacáridos" y "oligómeros de sacáridos" se usan en el presente documento para referirse a sacáridos que comprenden al menos dos unidades de sacáridos, por ejemplo, sacáridos que tienen un grado de polimerización ("DP") de aproximadamente 2-30. Por ejemplo, un disacárido tiene un DP de 2.
- 10 20 Las enzimas gastrointestinales reconocen y digieren fácilmente los carbohidratos en los que las unidades de dextrosa están enlazadas alfa (1→4) (enlaces "lineales"). Reemplazar estos enlaces con enlaces alternativos (alfa (1→3), alfa (1→6) (enlaces "no lineales") o enlaces beta, por ejemplo) reduce en gran medida la capacidad de las enzimas gastrointestinales para digerir el carbohidrato. Esto permitirá que los carbohidratos pasen al intestino delgado prácticamente sin cambios. En ciertas realizaciones de los usos y composiciones que se describen en el presente documento, la fibra de maíz soluble comprende una cantidad menor (es decir, menos del 50 % en peso sobre una base de sólidos secos y, por lo general, una concentración mucho más baja, por ejemplo, menos del 40 % en peso, menos del 30% en peso) de monosacáridos residuales. En algunas realizaciones como se describe en el presente documento, al menos aproximadamente 50 % en peso sobre una base de sólidos secos de la composición del producto es de digestión lenta. Los procesos descritos con respecto a las Patentes U.S. n.º 7.608.436, y 8.057.840 puede incluir la etapa adicional de eliminar al menos algunos de los monosacáridos residuales (y opcionalmente también otras especies) de la composición del producto mediante filtración por membrana, fraccionamiento cromatográfico o digestión mediante fermentación. Los monosacáridos separados se pueden combinar con otras corrientes de proceso, por ejemplo, para la producción de dextrosa o jarabe de maíz. Alternativamente, los monosacáridos separados se pueden reciclar en la composición de alimentación.
- 15 25 30 35 40 45 50 En ciertas realizaciones de los usos y composiciones que se describen en el presente documento, la fibra de maíz soluble comprende una cantidad principal (por ejemplo, superior a aproximadamente 50 %, superior a aproximadamente 60 % o superior a aproximadamente 70 %) sobre una base de sólidos secos de oligómeros de sacáridos de estructura lineal y no lineal, y en los que la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales es mayor que la concentración de oligómeros de sacáridos lineales, y en los que la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales que tienen un grado de polimerización de al menos tres es al menos aproximadamente 20 % en peso sobre una base de sólidos secos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales en la composición es al menos el doble que la concentración de oligómeros de sacáridos lineales. En determinadas realizaciones, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales que tienen un grado de polimerización de al menos tres es de al menos aproximadamente 25 % en peso sobre una base de sólidos secos. En ciertas realizaciones, la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales que tienen un grado de polimerización de al menos tres es al menos aproximadamente 30 % en peso, o incluso al menos el 50 % en peso, en base a sólidos secos. En determinadas realizaciones, en las que la concentración de oligómeros de sacáridos no lineales es de al menos aproximadamente 90 % en peso sobre la base de sólidos secos, y la concentración de isomaltosa es de al menos aproximadamente 70 % en peso sobre la base de sólidos secos.
- 55 60 En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra a una tasa de al menos aproximadamente 3 g/día. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad de al menos 5 g/día, al menos 7 g/día, al menos 10 g/día, al menos 12 g/día, al menos aproximadamente 13 g/día, al menos aproximadamente 15 g/día, o incluso al menos aproximadamente 20 g/día y no más de aproximadamente 100 g/día, o no más de 75 g/día. Específicamente, la tolerancia gastrointestinal clínicamente relevante se ha establecido en 65 g/día cuando se distribuye en 12 horas (un día normal de alimentación) y/o en 40 g/día de bolo agudo. Ambas son dosis bien toleradas. Por consiguiente, en ciertas realizaciones de este tipo, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad de no más de aproximadamente 65 g durante 12 horas, y/o no más de aproximadamente 40 g en un solo bolo.
- 65 Por ejemplo, en determinadas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad en el intervalo de aproximadamente 3 g/día a aproximadamente 100 g/día. En otras realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad en el intervalo de aproximadamente 10 g/día a aproximadamente 100 g/día, o

aproximadamente 12 g/día a aproximadamente 100 g/día. En otras realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 65 g/día, aproximadamente 5 a aproximadamente 40 g/día, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 g/día, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 g/día, aproximadamente 10 a aproximadamente 65 g/día, aproximadamente 10 a aproximadamente 40 g/día, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 g/día, aproximadamente 15 a aproximadamente 65 g/día, aproximadamente 15 a aproximadamente 40 g/día, aproximadamente 15 a aproximadamente 30 g/día, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 g/día, aproximadamente 7 a aproximadamente 15 g/día, aproximadamente 9 a aproximadamente 15 g/día, o aproximadamente 10 a aproximadamente 15 g/día, aproximadamente 12 a aproximadamente 20 g/día, aproximadamente 13 a aproximadamente 20 g/día, aproximadamente 14 a aproximadamente 20 g/día, aproximadamente 15 a aproximadamente 20 g/día, aproximadamente 16 a aproximadamente 20 g/día, aproximadamente 17 a aproximadamente 20 g/día, aproximadamente 18 a aproximadamente 20 g/día, o aproximadamente 19 a aproximadamente 20 g/día. En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritas en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad de aproximadamente 5 g/día, aproximadamente 6 g/día, aproximadamente 7 g/día, aproximadamente 8 g/día, aproximadamente 9 g/día, o aproximadamente 10 g/día. En otras realizaciones de los usos y composiciones descritas en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad en el intervalo de aproximadamente 11 a aproximadamente 20 g/día. En otras realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra a una velocidad de aproximadamente 11 g/día, o aproximadamente 12 g/día, o aproximadamente 13 g/día, o aproximadamente 14 g/día, o aproximadamente 15 g/día, o aproximadamente 16 g/día, o aproximadamente 17 g/día, o aproximadamente 18 g/día, o aproximadamente 19 g/día, o aproximadamente 20 g/día.

En un día determinado, la administración se puede dividir en cualquier número de dosis. Por ejemplo, en una realización de los usos y composiciones descritos en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra una vez al día (por ejemplo, en una sola porción). En otras realizaciones de los usos y composiciones descritas en el presente documento, la fibra de maíz soluble se administra una pluralidad de veces al día, por ejemplo, dos veces al día o tres veces al día (por ejemplo, en una pluralidad de porciones, por ejemplo, en dos porciones o en tres raciones al día). Cuando se va a utilizar una pluralidad de administraciones o porciones, las cantidades por día descritas anteriormente se pueden dividir entre el número de administraciones o porciones para proporcionar cantidades aceptables por porción que sean bien toleradas (es decir, no cause hinchazón severa, flatulencia, ruidos estomacales, calambres abdominales, diarrea, náuseas y/o vómitos).

En otro aspecto que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación proporciona un método para aumentar la absorción de minerales (por ejemplo, calcio, hierro, zinc, cobre, potasio y/o magnesio) en un sujeto, donde el método incluye la administración oral al sujeto una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble. En ciertos ejemplos de este tipo que no forman parte de la invención reivindicada, el mineral para el que se incrementa la absorción es un mineral, tal como, por ejemplo, calcio y/o hierro. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el mineral se absorbe como un catión divalente. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el mineral es calcio. En otros ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el mineral es calcio y/o magnesio. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el mineral es calcio y/o hierro. En otros ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, el mineral es calcio, magnesio y/o hierro. La administración puede, en ciertas realizaciones, ser como se describe en el presente documento.

En otro ejemplo que no forma parte de la invención reivindicada, la descripción proporciona un método para aumentar una o más poblaciones de bacterias colónicas y aumentar la absorción de minerales (por ejemplo, calcio, hierro, zinc, cobre, potasio y/o magnesio) en un sujeto, donde el método incluye la administración oral de una fibra soluble fermentable, por ejemplo, fibra de maíz soluble. La administración puede, en ciertos ejemplos, ser como se describe en el presente documento.

En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta al menos aproximadamente 3 % en comparación con un sujeto no tratado. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta en al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos 9 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 11 %, al menos aproximadamente 12 %, al menos aproximadamente 13 %, o al menos aproximadamente 14 %, o al menos aproximadamente 15 %, en comparación con el sujeto no tratado. En otros ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta al menos aproximadamente 20 %, o al menos aproximadamente 25 % en comparación con un sujeto no tratado. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta al menos aproximadamente 20 %, o al menos aproximadamente 25 % en comparación con un sujeto no tratado. En ciertos ejemplos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta al menos aproximadamente 20 %, o al menos aproximadamente 25 % en comparación con un sujeto no tratado.

calcio aumenta al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 % o al menos aproximadamente 35 % en comparación con un sujeto no tratado. En ciertos ejemplos de este tipo que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta no más de aproximadamente 200 % en comparación con un sujeto no tratado. En otros ejemplos de este tipo que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta no más de aproximadamente 100 % en comparación con un sujeto no tratado. En otros ejemplos de este tipo que no forman parte de la invención reivindicada, la absorción de calcio aumenta no más de aproximadamente 50 % en comparación con un sujeto no tratado. El tiempo para la absorción de calcio puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 24-48 h, por ejemplo, a las 36 h o las 48 h.

- 5 10 En ciertas realizaciones de los usos y composiciones descritos en el presente documento, el sujeto es un mamífero. En una realización de los usos y composiciones descritos en el presente documento, el sujeto es un ser humano, por ejemplo, un ser humano no adulto (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2 años a aproximadamente 20 años, o aproximadamente 13 años a aproximadamente 19 años), o un ser humano mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 45 años, al menos aproximadamente 50 años, al menos aproximadamente 60 años, al menos aproximadamente 70 años, al menos aproximadamente 80 años o incluso al menos aproximadamente 90 años, especialmente una mujer humana mayor).
- 15

20 Se prevé que los efectos del aumento de una o más poblaciones de bacterias del colon se relacionen tanto con seres humanos como con animales y, por tanto, puedan aplicarse a productos alimenticios y piensos para animales. Los animales no humanos representativos incluyen ganado, como caballos, pollos, pavos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, llamas y bisontes, gatos y perros, roedores, conejos, hámsteres y pájaros.

25 30 La administración se puede realizar durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, en el transcurso de al menos aproximadamente una semana, en el transcurso de al menos aproximadamente dos semanas, de al menos aproximadamente tres semanas en el transcurso de al menos aproximadamente cuatro semanas, de al menos aproximadamente siete semanas o incluso durante el transcurso de al menos aproximadamente 52 semanas. La persona con experiencia ordinaria en la técnica que, en dichas administraciones a largo plazo, se pueden "perder" días de administración; deseablemente, el número de días perdidos es inferior a aproximadamente 10 % del número total de días durante los cuales se realiza la administración.

35 40 Otra realización de la invención es una composición comestible que incluye al menos aproximadamente 2,5 g de fibra de maíz soluble por porción. Por ejemplo, ciertas realizaciones de composiciones comestibles como se describe en el presente documento incluyen al menos aproximadamente 3 g, al menos aproximadamente 4 g, al menos aproximadamente 5 g, al menos aproximadamente 6 g, al menos aproximadamente 8 g, al menos aproximadamente 10 g, o incluso al menos aproximadamente 20 g de fibra de maíz soluble, por porción. En ciertas de tales realizaciones, la composición comestible incluye no más de 100 g, no más de aproximadamente 50 g, o incluso no más de aproximadamente 40 g de fibra de maíz soluble por porción. Las composiciones comestibles pueden, por ejemplo, proporcionarse como composiciones alimenticias como se describe a continuación. En otras realizaciones, se proporciona una composición comestible como complemento nutricional. Tales composiciones comestibles pueden ser útiles para realizar los usos descritos en el presente documento.

45 50 En ciertas realizaciones de las composiciones que se describen en el presente documento, el tamaño de la ración puede ser, por ejemplo, de al menos 75 g, al menos aproximadamente 150 g o incluso de al menos aproximadamente 200 g. En determinadas realizaciones, el tamaño de la ración no supera aproximadamente 1000 g, o incluso no supera aproximadamente 500 g. Por ejemplo, en una realización, el tamaño de la porción está en el intervalo de aproximadamente 75 ml a aproximadamente 1000 ml. En determinadas realizaciones, cada ración se envasa por separado. En otras realizaciones, las porciones múltiples se envasan juntas y se proporcionan con instrucciones relacionadas con el tamaño de la porción y/o la cantidad de fibra de maíz soluble por porción, como se describe en el presente documento.

55 60 Otra realización de la invención es una composición comestible que incluye fibra de maíz soluble, en una cantidad de al menos aproximadamente 2,5 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, como mínimo al menos aproximadamente 30 %, o incluso al menos aproximadamente 40 % en peso. Sin embargo, en ciertas realizaciones de este tipo, la composición comestible tiene una cantidad máxima de fibra de maíz soluble, que no supera aproximadamente 75 %, o incluso no supera aproximadamente 50 % en peso. Las composiciones comestibles pueden, por ejemplo, proporcionarse como composiciones alimenticias como se describe a continuación. Las composiciones comestibles pueden, por ejemplo, proporcionarse con los tamaños de porción y/o las cantidades de fibra de maíz soluble por porción como se describe en el presente documento.

65 Otra realización de la invención es una composición comestible que incluye una o más (por ejemplo, dos o más, o tres o más) poblaciones bacterianas seleccionadas de los géneros *Butyricoccus* y *Oscilibacter*. Una o más de las poblaciones bacterianas pueden, por ejemplo, actuar como probióticos. Las composiciones comestibles de la invención incluyen fibra de maíz soluble (por ejemplo, en la cantidad descrita anteriormente). También se describen en el presente documento composiciones comestibles que no incluyen una fibra soluble fermentable y, por lo tanto,

no forman parte de la invención reivindicada. Tales realizaciones pueden ser útiles, por ejemplo, para la adición o coadministración con composiciones que incluyen fibras solubles fermentables, de modo que las poblaciones bacterianas de la composición comestible estén presentes en el colon al mismo tiempo que la fibra soluble fermentable.

- 5 En realizaciones de las composiciones comestibles descritas en el presente documento, la composición comestible incluye una o más (por ejemplo, dos o más, o tres o más) poblaciones bacterianas, cada una de un género (por ejemplo, cada una de un género diferente) seleccionadas del grupo que consta de *Butyricicoccus* y *Oscilibacter*, y combinaciones de estos. Por ejemplo, un ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Parabacteroides*. Por ejemplo, una realización de las composiciones comestibles descritas en el presente documento incluye una población de *Butyricicoccus*. Otra realización de las composiciones comestibles descritas en el presente documento incluye una población de *Oscilibacter*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Dialister*. Por ejemplo, ciertas realizaciones de las composiciones comestibles descritas en el presente documento incluyen poblaciones de *Butyricicoccus* y *Oscilibacter*. Por ejemplo, un ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye poblaciones de *Parabacteroides* y *Dialister*.
- 10 En otros ejemplos de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la composición comestible incluye una o más (por ejemplo, dos o más, o tres o más) poblaciones de bacterias, cada una de un género (por ejemplo, cada una de un género diferente), género seleccionados del grupo formado por *Bacteroides*, y *Dialister*, y combinaciones de estos. Por ejemplo, un ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Bacteroides*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Dialister*. Por ejemplo, un ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye poblaciones de *Bacteroides* y *Dialister*.
- 15 En otros ejemplos de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la composición comestible incluye una o más (por ejemplo, dos o más, o tres o más) poblaciones de bacterias, cada una de un género (por ejemplo, cada una de un género diferente) seleccionados del grupo formado por *Parabacteroides*, *Bifidobacterium*, *Alistipes*, *Anaerococcus*, *Catenibacterium*, géneros dentro del orden Clostridiales (por ejemplo, no *Clostridium*, *Anaerofustis*, *Anaerococcus*, *Coprococcus*, *Peptostreptococcaceae*, *Sporacetigenium*); y géneros dentro de la familia Ruminococcaceae y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, un ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Parabacteroides*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Bifidobacterium*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Alistipes*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Anaerococcus*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Catenibacterium*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de Ruminococcaceae. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de Clostridiales. Por ejemplo, ciertos ejemplos de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye poblaciones de *Parabacteroides* y *Bifidobacterium*; *Parabacteroides* y *Alistipes*; *Parabacteroides* y *Anaerococcus*; *Parabacteroides* y *Catenibacterium*; *Parabacteroides* y Ruminococcaceae; *Parabacteroides* y Clostridiales; *Bifidobacterium* y *Alistipes*; *Bifidobacterium* y *Anaerococcus*; *Bifidobacterium* y *Catenibacterium*; *Bifidobacterium* y Ruminococcaceae; *Bifidobacterium* y Clostridiales; *Alistipes* y *Anaerococcus*; *Alistipes* y *Catenibacterium*; *Alistipes* y Ruminococcaceae; *Anaerococcus* y *Catenibacterium*; *Anaerococcus* y Ruminococcaceae; *Anaerococcus* y Clostridiales; *Catenibacterium* y Ruminococcaceae; *Catenibacterium* y Clostridiales; *Ruminococcaceae* y Clostridiales; *Parabacteroides*, *Bifidobacterium* y *Alistipes*; *Parabacteroides*, *Bifidobacterium* y *Catenibacterium*; *Parabacteroides*, *Bifidobacterium* y Clostridiales; *Parabacteroides*, *Bifidobacterium* y Ruminococcaceae; *Parabacteroides*, *Alistipes* y *Anaerococcus*; *Parabacteroides*, *Alistipes* y *Catenibacterium*; *Parabacteroides*, *Alistipes* y Clostridiales; *Parabacteroides*, *Alistipes* y Ruminococcaceae; *Parabacteroides*, *Anaerococcus* y *Catenibacterium*; *Parabacteroides*, *Anaerococcus* y Clostridiales; *Parabacteroides*, *Anaerococcus* y Ruminococcaceae; *Parabacteroides*, *Catenibacterium* y Clostridiales; *Parabacteroides*, *Catenibacterium* y Ruminococcaceae; *Parabacteroides*, *Clostridiales* y Ruminococcaceae; *Bifidobacterium*, *Alistipes* y *Anaerococcus*; *Bifidobacterium*, *Alistipes* y *Catenibacterium*; *Bifidobacterium*, *Alistipes* y Clostridiales; *Bifidobacterium*, *Anaerococcus* y *Catenibacterium*; *Bifidobacterium*, *Anaerococcus* y Clostridiales; *Bifidobacterium*, *Anaerococcus* y Ruminococcaceae; *Bifidobacterium*, *Catenibacterium* y Clostridiales; *Bifidobacterium*, *Catenibacterium* y Ruminococcaceae; *Bifidobacterium*, *Clostridiales* y Ruminococcaceae; *Alistipes*, *Anaerococcus* y *Catenibacterium*; *Alistipes*, *Anaerococcus* y Clostridiales; *Alistipes*, *Anaerococcus* y Ruminococcaceae; *Alistipes*,

En otros ejemplos de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada, la composición comestible incluye una o más (por ejemplo, dos o más, o tres o más) poblaciones de bacterias, cada una de un género (por ejemplo, cada una de un género diferente) seleccionados del grupo formado por *Parabacteroides*, *Dialister*, *Akkermansia*, y géneros dentro de la familia Lachnospiraceae (por ejemplo, no *Lachnospira*). Por ejemplo, un ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Parabacteroides*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Dialister*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de *Akkermansia*. Otro ejemplo de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluye una población de Lachnospiraceae. Por ejemplo, ciertos ejemplos de las composiciones comestibles descritas en el presente documento que no forman parte de la invención reivindicada incluyen poblaciones de *Parabacteroides* y *Dialister*, *Parabacteroides* y *Akkermansia*; *Parabacteroides* y Lachnospiraceae; *Dialister* y *Akkermansia*; *Dialister* y Lachnospiraceae; *Akkermansia* y Lachnospiraceae; *Parabacteroides*, *Dialister*, y *Akkermansia*; *Parabacteroides*, *Dialister*, y Lachnospiraceae; *Parabacteroides*, *Akkermansia*, y Lachnospiraceae; *Dialister*, *Akkermansia*, y Lachnospiraceae; o *Parabacteroides*, *Dialister*, *Akkermansia*, y Lachnospiraceae.

Por supuesto, como apreciará el experto en la materia, las composiciones comestibles que incluyen combinaciones específicas de poblaciones de bacterias como se describe en el presente documento pueden incluir además otras poblaciones de bacterias, ya sea como se describe en otro lugar en el presente documento o de otra manera. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir además una o más poblaciones de bacterias seleccionadas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

Las composiciones comestibles pueden, por ejemplo, proporcionarse como composiciones alimenticias como se describe a continuación. En otras realizaciones, se proporciona una composición comestible como complemento nutricional. En aún otras realizaciones, se proporciona una composición comestible como ingrediente para mezclar con una composición alimenticia, por ejemplo, durante el procesamiento o cocción, o en el momento de servir o comer. Las composiciones comestibles pueden, por ejemplo, proporcionarse con la fibra de maíz soluble, las concentraciones, los tamaños de las porciones y/o las cantidades de fibra de maíz soluble, por porción, como se describe en el presente documento. El experto en la técnica puede ajustar la cantidad de poblaciones bacterianas añadidas a la composición para satisfacer la necesidad deseada. En general, cada una de las poblaciones bacterianas puede estar en la cantidad de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{10} CFU (unidad formadora de colonias). En ciertas realizaciones, cada una de las poblaciones bacterianas está en una cantidad de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{10} CFU, o aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} CFU, o aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{10} CFU, o aproximadamente 1×10^8 a

aproximadamente 1×10^{10} CFU, o aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^8 CFU, o aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^8 CFU, o aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^8 CFU, o aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^8 CFU, o aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^7 CFU, o aproximadamente 1×10^4 CFU, o aproximadamente 1×10^5 CFU, o aproximadamente 1×10^6 CFU, o aproximadamente 1×10^7 CFU o aproximadamente 1×10^8 CFU, o aproximadamente 1×10^9 CFU, o aproximadamente 1×10^{10} CFU.

Otra realización de la invención es una composición comestible como se describe anteriormente de acuerdo con la presente invención que además incluye una o más especies minerales. Cada especie mineral puede ser, por ejemplo, una especie mineral divalente, o una especie seleccionada de una especie de calcio, una especie de magnesio, una especie de cobre, una especie de potasio, una especie de zinc y una especie de hierro. Por ejemplo, en una realización, la composición comestible incluye calcio. En otra realización, la composición comestible incluye calcio y/o magnesio. En otra realización, la composición comestible incluye calcio, magnesio y/o hierro. Las especies minerales se pueden proporcionar, por ejemplo, como una sal, como una sal de carbonato, una sal de haluro o una sal de bicarbonato. El calcio, por ejemplo, se puede proporcionar como, por ejemplo, carbonato de calcio o gluconato de calcio. El mineral (por ejemplo, el calcio) se puede proporcionar, por ejemplo, en una cantidad de al menos aproximadamente 50 mg por dosis o porción, al menos aproximadamente 100 mg por dosis o porción, al menos aproximadamente 250 mg por dosis o porción, en al menos aproximadamente 500 mg por dosis o porción, o incluso al menos aproximadamente 1000 mg por dosis o porción. En ciertas realizaciones de este tipo, el calcio se incluye en menos de aproximadamente 2000 mg por dosis o porción o incluso menos de aproximadamente 1000 mg por dosis o porción. Las composiciones comestibles pueden, por ejemplo, proporcionarse como composiciones alimenticias como se describe a continuación. En otras realizaciones, se proporciona una composición comestible como complemento nutricional. Las composiciones comestibles pueden, por ejemplo, proporcionarse con la fibra de maíz soluble, las concentraciones, los tamaños de las porciones y/o las cantidades de fibra de maíz soluble, por porción, como se describe en el presente documento.

En otras realizaciones, la composición de la divulgación no incluye una especie mineral como se describe anteriormente.

Otra realización de la invención es una composición comestible como se describe anteriormente de acuerdo con la presente invención que además incluye uno o más prebióticos adicionales. Los ejemplos de prebióticos incluyen, pero no se limitan a, inulina, lactulosa, fructooligosacárido, manooligosacárido, arabinogalactano de alerce, xiloooligosacárido, polidextrosa y tagatosa. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona composiciones comestibles como se describe anteriormente, en las que el prebiótico está en el intervalo de 0,025 g a 10 g. En ciertas realizaciones, el prebiótico está en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 g, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 g, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 g, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 g, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 g, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 g, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 g, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 g, o de aproximadamente 0,05 g, o de aproximadamente 0,1 g, o de aproximadamente 1 g, o de aproximadamente 2 g o de aproximadamente 5 g, o de aproximadamente 8 g, o de aproximadamente 10 g.

En una realización, la composición de la divulgación no incluye uno o más prebióticos adicionales como se describe anteriormente. Por ejemplo, en una realización, las composiciones de la descripción no incluyen uno o más de los prebióticos seleccionados del grupo que consiste en inulina, lactulosa, fructooligosacárido, manooligosacárido, arabinogalactano de alerce, xiloooligosacárido, polidextrosa y tagatosa. En otra realización, las composiciones de la divulgación no incluyen inulina. En otra realización más, las composiciones de la divulgación no incluyen pululano.

Opcionalmente, una composición comestible o una composición alimenticia también puede incluir sacáridos y/o polisacáridos nutritivos o no nutritivos adicionales. En una realización, la composición comestible comprende sorbitol, pululano o una combinación de estos. El sorbitol aporta aproximadamente 60 % del dulzor del azúcar a los alimentos, pero con una reducción significativa del contenido calórico (2,6 frente a 4,0 kcal/g, Livesay) y con una respuesta glucémica insignificante. La goma de pululano es un carbohidrato de digestión lenta que proporciona una respuesta glucémica relativa del 50 % en humanos en comparación con los carbohidratos de digestión rápida, pero puede proporcionar un contenido calórico similar al del azúcar en los alimentos.

En una realización, el producto alimenticio comprende aproximadamente 50-99 % de fibra de maíz soluble, 0-50 % de fructosa, 0-33 % de pululano y 0-33 % de sorbitol, siempre que la concentración de al menos uno de fructosa, pululano o sorbitol es al menos 1 %. (Todos estos porcentajes son en peso). En otra realización, el producto alimenticio comprende aproximadamente 60-80 % de fibra de maíz soluble, 1-20 % de fructosa, 0-20 % de pululano y 0-20 % de sorbitol. En otra realización más, el producto alimenticio comprende aproximadamente 65-75% de fibra de maíz soluble, 5-15% de fructosa, 5-15% de pululano y 5-15% de sorbitol. En realizaciones que comprenden un edulcorante de alta intensidad, la concentración de ese ingrediente puede ser de aproximadamente 0,001-0,5%.

La composición comestible o composición alimenticia opcionalmente también puede contener almidón resistente u

otras fuentes de fibra.

Como apreciará el experto en la materia, las composiciones descritas en el presente documento se pueden utilizar en la práctica de los métodos descritos en otro lugar del presente documento.

5 Los términos "comestible" y "composición comestible" se utilizan en el presente documento en un sentido amplio para incluir una variedad de sustancias que pueden ser ingeridas por humanos, como alimentos, bebidas y formas de dosificación de suplementos medicinales y nutricionales, como jarabes, polvos, cápsulas o tabletas. Los términos "alimento" y "composición alimenticia" se usan de manera más restringida para referirse a alimentos y bebidas e ingredientes para los mismos. Las composiciones alimenticias adecuadas pueden estar en una variedad de formas que incluyen, entre otras, alimentos horneados, cereales para el desayuno, productos lácteos, productos de soya, dulces, mermeladas y jaleas, bebidas (en polvo y/o líquidas), batidos, rellenos, yogures (yogures lácteos y no lácteos), kéfires, snacks extruidos y en láminas, postres de gelatina, barritas de aperitivos, barritas sustitutivas de comidas y energéticas, queso y salsas de queso (quesos lácteos y no lácteos), películas comestibles y solubles en agua, sopas, jarabes, edulcorantes de mesa, suplementos nutricionales, salsas, aderezos, cremas, glaseados, helados, coberturas, alimentos para mascotas, tortillas, carne y pescado, frutos secos, alimentos para bebés y niños pequeños, y rebozados y empanados.

10 20 Con el fin de hacer que el producto alimenticio sea adecuado para su uso como potenciador del sabor en las composiciones alimenticias, en muchos casos será deseable que también incluya sabores naturales y artificiales. Los ejemplos adecuados de tales sabores incluyen manzana, cítricos, uva, naranja, cereza, limón, lima, vainilla, melocotón, mantequilla de maní, piña, granada, arándano, frambuesa, mora, jazmín, lavanda, menta, fresa, plátano, mango, fruta de la pasión, fruta del dragón, kiwi, chocolate, arce, ron, mantequilla y combinaciones de estos.

15 25 En ciertas realizaciones, la composición comestible está en forma de polvo aglomerado, por ejemplo, como los que se usan para hacer bebidas en polvo y suplementos nutricionales.

30 35 Para hacer que el producto alimenticio sea adecuado para su uso como composición edulcorante en alimentos, en muchos casos será deseable que incluya también un edulcorante de alta intensidad no nutritivo. Los ejemplos adecuados de tales edulcorantes de alta intensidad no nutritivos incluyen, pero no se limitan a, sucralosa, acesulfamo de potasio, aspartamo, fruta del monje, Stevia y combinaciones de estos.

40 45 El experto en la materia apreciará que la fibra de maíz soluble se puede proporcionar en cualquiera de varias formas físicas diferentes, como polvo, polvo aglomerado, jarabe o sólidos concentrados de jarabe. En una realización, la fibra soluble está en forma de partículas. Las partículas pueden mantenerse unidas por un aglutinante, tal como una composición aglutinante que comprende una cantidad mayoritaria de maltodextrina. Una aglomeración de partículas puede tener ventajas en términos de velocidad de disolución y dispersión. Esto puede ser útil en aplicaciones donde son importantes una disolución más rápida y menores tasas de cizallamiento de mezcla, como el reemplazo de azúcar de mesa, suplementos de fibra de mesa y productos de mezcla de bebidas en polvo seco para llevar.

50 55 Los aspectos adicionales adecuados para su uso en composiciones comestibles como se describe en el presente documento se describen con más detalle en Publicaciones de Solicituds de patentes U.S. n.º 2008/0292766, 2006/0210696 y 2008/0175977. En ciertas realizaciones de los métodos y composiciones descritos en el presente documento, la composición comestible está en una forma y usa ingredientes adicionales como se describe en un aspecto o realización de Publicación de Solicitud de patente U.S. n.º 2008/0292766, 2006/0210696 o 2008/0175977. Ciertos aspectos de la invención se describen adicionalmente con respecto a los estudios experimentales que se describen a continuación.

Ejemplo 1

Sujetos y métodos

Sujetos

60 65 55 Quince niños de 13 a 15 años y 9 niñas de 12 a 14 años participaron en estos estudios metabólicos. Se utilizaron cuestionarios de detección para determinar la elegibilidad en función de un breve historial médico, la edad de maduración, la actividad física y la ingesta dietética habitual evaluada con un registro de dieta de 6 días. Los criterios de exclusión incluyeron función hepática o renal anormal, trastornos de malabsorción, anemia, tabaquismo, antecedentes de medicamentos que influyen en el metabolismo del calcio (esteroides, diuréticos tiazídicos), peso corporal fuera del 5-95^{mo} Percentil de IMC para la edad, consumo regular de drogas ilegales, medicamentos sin receta o cualquier tipo de anticonceptivos y embarazo. A los sujetos no se les permitió tomar suplementos nutricionales mientras participaban en estos estudios y se les pidió que descontinuaran su uso antes de venir al campamento.

Diseño del estudio

Este estudio, diseñado para tener un entorno de campamento de verano, estuvo compuesto por dos estudios de equilibrio de 3 semanas separados por un período de lavado de 7 días. Este ensayo utilizó un diseño cruzado doble ciego en el que los participantes recibieron dos tratamientos en orden aleatorio, 12 g de fibra de maíz soluble o placebo.

5

Dietas

Se proporcionaron dietas controladas a lo largo de ambas sesiones de campamento y contenían alimentos que normalmente comen los niños adolescentes, como espaguetis, hamburguesas, sándwiches y papas fritas. Los sujetos fueron asignados a uno de los cinco niveles de energía (1750, 2100, 2400, 2700 y 3000 kilocalorías) según los requisitos de energía estimados calculados utilizando las ecuaciones de Harris-Benedict. Las dietas se diseñaron para mantener el peso corporal y contener niveles constantes de nutrientes clave. La dieta controlada se proporcionó como un menú de ciclo de 4 días con 3 comidas y 2 meriendas diarias. En promedio, la dieta contenía 14 % de proteínas, 33 % de grasas, 53 % de carbohidratos, 200 UI de vitamina D, 1100 mg de fósforo, 2300 mg de sodio y 600 mg de calcio. Se incluyeron quince gramos de fibra en la dieta basal y la intervención agregó 0 o 12 g adicionales de SCF. Esto arrojó un contenido total de fibra dietética de 15 y 27 g para los tratamientos Control y SCF, respectivamente. SCF se administró en WELCH'S® snacks de frutas y repartidos en dos tomas de 0 o 6 g proporcionadas en la comida y la cena. SCF proporcionado por Tate & Lyle Health & Nutrition Sciences (Hoffman Estates, IL), contenía > 70 % de fibra dietética soluble con un grado de polimerización promedio en peso aproximado de 10 y enlaces α-1,4, α-1,6, α-1,3 y α-1,2.

10

15

20

Antropometría y Mediciones Óseas

25

30

Durante la primera sesión del campamento se tomaron medidas antropométricas que incluyeron peso, altura sentada, ancho bitrocántero, circunferencia de la cintura y circunferencia de la cadera. Se midió la altura de pie con un estadiómetro montado en la pared al comienzo de la primera sesión y se controló el peso por la mañana todos los días con una báscula digital electrónica para garantizar que el peso se mantuviera estable durante las sesiones. El contenido mineral óseo (BMC) y la densidad mineral ósea (BMD) se midieron mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) (GE Lunar, Madison, WI) durante un período de equilibrio. Se tomaron medidas óseas de todo el cuerpo, columna vertebral, antebrazo y ambas caderas.

Hormonas y Marcadores Bioquímicos del Metabolismo Óseo

35

Se tomó una extracción de sangre inicial en ayunas el primer día del campamento para la determinación de la química sanguínea general para verificar los perfiles clínicos y la salud de los participantes. Se tomó una segunda muestra en ayunas al final del campamento para medir los marcadores bioquímicos de la dinámica ósea y las hormonas relacionadas con el metabolismo del calcio y la vitamina D.

40

Recolección y análisis de muestras

45

Todas las muestras de orina y heces se recolectaron del día 1 al 21 de cada período de equilibrio y se agruparon como recolecciones de 24 horas. El contenido de calcio de las muestras de dieta, heces y orina se midió usando espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (Optima 4300 DV, Perkin Elmer Instrument) como se describió anteriormente. Todas las muestras fecales fueron congeladas y procesadas posteriormente para calcio. La orina se refrigeró y también se analizó más tarde para determinar el contenido total de calcio.

Cumplimiento

50

55

Los participantes fueron supervisados durante las actividades, las comidas y la recolección de muestras por consejeros capacitados durante 24 horas cada día. Se recogieron y registraron los alimentos no consumidos de las comidas. El cumplimiento de la recolección de orina se evaluó midiendo la creatinina excretada en la orina mediante un ensayo colorimétrico enzimático (COBAS Integra, Roche Diagnostics). El cumplimiento de la recolección fecal se evaluó mediante la recuperación de polietilenglicol (PEG) en las heces. Cada participante recibió 3 g de polietilenglicol (PEG) (E3350; Dow Chemical Co., Midland, MI) divididos en dosis de 1 g en el desayuno, el almuerzo y la cena. El porcentaje de recuperación de PEG se midió en recolecciones fecales de 24 h mediante un ensayo turbidimétrico y se utilizó como base para excluir los datos de los sujetos en el caso de un cumplimiento deficiente.

Síntomas gastrointestinales

60

La presencia de ruidos estomacales, flatulencia, hinchazón y dolor abdominal entre los sujetos se evaluó diariamente mediante un breve cuestionario. La gravedad de los síntomas gastrointestinales se evaluó diariamente mediante autoinforme utilizando una escala de 1 a 10 (0 = ninguno, 10 = muy grave) durante 18 días durante la segunda sesión de campamento.

65

Prueba de absorción de calcio fraccional

Durante la última semana de cada sesión, luego de un ayuno nocturno, los sujetos participaron en una prueba de absorción de calcio. En la mañana de la prueba, los flebotomistas insertaron catéteres y extrajeron muestras venosas de referencia de 10 ml. Inmediatamente después de la extracción de sangre, los participantes desayunaron un muffin inglés, huevos revueltos, mantequilla y mermelada. La comida contenía 150 mg de calcio (Ca) de leche al 2 % más 15 mg ^{44}Ca , un isótopo estable no radiactivo. El isótopo oral se administró en forma líquida (CaCl_2) que se añadió a la leche y se dejó equilibrar durante la noche. Después del desayuno, a los participantes no se les permitió consumir ningún alimento, pero se les permitió beber agua desionizada ad libitum. Un segundo isótopo estable, ^{43}Ca (3,5 mg), también como cloruro de calcio, se administró por vía intravenosa una hora después del consumo del desayuno y el isótopo oral. Se realizó una extracción de sangre final tres horas después de la administración de la dosis intravenosa, después de lo cual se retiraron los catéteres y se sirvió el almuerzo a los sujetos.

Cálculos de absorción y retención

Se usaron dos grupos de orina de 24 horas para medir los cambios en la absorción fraccional de calcio durante las 48 horas posteriores a la administración del isótopo de calcio. Las muestras de orina recogidas en grupos de 24 h durante dos días (0-24 h y 24-48 h) después de la prueba de absorción se analizaron para enriquecimiento de ^{44}Ca y de ^{43}Ca mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente de alta resolución (ICP-MS, Finnegan Element2, Thermo Scientific). La absorción de calcio (Ecuación 1) se calculó usando valores de enriquecimiento para calcular el exceso de Δ para ^{44}Ca y ^{43}Ca como la diferencia de muestras de 0-24 h y 24-48 h desde la línea base, dividida por la línea base. Estos valores en exceso se expresaron luego como una relación de $^{44}\text{Ca}/^{43}\text{Ca}$ en base a sus abundancias naturales y multiplicado por la cantidad de la dosis iv (mg) dividida por la dosis oral (mg).

Ecuación 1:

$$\text{Absorción Ca fraccional} = \left(\left[\left(\frac{^{44}\text{Ca } \Delta \text{ exceso}}{^{43}\text{Ca } \Delta \text{ exceso}} \right) * \left(\frac{0,02083}{0,00135} \right) \right] * \left[\frac{\text{dosis iv}}{\text{dosis oral}} \right] \right)$$

Los datos de equilibrio se usaron para calcular la retención de calcio (Ecuación 2) al restar la excreción de calcio en orina y heces de 24 h de la ingesta dietética de calcio de 24 h. Los primeros 7 días de cada estudio de 3 semanas se consideraron como un período de equilibrio para que los participantes se aclimataran a la ingesta de calcio y al tratamiento con fibra, mientras que las 2 semanas restantes actuaron como período experimental. El balance se calculó en base a la mayor cantidad posible de los 14 días de la porción experimental, siempre que permitiera que los cálculos comenzaran y terminaran en días con muestras fecales. Los períodos entre deposiciones se dividieron por el número apropiado de días. Los valores de excreción urinaria diaria de calcio utilizados en los cálculos del equilibrio se corrigieron por la variación en el momento de las recolecciones y las recolecciones incompletas ajustando el calcio urinario de 24 h para la excreción diaria de creatinina (Ecuación 3). La retención de calcio se calculó utilizando valores corregidos y no corregidos para la excreción urinaria de calcio. La absorción aparente de calcio (Ecuación 4) se determinó como la diferencia entre la ingesta de calcio y la excreción fecal de calcio, mientras que la eficiencia de absorción neta de calcio (Ecuación 5) se calculó como la ingesta menos la excreción fecal, dividida por la ingesta.

Ecuación 2:

$$\text{Retención de calcio} = \text{Ingesta Ca dietaria} - \text{Ca urinaria} - \text{Ca fecal}$$

Ecuación 3:

$$\text{Excreción Ca Orina 24h corregida} = \frac{\text{Ca Urinario 24 h (mg)}}{[\text{Creatinina 24h (mg)}/\text{Creatinina 24h prom}]}$$

Excreción para período de equilibrio (mg)]

Ecuación 4:

$$\text{Absorción Ca aparente} = \text{Ingesta Ca dietaria} - \text{Excreción Ca fecal}$$

Ecuación 5:

$$\text{Eficiencia absorción Ca neto} = \frac{\text{Ingesta Ca dietaria (mg)} - \text{Ca fecal (mg)}}{\text{Ingesta Ca dietaria}} * 100$$

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS (versión 9.2; SAS Institute, Cary, NC). Las características iniciales de mujeres y hombres se compararon mediante pruebas t. Se utilizó la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon para evaluar las diferencias en los síntomas gastrointestinales no paramétricos. Las correlaciones de Pearson se usaron para examinar las asociaciones potenciales entre el cambio en la absorción fraccional de Ca en la orina de 24-48 h (absorción en SCF menos absorción en el control) y las diferencias en el balance de calcio y el estado de la vitamina D, la antropometría inicial y las medidas de densidad ósea y fuerza. Se usó un modelo lineal general para evaluar el efecto de SCF en la absorción fraccionada de calcio. El modelo tuvo en cuenta el diseño cruzado al anidar id dentro de la secuencia como una variable de efecto aleatorio y controló la fase (primera versus segunda sesión de campamento de 3 semanas) y secuencia de tratamientos. Los datos se analizaron por separado para cada período de tiempo (0-24 h y 24-48 h). Se realizaron análisis similares para el balance de calcio. Utilizando las medias publicadas y las desviaciones estándar para la absorción fraccional de calcio informada en niños adolescentes, se determinó que un tamaño de muestra de 24 proporcionaría el poder estadístico suficiente (80 %) para ver una diferencia del 5,9 % en la absorción de calcio, suponiendo un error alfa de 0,05 y un error estándar de 0,05 desviación de 2,9 + 9,6%. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos para todas las pruebas estadísticas.

20 **Resultados**

Un total de 24 sujetos (9 niñas y 15 niños) participaron en este estudio. Tres sujetos no participaron en la prueba de absorción fraccional de calcio en ambas sesiones. Por lo tanto, se analizó la absorción fraccional de calcio en 21 sujetos. Todos los demás análisis incluyeron todos los valores de datos disponibles. Los participantes evaluados en este estudio eran étnicamente diversos con una distribución de 11 asiáticos, 6 hispanos, 1 negro y 6 adolescentes multirraciales (otros). Las características de los sujetos, incluida la edad, la antropometría, las características físicas y las medidas óseas, se dan en la Tabla 1, que presenta las medias y las desviaciones estándar para niñas y niños por separado. Las niñas y los niños tenían características físicas similares; sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en el % magro (chicas más bajas que chicos, $P = 0,009$) y % de masa grasa (niñas mayor que niños, $P = 0,01$) en esta cohorte. La ingesta habitual media de calcio y fibra dietética fue de 768 ± 403 mg/día y 12 ± 4 g/día, respectivamente.

30 Tabla 1. Características de los sujetos de referencia

	Mujeres (n = 9)	Varones (n = 15)
Edad (años)	$13,3 \pm 1,0$	$13,5 \pm 0,9$
Peso (kg)	$59,9 \pm 13,2$	$61,1 \pm 11,8$
Altura (cm) *	$157,3 \pm 4,9$	$164,9 \pm 8,2$
IMC (kg/m ²)	$24,1 \pm 4,0$	$22,4 \pm 3,1$
Percentil de IMC (%)	$80,0 \pm 16,4$	$74,7 \pm 19,2$
Promedio de puntuación de Tanner **	$3,8 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,9$
Masa magra (%) **	$61,2 \pm 5,2$	$71,1 \pm 9,5$
Grasa corporal (%)*	$35,1 \pm 5,6$	$25,1 \pm 10,0$
BMD corporal total (g/cm ²)	$1,07 \pm 0,11$	$1,04 \pm 0,11$
Cuerpo total BMC (g)	2115 ± 329	2316 ± 424
BMD total de columna (g/cm ²)	$1,09 \pm 0,13$	$1,04 \pm 0,14$
BMD del cuello femoral (g/cm ²)	$1,03 \pm 0,18$	$1,05 \pm 0,15$

35 t-prueba; Media \pm SD

*Diferencia significativa entre niños y niñas ($p < 0,05$)

**Diferencia significativa entre niños y niñas ($p < 0,01$)

35 Síntomas gastrointestinales

40 No se observaron diferencias significativas en la gravedad de los síntomas gastrointestinales, incluidos hinchazón, flatulencia, calambres abdominales y ruidos estomacales, entre los tratamientos con SCF y Control durante el período de observación de 18 días (Tabla 2).

Tabla 2. Síntomas gastrointestinales diarios medios auto informados durante 18 días en respuesta al consumo de SCF.

	Fibra de Maíz Soluble	Control
Hinchazón	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,8
Flatulencia	0,6 ± 0,8	1,1 ± 1,7
Calambres abdominales	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,7
Ruidos estomacales	0,2 ± 0,7	0,3 ± 0,9

Prueba de suma de intervalos de Wilcoxon; Media ± SD N=23 P > 0,05 para todos los parámetros Las puntuaciones se asignaron en base a una escala de 10 puntos: 0 = ninguno, 1 = muy leve y 10 = muy grave.

5 Absorción fraccional de calcio, balance de calcio y biomarcadores óseos

La absorción fraccional de calcio se basó en el análisis de los isótopos excretados en la orina recolectada entre 0-24 y 24-48 horas después de la administración del isótopo (Figura 1). En comparación con el control, la absorción fraccional media de calcio no difirió durante las primeras 24 h, pero fue significativamente mayor después del tratamiento con SCF ($0,595 \pm 0,142$ frente a $0,664 \pm 0,129$, respectivamente; $P = 0,02$) a las 24-48 h. La diferencia en la absorción fraccional media de calcio de 0,069 representa un aumento del 11,6 % en la absorción con el tratamiento con SCF. Un modelo lineal general (Figura 2) identificó efectos significativos del tratamiento a las 24-48 h ($P = 0,02$) pero no a las 0-24 h ($P = 0,09$) sobre la absorción fraccional de calcio. El tratamiento no tuvo un efecto significativo sobre la absorción neta de calcio, la eficiencia de absorción neta, la excreción fecal de calcio o la retención de calcio (Tabla 3). Ni la excreción de calcio en la orina ni en las heces se correlacionaron con la absorción fraccional de calcio. Las concentraciones de marcadores de recambio óseo se informan en la Tabla 4. No hubo diferencias en la fosfatasa alcalina sérica, el fósforo, el calcio, la hormona paratiroides, la leptina, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-1, la proteína de unión a IGF-3, la esclerostina y los enlaces cruzados de n-telopéptidos en la orina, el calcio y el fósforo resultaron del SCF consumo.

20 Tabla 3. Efecto del tratamiento con fibra de maíz soluble sobre la absorción y retención de calcio en 23 niños y niñas adolescentes

	SCF	Control	valor p
Análisis de isótopos estables			
Absorción fraccionada de calcio, 0-24h	0,522 ± 0,110	0,497 ± 0,108	0,09
Absorción fraccionada de calcio, 24-48h	0,664 ± 0,129	0,595 ± 0,142	0,02
Balance			
Ingesta de calcio (mg/d)	606 ± 29	604 ± 25	0,69
Calcio en orina (mg/d)	77 ± 56	65 ± 36	0,11
Calcio fecal (mg/d)	318 ± 108	312 ± 106	0,77
Eficiencia de absorción neta (%)	47 ± 18	48 ± 17	0,75
Retención (mg/d)	212 ± 117	227 ± 101	0,42

Modelo lineal general que incluye tratamiento, secuencia y fase Media ± SD N = 21 para valores fraccionarios de absorción de calcio

25 Tabla 4. Concentraciones de marcadores de recambio óseo en suero y orina al inicio y después del tratamiento con 0 y 12 g de SCF

Biomarcador óseo	SCF	Control	valor p
Suero			
Fosfatasa Alcalina, U/L	235,57 ± 135,45	235,00 ± 132,5	0,92
Calcio, ng/dl	10,23 ± 0,40	10,24 ± 0,40	0,72
Creatinina, ng/dl	0,85 ± 0,12	0,85 ± 0,12	0,88

Biomarcador óseo	SCF	Control	valor p
Suero			
Fósforo, ng/dl	4,76 ± 0,59	4,76 ± 0,58	0,21
Hormona paratiroides, pg/ml	21,23 ± 11,27	21,23 ± 11,02	0,82
Leptina, ng/ml	8,65 ± 7,61	8,46 ± 7,50	0,89
IGF-1,	266,81 ± 52,30	269,59 ± 52,93	0,87
Proteína de unión a IGF 3	3648,99 ± 572,71	3651,26 ± 560,23	0,46
Esclerostina, ng/ml	0,41 ± 0,17	0,41 ± 0,17	0,47
Orina			
Entrecruzamientos de N-telopéptidos, nm BCE	5378,81 ± 4632,47	5323,75 ± 4538,67	0,63
Calcio, mg/dl	3,43 ± 2,51	3,37 ± 2,47	0,69
Fósforo, mg/dl	77,85 ± 39,97	76,69 ± 39,51	0,66
Creatinina, mg/dl	90,297 ± 45,721	90,67 ± 44,75	0,56
Media ± SD			

Estado de vitamina D y absorción de calcio

El estado medio de vitamina D después de los tratamientos con SCF y Control fue de $65,2 \pm 18,8$ nM y $59,1 \pm 15,9$ nM, respectivamente, que no fueron significativamente diferentes. No se observaron asociaciones significativas entre las diferencias en 25-hidroxivitamina D y la absorción fraccional de calcio (entre 24-48 h) o la eficiencia de absorción neta.

Predictores del efecto de SCF en la absorción de calcio

La diferencia en la absorción fraccional de calcio entre los tratamientos SCF y Control en las recolecciones de orina de 24-48 h no se correlacionó con la altura ($r = 0,112, P = 0,63$), área de superficie corporal ($r = 0,012, P = 0,96$), peso ($r = -0,022, P = 0,92$), fibra dietética habitual ($r = 0,150, P = 0,54$) y calcio ($r = 0,012, P = 0,96$) ingestas, estadio de Tanner ($r = -0,131, P = 0,57$), o IMC ($r = -0,074, P = 0,75$).

Ejemplo 2

Procesamiento fecal y extracción de ADN

La composición y estructura de la comunidad microbiana en las heces se determinó en muestras recolectadas al comienzo y al final de cada sesión para cada sujeto del Ejemplo 1. Las muestras fecales congeladas se pesaron, se descongelaron a 4°C , luego se añadió agua bidestilada esterilizada (dos veces el peso de las muestras fecales) y las muestras se homogeneizaron en un Stomacher. Las suspensiones fecales se almacenaron a -20°C hasta que se extrajo el ADN. El ADN se extrajo de 50-100 mg de materia fecal utilizando el FastDNA[®] Kit SPIN para suelo (MP Biochemicals, Irvine, CA). La calidad del ADN se verificó usando un gel de agarosa al 0,7 % y un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y luego se cuantificó usando un fluoroespectrómetro Nanodrop 3300 (Thermo Scientific).

Composición de la comunidad microbiana mediante pirosecuenciación

La diversidad filogenética de las comunidades bacterianas se determinó utilizando secuencias del gen 16S rRNA obtenidas con química de titanio 454 FLX y Roche Genome Sequencer (454 Life Sciences-Roche, Branford, CT) y cebadores que amplifican la región V3-V5 del gen 16S rRNA. Se analizaron y diferenciaron múltiples muestras utilizando cebadores directos etiquetados de 10 pb. La PCR inicial de los extractos de muestras fecales se realizó utilizando ADN polimerasa Phusion (NEB) de alta fidelidad y los amplicones se purificaron en gel (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen). En las instalaciones de Purdue Genomics, los amplicones purificados se cuantificaron mediante fluorometría después de la tinción con el kit de ensayo de ADN Pico Green y mediante qPCR, y se usaron cantidades equimolares para la secuenciación química del titanio 454 FLX.

Ánalisis estadístico

Las lecturas del análisis de pirosecuenciación primero se preprocesaron usando un software para eliminar las etiquetas de los cebadores y eliminar las secuencias de baja calidad. La calidad de la secuencia se consideró baja si

la longitud era < 400 pb o si había discrepancias o ambigüedades en la secuencia del cebador directo. Las secuencias se analizaron utilizando la tubería QIIME que incluye software de muchas fuentes que permite la unidad taxonómica operativa (OTU) y la asignación taxonómica, así como una serie de diferentes medidas de diversidad beta y alfa. Se usó ChimerSlayer para eliminar las secuencias químéricas. Las asignaciones de OTU se realizaron utilizando el método uclust y el agrupamiento de vecinos más lejanos con un umbral de similitud de secuencia del 97 %. Se obtuvieron secuencias de OTU representativas después de la alineación de secuencias utilizando PyNast y el conjunto central de Greengenes. Las asignaciones taxonómicas se realizaron utilizando el clasificador RDP al 80 % de confianza. Se utilizó el análisis de rarefacción para obtener una estimación de la cobertura de secuencias de la comunidad. Se calcularon estimaciones de biodiversidad alfa (por ejemplo, índices de Shannon y Ghao1) para comparar sujetos, con la advertencia de que la PCR se está utilizando para apuntar al gen 16S rRNA. Los resultados podrían haber estado sesgados y las diferencias en la copia de secuencia por genoma influirían en los números relativos. Las comparaciones de la composición de la comunidad se realizaron mediante el análisis "Fast UniFrac" de conjuntos de datos filogenéticos y de OTU.

Se utilizó el análisis de correlación de Pearson para buscar asociaciones entre la diferencia en la absorción fraccional de calcio entre tratamientos (24-48 h) y la diferencia en la presencia de géneros bacterianos después de cada tratamiento. Las bacterias utilizadas en estas correlaciones eran bacterias con géneros promedio $\geq 0,001$ ($= 0,1\%$) o proporciones de taxones que eran significativamente diferentes en las muestras finales según las pruebas t que incluían los siguientes taxones bacterianos: *Bifidobacteria*, Otras *Coriobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Barnesiella*, *Butyricimonas*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Alistipes*, Otras *Rikenellaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, Otras *Lactobacillaceae*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Mogibacterium*, *Blautia*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Dorea*, Otras *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, Otras *Clostridiales*, Otras *Peptostreptococcaceae*, *Sporacetigenium*, *Acetivibrio*, *Butyricicoccus*, *Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, Otras *Ruminococcaceae*, *Ruminococcus*, *Subdoligranulum*, *Dialister*, Otros *Clostridios*, *Catenibacterium*, *Coprobacillus*, Otras *Erysipelotrichaceae*, *Turicibacter*, Otros *Firmicutes*, Otras *Bacterias*, *Escherichia/Shigela*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, otros *Streptococcaceae*, *Anaerofustis*, y *Anaerococcus*.

Resultados

30 Cambios en la composición de la comunidad bacteriana

Se obtuvieron un total de 1.793.821 secuencias usando pirosecuenciación de titanio 454 (Roche Applied Science, Branford, CT, EE. UU.) con un promedio de 19498 secuencias (± 7126) por muestra, y un intervalo entre 8211 y 41212 secuencias por muestra. No hubo diferencias significativas en el número de secuencias obtenidas para cada sujeto cuando se compararon por tratamiento ($P > 0,05$) o por tiempo de recolección (línea de base vs muestras finales) ($P > 0,05$). Había diez filos, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *TM7*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes* y *Synergistetes* representados en las comunidades microbianas de los 23 sujetos. Pero en todas las muestras más del 99 % de las secuencias eran de cuatro filos; *Firmicutes* fue el filo más dominante con un promedio de 89,4 %, seguido de *Bacteroidetes* (5,1 %), *Actinobacteria* (4,9 %) y *Proteobacteria* (0,5 %).

A nivel de filo, independientemente de la inclusión de SCF en la dieta clínica, la proporción relativa promedio de *Bacteroidetes* aumentó significativamente y *Firmicutes* disminuyó al final de cada sesión. Las comunidades de sujetos en tratamientos SCF versus Control fueron significativamente diferentes a nivel familiar (Figura 3). Hubo una mayor proporción de *Porphyromonadaceae* ($P = 0,02$) y otros *Clostridiales* ($P = 0,009$) después de la dieta SCF y menos *Peptostreptococcaceae* ($P = 0,04$). Hubo una diferencia significativa en las proporciones relativas de la población en la familia *Corynebacteriaceae* ($P = 0,02$) al comienzo de los dos tratamientos. En el nivel más bajo de resolución para estas secuencias, había nueve géneros y cuatro "otros" grupos que tenían proporciones promedio que diferían significativamente ($P < 0,1$) después de los tratamientos SCF versus Control (Tabla 5). Los aumentos significativos después de la dieta SCF fueron en los géneros *Parabacteroides* ($P < 0,003$), otros *Clostridiales* ($P = 0,04$) y otras *Ruminococcaceae* ($P < 0,03$) mientras que se observaron disminuciones significativas para *Enterococcus* ($P < 0,03$), *Anaerofustis* ($P < 0,05$), *Coprococcus* ($P < 0,03$) y otros *Peptostreptococcaceae* ($P < 0,002$). También hubo un aumento en *Bifidobacterium*, *Alistipes*, *Anaerococcus*, *Catenibacterium* y otros *clostridios*, pero los aumentos no fueron significativos. Del mismo modo, las disminuciones en *Rothia*, otros *Streptococcaceae*, *Clostridium*, *Sporacetigenium*, *Turicibacter* y otra *géneros incertae sedis TM7* ocurrió con el consumo de SCF, pero la diferencia en la proporción de la comunidad con no fue significativa.

Tabla 5. Comparación de la proporción promedio (\pm SEM) de taxones bacterianos en muestras fecales de sujetos al final de las dietas suplementadas con fibra de maíz soluble versus dietas de control

Taxón*	SCF	CON	valor P		
Filo: <i>Actinobacteria</i>					
Clase: <i>Actinobacteria</i> ; Orden: <i>Actinomycetales</i> ; Familia: <i>Micrococcaceae</i>					

Taxón*	SCF	CON	valor P	
Género: <i>Rothia</i>	0,001 ± 0,002 %	0,016 ± 0,061 %	0,065	
Clase: <i>Actinobacteria</i> ; Orden: <i>Bifidobacteriales</i> ; Familia: <i>Bifidobacteriaceae</i>				
Género: <i>Bifidobacterium</i>	5,26 ± 1,18 %	4,38 ± 1,03 %	0,095	
Filo: <i>Bacteroidetes</i>				
Clase: <i>Bacteroidia</i> ; Orden: <i>Bacteroidales</i> ; Familia: <i>Porphyromonadaceae</i>				
Género: <i>Parabacteroides</i>	3,58 ± 1,18 %	0,83 ± 0,32 %	0,003	
Clase: <i>Bacteroidia</i> ; Orden: <i>Bacteroidales</i> ; Familia: <i>Rikenellaceae</i>				
Género: <i>Alistipes</i>	1,77 ± 0,62 %	0,57 ± 0,19 %	0,060	
Clase: <i>Otros Bacteroidetes</i>	0,01 ± 0,005 %	0,037 ± 0,145 %	0,063	
Filo: <i>Firmicutes</i>				
Clase: <i>Bacilli</i> ; Orden: <i>Lactobacillales</i> ; Familia: <i>Enterococcaceae</i>				
Género: <i>Enterococcus</i>	0,012 ± 0,037 %	0,590 ± 2,100 %	0,027	
Clase: <i>Bacilli</i> ; Orden: <i>Lactobacillales</i>				
Familia: <i>Otras Streptococcaceae</i>	0,001 ± 0,003 %	0,004 ± 0,008 %	0,078	
Clase: <i>Clostridia</i> ; Orden: <i>Clostridiales</i> ; Familia: <i>Clostridiaceae</i>				
Género: <i>Clostridium</i>	1,012 ± 2,234 %	1,960 ± 2,778 %	0,077	
Clase: <i>Clostridia</i> ; Orden: <i>Clostridiales</i> ; Familia: <i>Eubacteriaceae</i>				
Género: <i>Anaerofustis</i>	0,006 ± 0,002 %	0,012 ± 0,004 %	0,048	
Clase: <i>Clostridia</i> ; Orden: <i>Clostridiales</i> ; Familia: <i>Incertae Sedis XI</i>				
Género: <i>Anaerococcus</i>	0,017 ± 0,007 %	0,003 ± 0,002 %	0,064	
Clase: <i>Clostridia</i> ; Orden: <i>Clostridiales</i> ; Familia: <i>Lachnospiraceae</i>				
Género: <i>Coprococcus</i>	0,68 ± 0,13 %	1,15 ± 0,25 %	0,027	
Taxón*	SCF	CON	valor P	
Clase: <i>Clostridia</i>				
Orden: <i>Otros Clostridiales</i>	14,64 ± 1,63 %	9,61 ± 0,69 %	0,013	
Clase: <i>Clostridia</i> ; Orden: <i>Clostridiales</i>				
Familia: <i>Otras Peptostreptococcaceae</i>	0,42 ± 0,10 %	1,00 ± 0,18 %	0,001	
Clase: <i>Clostridia</i> ; Orden: <i>Clostridiales</i> ; Familia: <i>Peptostreptococcaceae</i>				
Género: <i>Sporacetigenium</i>	5,46 ± 1,18 %	9,38 ± 1,92 %	0,083	
Clase: <i>Clostridia</i> ; Orden: <i>Clostridiales</i>				
Familia: <i>Otras Ruminococcaceae</i>	4,07 ± 1,02 %	1,93 ± 0,45 %	0,030	
Clase: <i>Otros Clostridia</i>	0,225 ± 0,413 %	0,124 ± 0,266 %	0,064	
Clase: <i>Erysipelotrichi</i> ; Orden: <i>Erysipelotrichales</i> ; Familia: <i>Erysipelotrichaceae</i>				
Género: <i>Catenibacterium</i>	2,297 ± 6,656 %	0,438 ± 1,155 %	0,094	
Clase: <i>Erysipelotrichi</i> ; Orden: <i>Erysipelotrichales</i> ; Familia: <i>Erysipelotrichaceae</i>				
Género: <i>Turicibacter</i>	0,308 ± 0,630 %	0,855 ± 1,817 %	0,083	
Fil: <i>TM7</i>				
Clase: <i>Otros géneros incertae sedis TM7</i>	0,001 ± 0,003 %	0,005 ± 0,012 %	0,078	

*Sólo los taxones en los que las proporciones al final diferían significativamente (pared t-test, valores p < 0,1) se enumeran.

Fast UniFrac con análisis Jackknife no mostró diferencias en la estructura de la comunidad debido a la dieta a pesar de procesar los datos utilizando diferentes criterios de clasificación (por ejemplo, OTU versus filogenia). El análisis de coordenadas principales de Unifrac ponderado de OTU mostró cierta separación entre las muestras al principio y al final de las sesiones clínicas, pero los dos tratamientos no se separaron.

- 5 Correlaciones entre géneros de bacterias y absorción fraccional de calcio
- 10 Los cambios (tratamiento con SCF menos control) en la absorción fraccional de Ca medidos en orina de 24-48 h se correlacionaron negativamente (disminuciones en los géneros bacterianos a medida que aumentaba la absorción de calcio con SCF) con *Actinomyces*, *Pseudomonas* del filo Actinobacteria y otras *Erysipelotrichaceae* del filo Firmicutes. Por el contrario, el cambio en la absorción fraccional de Ca se correlacionó positivamente (aumentos en los géneros bacterianos a medida que aumentaba la absorción de calcio con SCF) con el miembro Bacteroidetes *Bacteroides*, así como también *Butyricicoccus*, *Oscillibacter*, y *Dialister* del filo Firmicutes
- 15 Tabla 6. Correlaciones entre la absorción de calcio y los géneros de bacterias que pueden afectar los mecanismos del intestino inferior

Diferencias de géneros al final de cada tratamiento	Dif en Ca Abs a las 24-48 h	
	Coeficiente	valor P
<i>Bacteroides</i>	0,483	0,027
<i>Actinomyces</i>	-0,553	0,009
<i>Pseudomonas</i>	-0,473	0,03
<i>Butyricicoccus</i>	0,454	0,039
<i>Oscillibacter</i>	0,565	0,008
<i>Dialister</i>	0,619	0,003
<i>Otras Erysipelotrichaceae</i>	-0,463	0,034
Correlaciones de Pearson N = 21		

- 20 Los resultados anteriores indican que el consumo diario de 12 g de fibra de maíz soluble durante 21 días en niñas y niños adolescentes aumentó la absorción fraccional de calcio en un -12 %. Este aumento en la absorción fraccional de calcio se produjo entre las 24 y las 48 h, ya que el efecto fue significativo al medir el segundo pool de orina de 24 h (24-48 h) después de recibir isótopos estables de calcio, mientras que no se observaron diferencias significativas en el enriquecimiento de isótopos en la orina recolectada, durante las primeras 24 h. Esto está respaldado por la literatura que sugiere que la participación microbiana y la absorción intestinal más baja no se capturan hasta 24 h después de recibir los isótopos.

- 25 Es difícil decir si el aumento de la absorción de calcio observado en este estudio resultó en la deposición de minerales óseos porque no se observó ningún efecto sobre la retención de calcio. Las medidas de calcio fecal son muy variables; sería necesario un tamaño de muestra de 34 para ver una diferencia de 61 mg en el calcio retenido con un error alfa de 0,05, un poder del 80 % y una desviación estándar de la diferencia entre los participantes de 122 mg/d. Es posible que el tratamiento produzca un efecto sobre la resistencia ósea. Los dos métodos tienen una gran diferencia en el % SD, es decir, 9,7 % para la fuerza de ruptura y 41,3 % para la retención de calcio. Suponiendo que se mantenga la mayor absorción de calcio (medida mediante un método de isótopo dual más sensible) con SCF, los datos de este estudio sugieren que el tratamiento con SCF conduciría a una retención adicional de calcio de 70 mg/d. Durante un año, esto representaría 25 g adicionales de calcio o el 2,8 % del calcio corporal total, suponiendo que el esqueleto de un adulto tenga 900 g de calcio.

- 30 35 40 En conclusión, el consumo de 12 g/d de SCF influyó positivamente en la absorción de calcio en niñas y niños adolescentes. La absorción inducida por SCF se produjo después de 24 horas, lo que puede ser indicativo de una menor afectación intestinal. Se observaron aumentos significativos en las proporciones de los miembros de Bacteroidetes y Bifidobacterium, fermentadores de almidones resistentes.

Ejemplo 3

45 Sujetos y métodos

Métodos

La composición de la microbiota intestinal en muestras representativas con (dosis de 10 g/día ("D10") y dosis de 20

g/día ("D20")) y sin (dosis de 0 g/día ("D0")) tratamiento dietético SCF se determinó utilizando Secuenciación de alto rendimiento Illumina MiSeq en lugar de pirosecuenciación 454. Los datos se utilizan para determinar aumentos o disminuciones proporcionales en las poblaciones que están asociadas con diferencias en la suplementación de la dieta. Hay cinco etapas para el análisis de la comunidad microbiana intestinal que se realizaron: (1) Las muestras fecales recolectadas al principio y al final de cada suplementación de SCF de la dieta asignada al azar se homogeneizaron en preparación para las extracciones de ADN (un total de seis muestras por sujeto con la excepción del sujeto 103 que no envió una muestra fecal inicial D0); (2) El ADN fecal total se extrajo con el sistema Fast DNA™ Kit Soil Spin y FastPrep™; (3) El ADN extraído se sometió a PCR utilizando cebadores que se dirigen al gen del ARNr de Bacteria 16S; (4) Los productos de PCR se secuenciaron utilizando Illumina MiSeq; (5) Las secuencias se analizaron utilizando la canalización QIIME para determinar los cambios cuantitativos en los miembros de la comunidad microbiana resultantes del tratamiento con fibra de maíz soluble.

Procesamiento fecal y extracción de ADN

15 Se procesaron muestras fecales congeladas y se extrajo el ADN como se indica en el Ejemplo 2.

Composición de la comunidad microbiana

20 La diversidad filogenética de las comunidades bacterianas se determinó utilizando secuencias del gen 16S rRNA obtenidas de la tecnología MiSeq de extremo emparejado de alto rendimiento (Illumina), y se usaron cebadores que amplifican la región V3-V4 del gen 16S rRNA. Se analizaron varias muestras y se diferenciaron mediante una combinación de cebadores directos etiquetados de 8 pb y cebadores inversos etiquetados de 8 pb mediante un protocolo de etapa que utiliza dos ejecuciones de PCR. La primera PCR amplifica específicamente el gen 16S rRNA de extractos de muestras fecales. Los cebadores y nucleótidos no incorporados se separaron de los amplicones de PCR utilizando el kit Agencourt AMPure XP (Becker). La segunda PCR se usó para agregar etiquetas bit a los amplicones (de la primera serie) que se necesitan para la secuenciación de Illumina y se purificó nuevamente con el kit Agencourt AMPure XP. Todas las PCR se realizaron usando Q5® ADN polimerasa de alta fidelidad (New England Biolabs) para minimizar la tasa de error durante la polimerización. Los amplicones purificados se cuantificaron mediante fluorometría después de la tinción con el kit de ensayo de ADN PicoGreen. Los amplicones de cada muestra se combinaron en cantidades equivalentes y se secuenciaron utilizando el instrumento MiSeq (Illumina).

Análisis de secuencia

35 Las secuencias se preprocesaron para eliminar las etiquetas de los cebadores y las secuencias de baja calidad, y luego se analizaron utilizando la canalización QIIME. Las secuencias de MiSeq Illumina de los fragmentos del gen 16S rRNA se analizaron utilizando tanto la taxonomía basada en OTU como la basada en árboles filogenéticos. OTU se definió como un grupo basado estrictamente en la similitud de secuencia y no alineado con una taxonomía conocida. Las secuencias se prefirieron primero y las asignaciones de OTU se realizaron utilizando el método uclust y las secuencias principales de Greengenes utilizando un valor de umbral del 60 % (según lo recomendado por los desarrolladores de QIIME). Se obtuvieron secuencias OTU representativas después de la alineación de secuencias usando PyNast para filtrar las secuencias que no se alinearon con las secuencias centrales de Greengenes. Las asignaciones taxonómicas se realizaron utilizando el clasificador RDP al 80 % de confianza y la base de datos Greengenes. Se utilizó el análisis de rarefacción para obtener una estimación de la cobertura de secuencias de la comunidad. Se calcularon estimaciones de biodiversidad alfa para comparar la diversidad de microbiota dentro de sujetos bajo tratamientos SCF específicos. Las comparaciones de diversidad beta entre comunidades se realizaron utilizando el análisis "Fast UniFrac" de distancias filogenéticas, así como el análisis de distancia no filogenética utilizando distancias euclidianas. Todas las medidas de diversidad alfa y beta se realizaron utilizando un número equivalente de taxones (basado en el número más bajo de secuencias obtenidas de una sola muestra) que se eligieron aleatoriamente utilizando múltiples resultados de rarefacción (10 iteraciones).

Análisis estadístico

50 Se usó el análisis de Friedman (equivalente no paramétrico de ANOVA) para una comparación general de proporciones promedio de géneros en sujetos al principio (B) y al final (E) de cada tratamiento SCF. A continuación, se utilizó la prueba de intervalos con signo de Wilcoxon para determinar las diferencias significativas en las comparaciones por pares de muestras desde el principio y el final de cada fase de tratamiento, así como entre las muestras finales. Se usó la prueba T de Student para determinar las diferencias significativas entre las medidas de diversidad alfa. Las diferencias significativas en la diversidad beta entre comunidades se determinaron utilizando perMANOVA, una herramienta estadística multivariante no paramétrica disponible en el paquete Paleontological Statistics versión 2.16 (software PAST, <http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>). Se aplicó la corrección de Bonferroni a todas las pruebas estadísticas.

Resultados

65 El número de muestras fecales analizadas para los 28 individuos fue de 167, seis por individuo con la excepción de

un sujeto que no proporcionó una muestra inicial para el experimento de suplementación con dieta de 0 g (Tabla 7). Por esta razón, los resultados estadísticos presentados en este informe se basan en datos de solo 27 sujetos. A los sujetos se les administró 10 g/día de SCF (D10), 20 g/día de SCF (D20) y ningún SCF (D0).

5 Número de secuencias

10 Se obtuvo un total de 12.979.388 secuencias combinadas de alta calidad utilizando la secuenciación MiSeq Illumina con un promedio de 77.720,9 secuencias (\pm 28.401) por muestra, y osciló entre 28.854 y 262.312 secuencias por muestra (Tabla 7). El menor número de secuencias obtenidas fue de 28.854, por lo que todos los análisis posteriores se redujeron a 28.800 secuencias por muestra. Para obtener un conjunto de datos enrarecido, se realizaron 10 iteraciones de selección aleatoria de 28.800 secuencias de cada conjunto de datos y luego se fusionaron los conjuntos de datos para obtener un conjunto de 28.800 secuencias representativas de cada muestra.

15 Tabla 7. Sujetos incluidos en el análisis de la comunidad microbiana y número de secuencias de cada muestra fecal recolectada.

Identificación del sujeto	B-D10*	E-D10	B-D20	E-D20	B-D0	E-D0	Media
101	35648	95561	28854	81110	39956	127868	68166
102	32756	88022	53025	79399	39773	102533	65918
103**	46731	83639	62571	57150	ND	114458	72910
105	71802	87419	77341	97803	78244	135063	91279
106	47326	78151	33267	92006	43006	98303	65343
107	41246	84315	34342	77309	37403	107778	63732
108	69813	71916	104705	58411	76103	70721	75278
109	48771	90250	32212	59657	39759	64715	55894
110	104086	80540	70670	87591	81174	102184	87708
111	40890	74227	39385	86600	39783	84159	60841
112	37436	83953	38347	65681	42727	79281	57904
113	44561	73287	41348	67915	30805	53853	51962
Identificación del sujeto	B-D10*	E-D10	B-D20	E-D20	B-D0	E-D0	Media
114	82124	100597	70023	99104	67147	93323	85386
115	42685	85418	48484	85940	54404	93652	68431
116	55328	104198	62443	99053	38824	99359	76534
117	45551	70450	66727	119448	40043	78325	70091
118	70595	86264	85866	96618	83459	98271	86846
119	46358	80466	47594	106314	46887	98310	70988
120	57301	96805	66532	101655	52993	124090	83229
121	53277	72966	53345	76849	66119	137385	76657
122	76244	105777	88763	119395	71736	81078	90499
124	86440	112472	73716	94871	112156	79607	93210
125	92836	90916	83968	81214	69313	98037	86047
126	101758	127714	87905	89984	110822	101913	103349
127	108740	88143	85892	94263	103970	59492	90083
128	93626	95191	56287	77558	68134	89239	80006
129	81034	93014	81428	75555	56459	48613	72684

Identificación del sujeto	B-D10*	E-D10	B-D20	E-D20	B-DO	E-DO	Media
130	262312	66058	87767	116323	95907	118085	124409

* B- indica la muestra inicial y E- indica la muestra final.
** excluidos de los análisis estadísticos debido a la falta de muestra

Comparación de filos representados en datos de secuencia

Había 13 filos, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Cianobacteria*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Synergistetes*, TM7, *Tenericutes*, [Thermi] y *Verrucomicrobia* encontrados en las comunidades microbianas de los 28 sujetos. Además, los cebadores amplificaron algunas secuencias del dominio *Archaea* y otras Bacterias que actualmente no se pueden clasificar. Pero más del 99 % de las secuencias eran de cuatro filos, *Actinobacterias*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacterias*. En todas las muestras de todos los sujetos, Firmicutes fue el filo dominante con un promedio de 65,8% seguido por *Bacteroidetes* (26,0%), *Actinobacteria* (6,2%) y *Proteobacteria* (1,8%) (Figura 1). No hubo una diferencia significativa en las proporciones de los filos entre las muestras inicial y final de ninguno de los tratamientos de prueba de SCF. Tampoco se encontraron diferencias significativas a nivel de Clase y Orden de clasificación taxonómica. *Archaea* son un grupo importante que debería ser monitoreado en el futuro, pero debido a que los cebadores usados en este estudio no fueron desarrollados para su inclusión, no creemos que sea apropiado usar su presencia (o ausencia) en nuestra evaluación.

Comparación de familias representadas en datos de secuencia

ANOVA de los taxones a nivel de familia indicó que había una diferencia significativa solo dentro del filo *Bacteroidetes*. Los Bacteroidetes incluían a las familias *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, y *Rikenellaceae* y nuevas familias tentativas [Barnesiellaceae], [Odoribacteraceae], [Paraprevotellaceae], [Weeksellaceae], RF16, S24-7 y otras tres familias. Las familias enumeradas como [tentativas] y "otras" son las que aún no se han clasificado oficialmente, principalmente porque estos grupos son descubrimientos recientes basados en análisis moleculares de los cuales algunos no tienen representantes en la cultura para usar para la asignación taxonómica. ANOVA indicó que había diferencias significativas en la *Porphyromonadaceae* eso fue respaldado por la corrección de Bonferroni ($p < 0,0001$).

Comparación de géneros representados en datos de secuencia

Para una mayor resolución, se realizaron las mismas comparaciones a nivel de género de clasificación filogenética utilizando estadísticas no paramétricas. De los 235 géneros (o equivalentes de géneros) identificados en el análisis de todas las muestras de sujetos que se secuenciaron, un subconjunto de solo 24 géneros comprendió > 1 % de la comunidad en al menos una de las muestras y representó aproximadamente 90 % de las comunidades (resultados no mostrado). Aunque algunos géneros constituyan una pequeña proporción de las comunidades, diferían significativamente. Los géneros que diferían significativamente fueron *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Dorea*, *Lachnospira*, un *Ruminococcus* sin clasificar, *Lachnospiraceae* sin clasificar y "otras" bacterias (Tabla 8) según el análisis de Friedman (equivalente no paramétrico a ANOVA) con corrección de Bonferroni.

Tabla 8. Análisis de Friedman (equivalente no paramétrico a ANOVA) de proporciones promedio de géneros* en sujetos al principio (B) y al final (E) de cada tratamiento SCF (10, 20 y 0 g/día)

	B-D10 (%)	E-D10 (%)	B-D20 (%)	E-D20 (%)	B-DO (%)	E-DO (%)	P	P Bonferroni	Corregido Bonferroni
<i>Parabacteroides</i>	0,90	2,11	1,12	3,01	0,99	1,06	0,0000	0,0000	
No clasificado Lachnospiraceae	6,35	11,39	6,04	13,08	5,87	6,32	0,0000	0,0000	
Reclasificado [Ruminococcus]	3,75	2,38	2,48	1,89	3,58	3,74	0,0000	0,0000	
<i>Dorea</i>	1,08	1,04	1,22	0,70	1,14	1,26	0,0000	0,0015	
Otras bacterias	0,07	0,05	0,12	0,06	0,11	0,04	0,0000	0,0016	
<i>Lachnospira</i>	1,14	0,67	1,43	0,66	1,26	0,94	0,0000	0,0067	
<i>Bacteroides</i>	14,75	11,09	16,18	9,62	15,64	13,74	0,0001	0,0216	
<i>Turicibacter</i>	0,22	0,12	0,12	0,13	0,15	0,27	0,0011	0,2545	

	B-D10 (%)	E-D10 (%)	B-D20 (%)	E-D20 (%)	B-D0 (%)	E-D0 (%)	P	P Bonferroni	Corregido Bonferroni
<i>Dialister</i>	0,64	0,86	0,74	1,17	0,55	0,46	0,0016	0,3796	
SMB53	2,46	1,92	1,89	1,38	2,08	1,93	0,0026	0,6035	
<i>Ruminococcus</i>	5,12	7,15	5,89	7,70	5,00	5,94	0,0041	0,9555	
<i>Streptococcus</i>	0,39	0,18	0,19	0,46	0,37	0,22	0,0048	1	
<i>Adlercreutzia</i>	0,06	0,05	0,06	0,04	0,06	0,06	0,0057	1	
<i>Butyricimonas</i>	0,13	0,10	0,17	0,16	0,17	0,18	0,0089	1	
<i>Porphyromonas</i>	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,0094	1	
Otras Clostridiaceae	0,32	0,09	0,30	0,11	0,25	0,26	0,0151	1	
<i>Fusobacterium</i>	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,0156	1	
Alcaligenaceae clasificado	No	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,0162	1
<i>Prevotella</i>	5,73	6,35	6,30	4,72	6,70	6,64	0,0168	1	
<i>Varibaculum</i>	0,000	0,001	0,002	0,001	0,000	0,001	0,0170	1	
No Erysipelotrichaceae clasificado	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,0231	1	
<i>Akkermansia</i>	0,000	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,0232	1	
<i>Campylobacter</i>	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000	0,001	0,0233	1	
<i>Granulicatella</i>	0,003	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002	0,0241	1	
<i>Sutterella</i>	0,80	0,79	1,01	0,93	1,10	1,06	0,0245	1	
Enterobacteriaceae No clasificado	No	0,22	0,36	0,26	0,15	0,24	0,47	0,0255	1
<i>Corynebacterium</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06	0,00	0,0297	1	
<i>Acidaminococcus</i>	0,10	0,12	0,05	0,15	0,07	0,10	0,0301	1	
<i>Odoribacter</i>	0,39	0,29	0,45	0,88	0,36	0,50	0,0304	1	
WAL 1855D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0312	1	
<i>Anaerostipes</i>	0,22	0,14	0,18	0,13	0,33	0,22	0,0344	1	
<i>Abiotrophia</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0423	1	

*Solo los géneros que diferían significativamente ($p < 0,05$) se incluyen en la tabla. La designación "No clasificado (Sin clasificar)" indica que la secuencia probablemente pertenece a un nuevo género que todavía tiene que ser descrito, pero hay suficiente información que soporta la identificación de un nuevo género.

La designación "Otra" también para taxones no clasificados, pero en niveles taxonómicos más altos, es decir, clase, orden o familia.

Se realizó una comparación por pares (prueba de intervalo con signo de Wilcoxon con corrección de Bonferroni) de los promedios proporcionales de todos los géneros en las muestras iniciales y finales recolectadas dentro de los tratamientos SCF para identificar los tratamientos en los que estos taxones diferían significativamente. Proporciones de *Parabacteroides* y una *Lachnospiraceae* sin clasificar (Cuadro 8) fueron significativamente mayores al final de las dietas D10 y D20 en comparación con el inicio. Además, al final de la dieta D10 hubo un aumento significativo en *Akkermansia* y disminución de reclasificados [*Ruminococcus*]. Al final de la dieta D20 hubo disminuciones significativas en *Bacteroides* y *Lachnospira*. Al final de la dieta D0 hubo una disminución significativa de "otras" bacterias, pero no se trata de un único grupo taxonómico. Por lo tanto, a diferencia de los otros dos tratamientos de dieta, no hubo diferencias significativas en los taxones en los sujetos después de consumir la dieta D0.

5 de *Parabacteroides* y una *Lachnospiraceae* sin clasificar (Cuadro 8) fueron significativamente mayores al final de las dietas D10 y D20 en comparación con el inicio. Además, al final de la dieta D10 hubo un aumento significativo en *Akkermansia* y disminución de reclasificados [*Ruminococcus*]. Al final de la dieta D20 hubo disminuciones significativas en *Bacteroides* y *Lachnospira*. Al final de la dieta D0 hubo una disminución significativa de "otras" bacterias, pero no se trata de un único grupo taxonómico. Por lo tanto, a diferencia de los otros dos tratamientos de dieta, no hubo diferencias significativas en los taxones en los sujetos después de consumir la dieta D0.

10 de *Parabacteroides* y una *Lachnospiraceae* sin clasificar (Cuadro 8) fueron significativamente mayores al final de las dietas D10 y D20 en comparación con el inicio. Además, al final de la dieta D10 hubo un aumento significativo en *Akkermansia* y disminución de reclasificados [*Ruminococcus*]. Al final de la dieta D20 hubo disminuciones significativas en *Bacteroides* y *Lachnospira*. Al final de la dieta D0 hubo una disminución significativa de "otras" bacterias, pero no se trata de un único grupo taxonómico. Por lo tanto, a diferencia de los otros dos tratamientos de dieta, no hubo diferencias significativas en los taxones en los sujetos después de consumir la dieta D0.

Tabla 8: Comparación de proporciones promedio (%) de género en sujetos que difieren significativamente (prueba de intervalo con signo Wilcoxon después de corrección de Bonferroni, $p < 0,05$) entre el inicio (B) y el final (E) de cada tratamiento de SCF (10, 20 y 0 g/día)

Filo/Género	B-D10	E-D10	p	B-D20	E-D20	p	B-D0	E-D0	p
Bacteroidetes									
<i>Bacteroides</i>	14,7	11,1	ns	16,2	9,6	0,011	15,6	13,7	ns
<i>Parabacteroides</i>	0,9	2,1	0,002	1,1	3,0	0,001	1,0	1,1	ns
Firmicutes									
<i>Lachnospira</i> no clasificado	1,1	0,7	ns	1,4	0,7	0,002	1,3	0,9	ns
<i>Lachnospiraceae</i> reclasificado	6,4	11,4	0,001	6,0	13,1	0,0003	5,9	6,3	ns
<i>Ruminococcus</i>	3,7	2,4	0,011	2,5	1,9	ns	3,6	3,7	ns
Verrucomicrobia									
<i>Akkermansia</i>	0,000	0,003	0,020	0,001	0,001	ns	0,001	0,001	ns
Otras bacterias	0,07	0,05	ns	0,12	0,06	ns	0,11	0,04	0,001

Además, las comparaciones por pares de las muestras finales de las dietas D10, D20 y D0 corroboraron las diferencias en las comunidades (Tabla 9). Hubo un efecto potencial de la dosis sobre el *Parahacteroides*, esto fue indicado por proporciones significativamente mayores después de la dieta D20 en comparación con D10 que fue mayor que después de la dieta D0. La misma tendencia se encontró para las Lachnospiraceae no clasificadas y *Dialister*, los cuales fueron significativamente mayores al final de las dietas D10 y D20 en comparación con D0, pero las dietas D10 y D20 no fueron significativamente diferentes. Además, hubo una proporción significativamente mayor de *Bifidobacterium* al final de la dieta D20 en comparación con D0. Al final de las dietas D10 y/o D20 en comparación con D0 hubo proporciones significativamente más bajas de *Anaerostipes*, *Dorea*, [*Ruminococo*] reclasificado y *Erysipelotrichaceae* sin clasificar. Al comienzo del tratamiento con dieta SCF también hubo diferencias significativas en las proporciones de [*Ruminococcus*], reclasificados, *Enterococcus* y *Campylobacter*. La proporción significativamente mayor de [*Ruminococcus*] reclasificados al comienzo de la dieta D20 potencialmente se tuvo en cuenta para encontrar una diferencia significativa en este taxón en la comparación de las muestras inicial y final.

- 15 Tabla 9a: Comparación de proporciones promedio de géneros* que difirió significativamente al comienzo (B) de cada tratamiento SCF (10, 20 y 0 g/día) utilizando la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon corregida de Bonferroni (no paramétrica)

Filo	Género	B-D10 (%)	B-D20 (%)	B-D0 (%)
Firmicutes	<i>Ruminococcus</i> reclasificado	3,75	2,48	3,58
Firmicutes	<i>Enterococcus</i>	0,001	0,027	0,009
Proteobacteria	<i>Campylobacter</i>	0,001	0,002	0,000

- 20 Tabla 9b: Comparación de proporciones promedio de géneros* en sujetos al final (E) de cada tratamiento SCF (10, 20 y 0 g/día) utilizando la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon corregida de Bonferroni (no paramétrica)

Filo	Género	E-D10 (%)	E-D20 (%)	E-D0 (%)
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	4,23	5,06	3,24
Bacteroidetes	<i>Parabacteroides</i>	2,11	3,01	1,06
Firmicutes	<i>Anaerostipes</i>	0,13	0,13	0,22
Firmicutes	<i>Dorea</i>	1,04	0,70	1,26
Firmicutes	<i>Ruminococcus</i> reclasificado	2,38	1,89	3,74
Firmicutes	Lachnospiraceae sin clasificar	11,39	13,08	6,32
Firmicutes	<i>Dialister</i>	0,86	1,17	0,46
Firmicutes	<i>Erysipelotrichaceae</i> sin clasificar	0,006	0,004	0,008

- 25 Sin estar ligado a una teoría particular, el aumento en la proporción de *Parabacteroides*, Lachnospiraceae sin clasificar y *Dialister* después de las dietas D10 y D20 sugiere que estos microbios están involucrados en la fermentación de SCF.

Comparación de la diversidad alfa

- 30 Hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en las medidas de diversidad alfa entre las comunidades inicial y final bajo cada dieta SCF (Tabla 10). La diversidad alfa proporciona una métrica para la diversidad dentro de un tratamiento. Usando la medida Chao1, se encontraron estas diferencias para ambas dietas SCF D10 y D20 y no para D0 (Tabla 10, Figura 5). Mientras que, al usar Especies observadas, la diferencia solo fue significativa para la dieta D20. No se encontraron diferencias significativas para Árbol completo PD (Tabla 10a). Mientras que la comparación por pares de la diversidad en las muestras finales indicó que hubo diferencias significativas entre todos los valores de Chao1 y entre el final de D10 y D20 versus D0. Las diferencias de importancia entre los índices de diversidad probados se deben a que los algoritmos para cada una de estas medidas de diversidad alfa son bastante diferentes y se enfatizan en diferentes criterios. Por ejemplo, el árbol completo de PD es una medida filogenética mientras que los otros dos no lo son. Chao1 es una medida de la riqueza de especies y las especies observadas resumen el número de OTU únicas. Sin estar ligado a una teoría en particular, se cree que la dieta SCF estaba aumentando el número de taxones en las muestras.

Tabla 10a: Comparación de la media \pm desviación estándar de los valores de diversidad alfa. Diferencias significativas entre el inicio y el final dentro de cada tratamiento

	B-D10	E-D10	B-D20	E-D20	B-D0	E-D0
Chao 1	1141 \pm 155	1282 \pm 192	1146 \pm 154	1402 \pm 276	1152 \pm 186	1104 \pm 126
PD árbol completo	30,8 \pm 4,2	31,2 \pm 4,2	31,2 \pm 4,1	31,7 \pm 3,7	30,8 \pm 4,2	29,8 \pm 4,4
Especies observadas	624,8 \pm 82,3	634,5 \pm 83,8	619,6 \pm 91,4	649,6 \pm 75,5	615,1 \pm 83,4	601,4 \pm 83,5

Tabla 10b: Diferencias significativas entre muestras iniciales y finales dentro de cada tratamiento

	B-D10	E-D10	B-D20	E-D20	B-D0	E-D0
Chao 1	1141 \pm 155	1146 \pm 154	1152 \pm 186	1282 \pm 192	1402 \pm 276	1104 \pm 126 ^C
PD árbol completo	30,8 \pm 4,2	31,2 \pm 4,1	30,8 \pm 4,2	31,2 \pm 4,2	31,7 \pm 3,7	29,8 \pm 4,4
Especies observadas	624,8 \pm 82,3	619,6 \pm 91,4	615,1 \pm 83,4	634,5 \pm 83,8	649,6 \pm 75,5	601,4 \pm 83,5

Comparaciones de comunidades usando Diversidad Beta

Las comparaciones entre comunidades (diversidad beta) revelaron la separación de algunas comunidades dependiendo de las medidas de distancia utilizadas. Se probaron distancias euclidianas no filogenéticas (euclíadiana binaria y Bray Curtis) y distancias filogenéticas (Unifrac G, Unifrac ponderada y Unifrac no ponderada) con Jackknife para determinar las diferencias en la estructura de la comunidad entre las muestras y los factores que probablemente contribuyan a estas diferencias. El agrupamiento de análisis de coordenadas principales (PCoA) de distancias euclidianas no filogenéticas indicó comunidades al final de los tratamientos SCF D10 y D20 separadas de aquellas al final del D0 y todas las muestras iniciales (Figuras 6 y 7). La separación fue más evidente utilizando distancias euclidianas binarias (Figura 7). La separación se puede ver en el primer eje de PCoA que representó el 12,11 % de la variación y, hasta cierto punto, a lo largo del segundo eje de PCoA que representó el 9,48 % de la variación. Mientras que al usar cualquiera de las distancias filogenéticas de Unifrac, la agrupación de muestras fue más sujeto que por tratamiento (ejemplo Unifrac G, Figura 8). Esto indica que la composición filogenética de las comunidades es más similar dentro de un sujeto que entre sujetos. Esto es similar a informes anteriores de alta variación entre el microbioma intestinal de los humanos. Estas distancias euclidianas y filogenéticas se calculan utilizando diferentes criterios que brindan información sobre los factores que contribuyen a las diferencias en las comunidades microbianas intestinales. Por ejemplo, las distancias euclidianas se basan en la presencia o ausencia de cada OTU (unidad taxonómica operativa) en cada comunidad. Esto indica que la presencia o ausencia de taxones específicos contribuye a las diferencias en la comunidad.

Permutación multivariante ANOVA no paramétrica

ANOVA multivariante de permutación no paramétrica (perMANOVA) después de la corrección de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los tratamientos que se vieron como grupos en los diagramas de dispersión de coordenadas principales (PCoA) del análisis de diversidad beta. Se encontraron diferencias significativas entre comunidades en las muestras de inicio y final de las dietas D10 y D20 con sus respectivas muestras de inicio utilizando las distancias euclidianas medidas (Bray Curtis, euclíadiana binaria) pero no las medidas filogenéticas (distancias Unifrac) (Tabla 11, resultados también se muestran en las Figuras 6-8). También hubo diferencias significativas en las distancias Euclíadiana y Bray Curtis entre las muestras finales de la dieta D20 en comparación con las D0 finales. Las muestras finales de las dietas D10 y D0 también difirieron significativamente pero solo usando distancias euclidianas. También hubo diferencias en las distancias Unifrac G, pero debido a que también se encontraron diferencias entre las muestras iniciales, es posible que no sea el resultado de los tratamientos con SCF. Antes de las correcciones de Bonferroni había diferencias más significativas (Tabla 11), pero en el presente documento hemos optado por centrarnos en el límite más estricto. Sin embargo, los datos se han incluido en el informe porque la rigurosidad de Bonferroni puede incluir falsos negativos. Independientemente, estos resultados ilustran claramente que las comunidades microbianas de los sujetos al final del tratamiento de dieta SCF D20 diferían más, lo que sugiere que fue el código para la dosis más alta de SCF administrada a los sujetos.

Tabla 11: Resumen de per MANOVA utilizando varias medidas de distancia beta de comunidades (proporción promedio de géneros) entre el comienzo (B) y el final (E) de cada tratamiento SCF (10, 20 y 0 g/día)

Medida de distancia	B-D10 v E-D10	B-D20 v E-D20	B-DO v E-DO	B-D10 v B-D20	B-D10 v B-DO	B-D20 v B-DO	E-D10 v E-DO	E-D10 v E-DO	E-D20 v E-DO
Bray-Curtis	0,0003	0,0000	1,0000	0,9999	1,0000	0,9999	0,9994	0,0038	0,0000

Medida de distancia	B-D10 v E-D10	B-D20 v E-D20	B-DO v E-D0	B-D10 v B-D20	B-D10 v B-D0	B-D20 v B-D0	E-D10 v E-D20	E-D10 v E-D0	E-D20 v E-D0
Euclíadiana	0,0000	0,0000	0,9999	0,9998	1,0000	0,9985	0,9778	0,0004	0,0000
Unifrac g	0,3002	0,2936	0,0056	0,0106	0,0115	0,0020	0,0311	0,0000	0,0000
Unifrac no ponderado	0,4507	0,0360	0,8434	1,0000	1,0000	0,9984	0,9999	0,9538	0,3064
Unifrac ponderado	0,3544	0,0133	0,9876	0,9030	0,9863	0,9878	0,8203	0,3676	0,0468

Con corrección de Bonferroni

Medida de distancia	B-D10 v E-D10	B-D20 v E-D20	B-DO v E-D0	B-D10 v B-D20	B-D10 v B-D0	B-D20 v B-D0	E-D10 v E-D20	E-D10 v E-D0	E-D20 v E-D0
Bray-Curtis	0,0051	0,0002	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0575	0,0003
Euclíadiana	0,0003	0,0002	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0054	0,0002
Unifrac g	1,0000	1,0000	0,0846	0,1590	0,1727	0,0303	0,4670	0,0003	0,0002
Unifrac no ponderado	1,0000	0,5400	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Unifrac ponderado	1,0000	0,1992	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7026

- 5 La descripción anterior de realizaciones de la presente invención se ha presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No pretende ser exhaustivo ni limitar la invención a las formas precisas descritas. Como reconocerá el experto en la materia, son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de la enseñanza anterior. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones en la presente invención sin apartarse del ámbito de la invención. Por lo tanto, se pretende que la presente invención cubra las modificaciones y variaciones de esta invención siempre que estén dentro del ámbito de las reivindicaciones.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición comestible que comprende fibra de maíz soluble y una o más poblaciones bacterianas seleccionadas de los géneros *Butyricoccus* y *Oscillibacter*.
- 5 2. La composición comestible según la reivindicación 1, en la que la fibra de maíz soluble se elabora mediante un proceso que comprende:
 - 10 proporcionar una composición de alimentación acuosa que es un jarabe de dextrosa o un jarabe hecho por hidrólisis de almidón de maíz, teniendo la composición de alimentación acuosa una concentración de sólidos de al menos 90 % en peso; y
 - 15 poner en contacto la composición de alimentación durante un tiempo en el intervalo de 0,1-15 minutos a una temperatura de al menos 149 °C con al menos un catalizador que acelera la velocidad de escisión o la formación de enlaces glucosilo,
 - 20 donde el al menos un catalizador es un ácido añadido a la composición de alimentación en una cantidad suficiente para hacer que el pH de la composición de alimentación sea de 1,0 - 2,5, para formar una composición de producto que sea al menos 50 % en peso sobre una base de sólidos secos de digestión lenta identificada como de digestión lenta o resistente a la digestión por el Ensayo Englyst, la composición del producto incluye menos del 50 % sobre una base de sólidos secos de monosacáridos residuales.
 - 25 3. La composición comestible de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una o más poblaciones de bacterias seleccionadas del género *Butyricoccus*.
 4. La composición comestible de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una o más poblaciones de bacterias seleccionadas del género *Oscillibacter*.
 - 30 5. La composición comestible de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende dos o más poblaciones de bacterias, cada una de un género diferente seleccionado de *Butyricoccus* y *Oscillibacter*.
 - 35 6. La composición comestible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la composición comprende al menos 2,5 g de fibra de maíz soluble por porción.
 7. La composición comestible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición comprende no más de aproximadamente 100 g de fibra de maíz soluble por porción.
 - 40 8. Una composición comestible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para usar en el aumento de una o más poblaciones de bacterias colónicas en un sujeto mamífero seleccionado de los géneros *Butyricoccus* y *Oscillibacter*.
 9. La composición comestible para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la fibra de maíz soluble se administra a una tasa de al menos aproximadamente 10 g/día, en el transcurso de al menos dos semanas.
 - 45 10. Una composición que comprende fibra de maíz soluble para uso en el aumento de una o más poblaciones de bacterias colónicas en un sujeto mamífero seleccionado de los géneros *Butyricoccus* y *Oscillibacter* en un sujeto.
 11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la fibra de maíz soluble se elabora mediante un proceso que comprende:
 - 50 proporcionar una composición de alimentación acuosa que es un jarabe de dextrosa o un jarabe hecho por hidrólisis de almidón de maíz, teniendo la composición de alimentación acuosa una concentración de sólidos de al menos 90 % en peso; y
 - 55 poner en contacto la composición de alimentación durante un tiempo en el intervalo de 0,1-15 minutos a una temperatura de al menos 149 °C con al menos un catalizador que acelera la velocidad de escisión o la formación de enlaces glucosilo,
 - 60 en la que el al menos un catalizador es un ácido añadido a la composición de alimentación en una cantidad suficiente para hacer que el pH de la composición de alimentación sea de 1,0 - 2,5, para formar una composición de producto que sea al menos 50 % en peso sobre una base de sólidos secos de digestión lenta identificada como de digestión lenta o resistente a la digestión por el Ensayo Englyst, la composición del producto incluye menos del 50 % sobre una base de sólidos secos de monosacáridos residuales.
 - 65 12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que al menos una de la una o más poblaciones bacterianas aumentadas es del género *Butyricoccus*.

13. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que al menos una de la una o más poblaciones bacterianas aumentadas es del género *Oscillibacter*.
- 5 14. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en la que la fibra de maíz soluble se administra a una tasa de al menos aproximadamente 10 g/día, en el transcurso de al menos dos semanas.

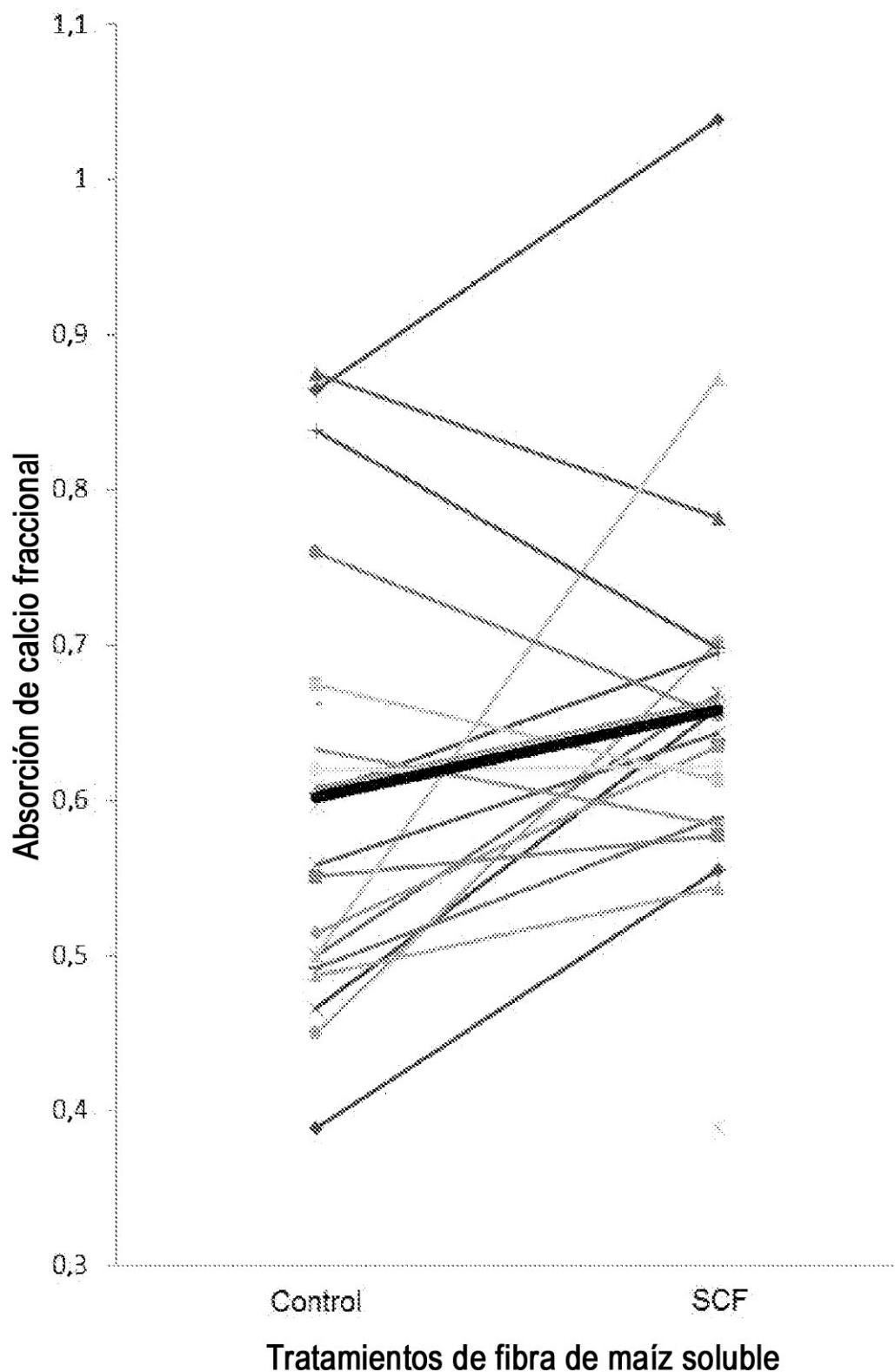


FIG. 1

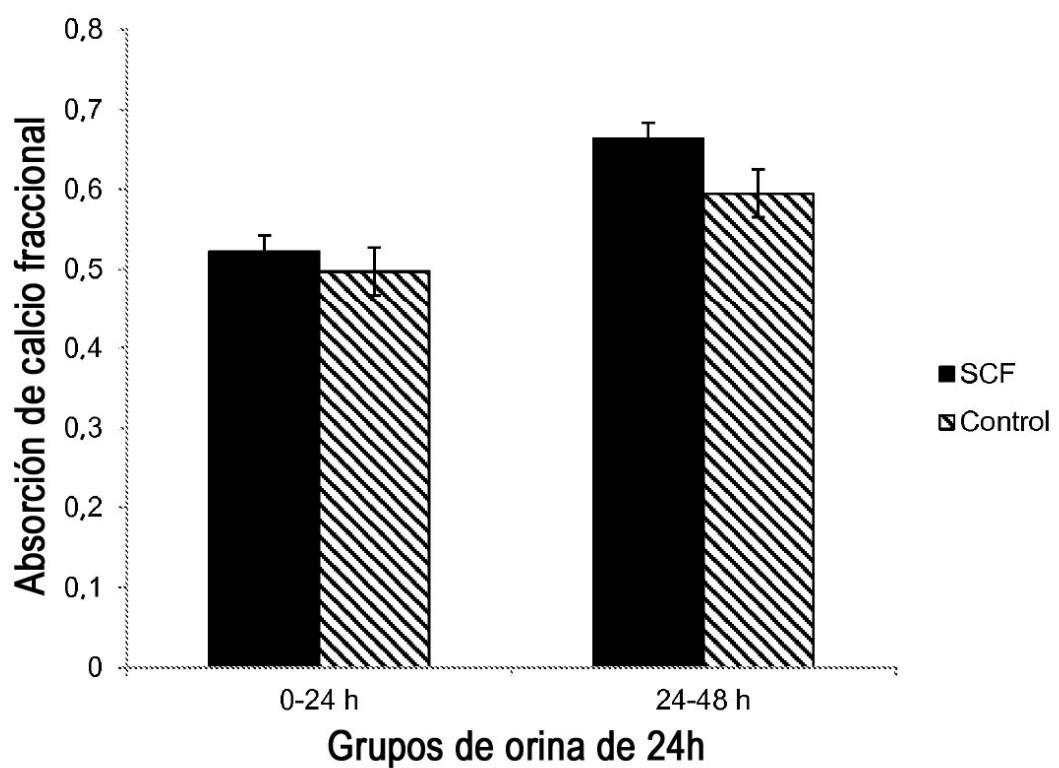


FIG. 2

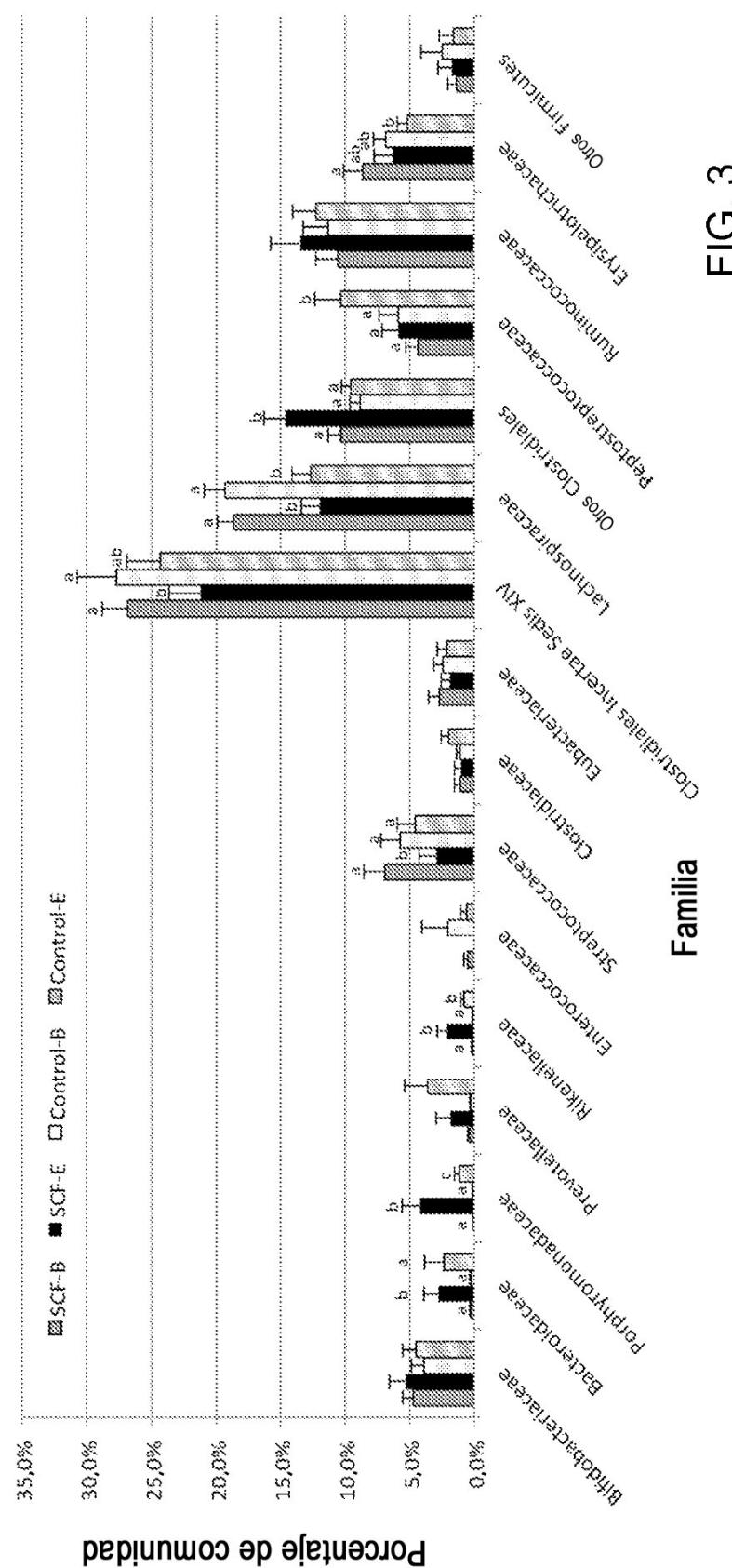
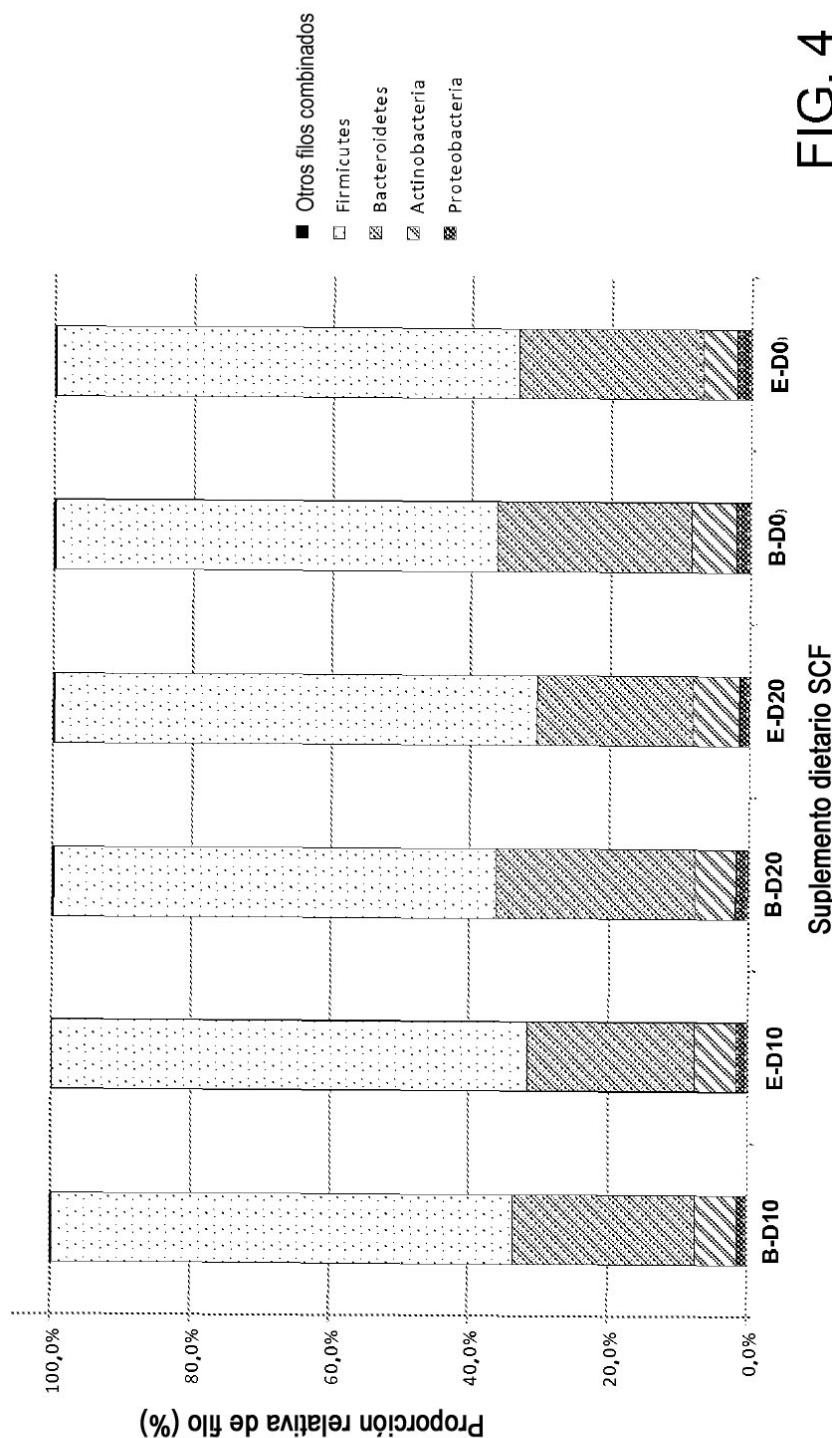


FIG. 3

FIG. 4



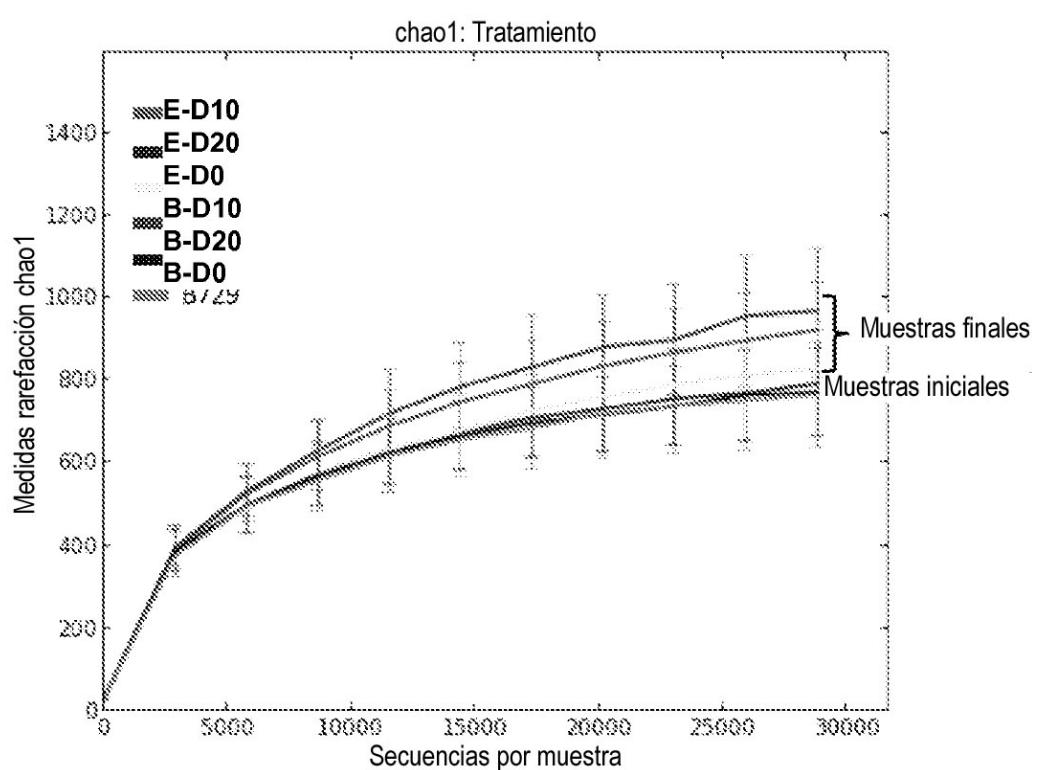


FIG. 5

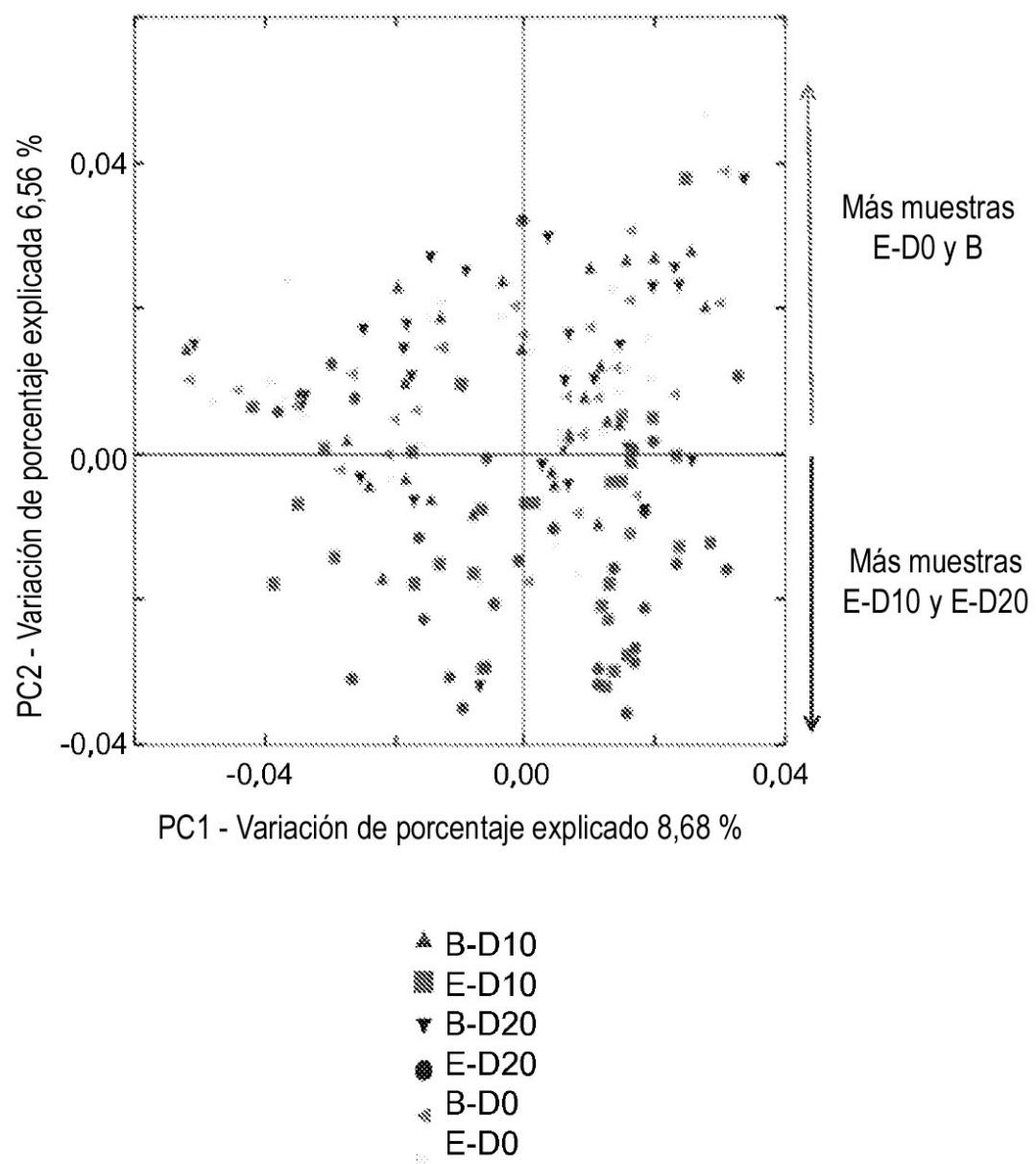


FIG. 6

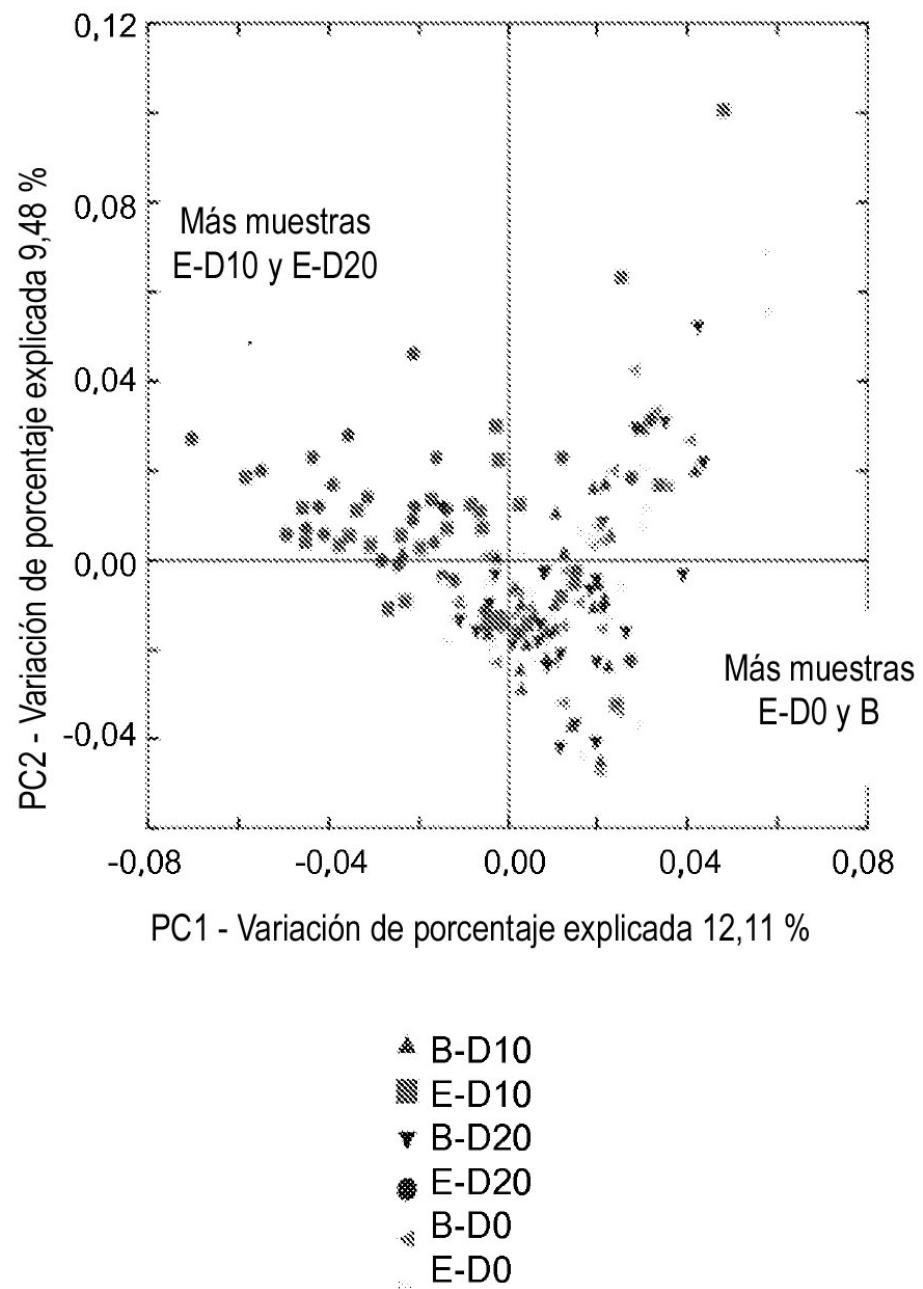


FIG. 7

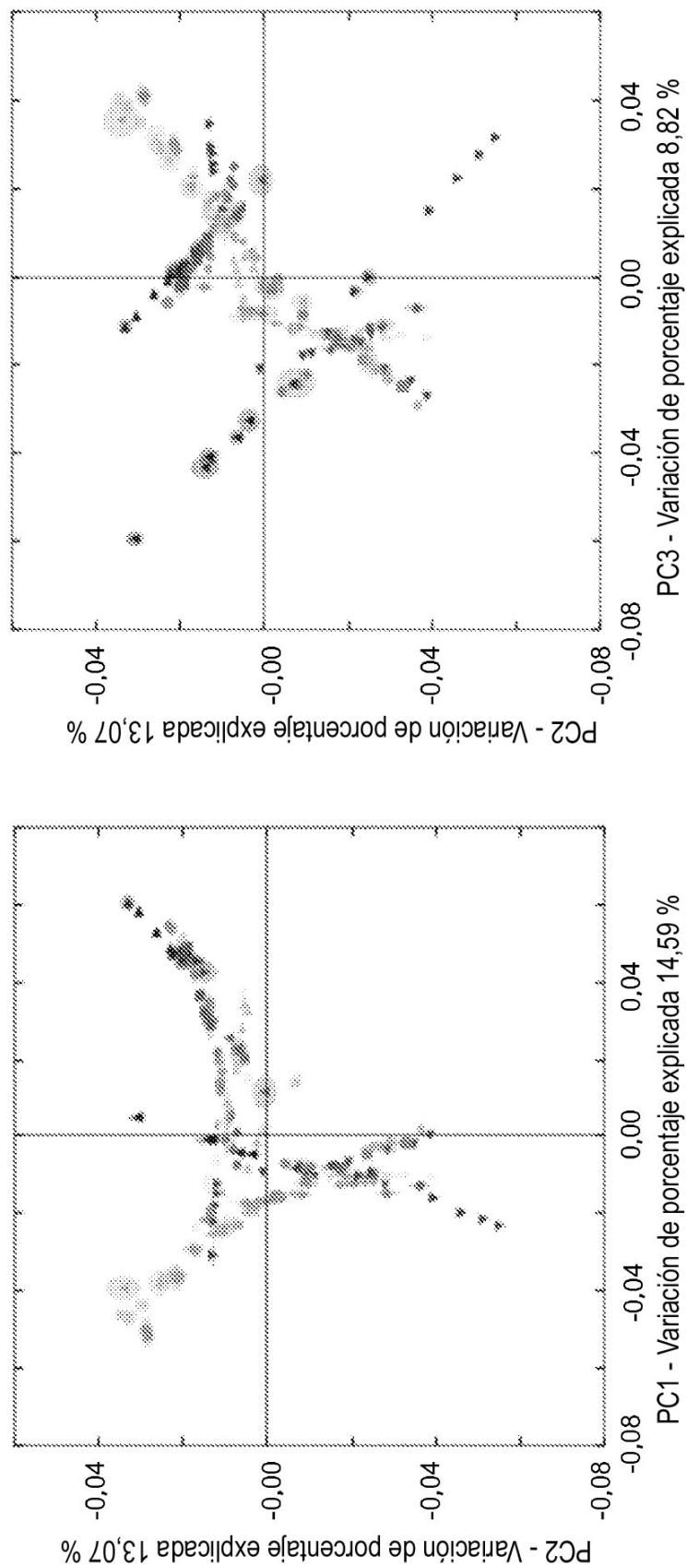


FIG. 8

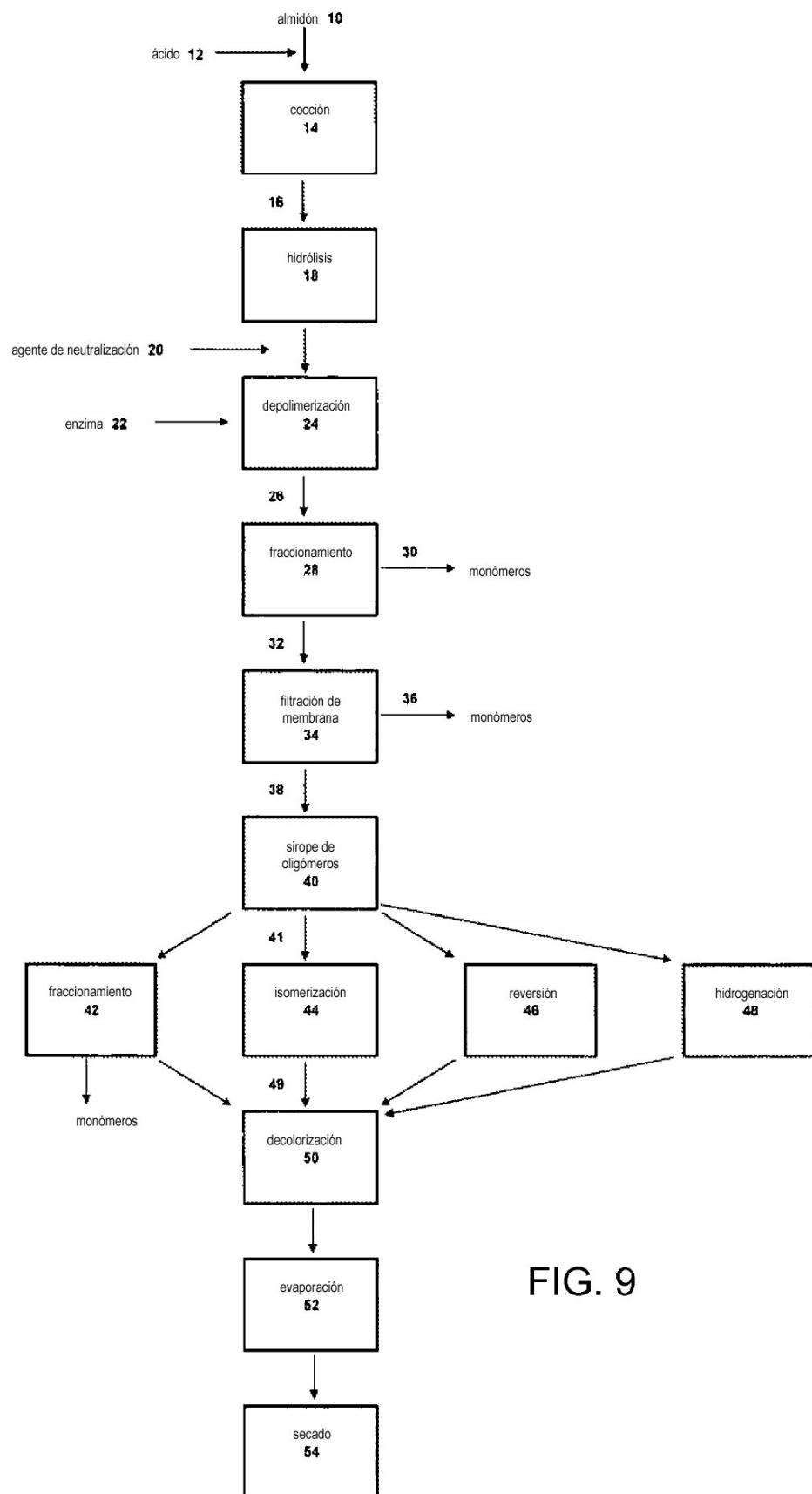


FIG. 9