

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 797**

51 Int. Cl.:

A23L 33/145 (2006.01)

A23L 33/14 (2006.01)

A61K 36/064 (2006.01)

A23L 31/15 (2006.01)

A23C 9/20 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2019** **E 19305090 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 3685681**

54 Título: **Un producto de levadura y una composición que lo comprende, para su uso como agente prebiótico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:

LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)
41, rue Etienne Marcel
75001 Paris, FR

72 Inventor/es:

RODRIGUEZ, BERTRAND

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 989 797 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

Un producto de levadura y una composición que lo comprende, para su uso como agente prebiótico

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de la nutrición y salud humana y/o animal. La presente invención, que se define por las reivindicaciones, se refiere particularmente a un producto de levadura para su uso como agente prebiótico, y a una composición que lo comprende. También se refiere al uso no terapéutico de un producto de levadura y una composición que lo comprende como agente prebiótico. El producto de levadura y la composición que lo compone estimulan el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de los mamíferos, independientemente de la composición microbiana inicial del donante y del enterotipo.

Antecedentes técnicos

Los oligosacáridos no digeribles (NOD) resisten la digestión y la absorción en el intestino delgado humano, por lo que se fermentan total o parcialmente en el intestino grueso. Estos carbohidratos ayudan a mantener la regularidad del funcionamiento del colon y pueden contribuir a la salud humana al reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Muchos NOD se consideran agentes prebióticos.

La actividad de un agente prebiótico sobre la microbiota intestinal de los mamíferos, particularmente la microbiota intestinal humana, se puede evaluar sobre la base del crecimiento de bacterias promotoras de la salud tales como *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*, la disminución de patógenos intestinales y el aumento o disminución de la producción de metabolitos bacterianos relacionados con la salud. Entre estos últimos se incluyen, por ejemplo, los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), tales como el acetato, el propionato y el butirato, que generalmente se consideran positivos para la salud del colon, mientras que el amoníaco y los SCFA ramificados se consideran factores de riesgo para la carcinogénesis del colon.

Sin embargo, *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* son dos géneros que constituyen sólo un grupo menor dentro del microbioma intestinal, en particular la microbiota intestinal humana. Han recibido mucha atención debido a la definición inicial de un compuesto prebiótico que mencionaba que los compuestos prebióticos deberían ser fermentados selectivamente por grupos bacterianos específicos, incluidas *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, lo que resulta en posibles efectos promotores de la salud. Como resultado de esta definición estrecha, muchos de los estudios iniciales centrados en los efectos prebióticos de las nuevas fibras han estado aplicando un enfoque específico centrado en estos dos grupos, descuidando de este modo el efecto potencial de los prebióticos en una gran cantidad de otros microorganismos intestinales.

La microbiota intestinal comprende una enorme diversidad de microorganismos. Por ejemplo, las bacterias de los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* están presentes en la microbiota intestinal. El crecimiento de algunas de estas bacterias ha demostrado ser beneficioso, ya que promoverían una fermentación saludable y particularmente aumentarían la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como acetato, propionato y butirato.

Las composiciones que comprenden material de pared celular de levadura y sus usos se divulgan, por ejemplo, en los documentos US 2017/080015 A1 y WO 2005/021015 A1.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar nuevos agentes prebióticos adecuados para estimular la microbiota intestinal de los mamíferos y, en particular, para estimular el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes*.

Resumen de la invención

Un primer objeto de la invención, que se define por las reivindicaciones, es proporcionar un producto de levadura, o una composición que lo comprenda, para su uso como agente prebiótico para estimular el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes*, en la microbiota intestinal de los mamíferos; en el que el producto de levadura comprende una subfracción soluble de las paredes de las células de levadura o una fracción de la misma. Según la invención, dicha subfracción soluble se obtiene sometiendo células de levadura completas a un tratamiento de disrupción, separando una fracción soluble de una fracción insoluble, luego tratando la fracción insoluble con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar una subfracción insoluble rica en proteínas de una subfracción soluble; o sometiendo células de levadura completas a un tratamiento de disrupción, luego tratando la mezcla obtenida con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar una subfracción insoluble rica en proteínas de una subfracción soluble.

En algunas realizaciones, el producto de levadura, o una composición que lo comprende, se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y/o *Wickehomomyces*; preferiblemente, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en las especies

Saccharomyces cerevisiae, *Pichia jadinii*, *Kluyveromyces marxianus*; más preferiblemente en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

5 En algunas realizaciones, las bacterias del filo *Bacteroidetes* son bacterias de la clase *Bacteroidia*; preferiblemente bacterias del orden *Bacteroidales*; más preferiblemente bacterias de la familia *Bacteroidaceae*; aún más preferiblemente bacterias del género *Bacteroides*; más preferiblemente *Bacteroides ovatus* spp.

En algunas realizaciones, el producto de levadura aumenta la proporción de bacterias del filo *Bacteroidetes* frente a las bacterias del filo *Firmicutes* en la microbiota intestinal de los mamíferos.

10 En algunas realizaciones, el agente prebiótico se selecciona del grupo que consiste en levaduras enteras desactivadas, paredes celulares de levadura, fracciones de las paredes celulares de levadura o mezclas de las mismas; preferiblemente, el agente prebiótico se selecciona del grupo que consiste en paredes celulares de levadura, sus fracciones o mezclas de las mismas.

En algunas realizaciones, el tratamiento de disrupción es una plasmólisis térmica.

15 En algunas realizaciones, el producto de levadura tiene un contenido de β -glucano (expresado como masa equivalente de glucosa) desde 15 al 50 % en masa sobre una base de materia seca; y/o un contenido de manano (expresado como masa equivalente de manosa) desde 10 al 40 % en masa sobre una base de materia seca.

En algunas realizaciones, el producto de levadura no estimula el crecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium*; preferiblemente bacterias de la familia *Bifidobacteriaceae*; más preferiblemente bacterias del orden *Bifidobacteriales*.

20 En algunas realizaciones, el producto de levadura no estimula el crecimiento de bacterias del género *Lactobacilo*; preferiblemente bacterias de la familia *Lactobacillaceae*; más preferiblemente bacterias del orden *Lactobacillales*.

25 En algunas realizaciones, el producto de levadura, o la composición que lo comprende, se administra por vía oral; preferiblemente en el que el producto de levadura, o la composición que lo comprende, se administra por vía oral en una dosis diaria desde 500 mg a 15 g; preferiblemente en el que el producto de levadura, o la composición que lo comprende, se administra por vía oral en una dosis diaria desde 500 mg a 5 g en hasta 10 tomas.

En algunas realizaciones, la composición se formula como una goma, un comprimido, una cápsula, una píldora, un polvo, gránulos o una suspensión.

30 El producto de levadura anterior, o una composición que lo comprende, también puede usarse para prevenir o limitar patologías intestinales tales como diarreas y síndrome del intestino irritable, para estimular la inmunidad, para regular la glucemia y/o lipidemia, para tratar o limitar trastornos metabólicos asociados a la obesidad.

35 Un tercer objeto de la invención es proporcionar el uso no terapéutico del producto de levadura definido anteriormente, o una composición que lo comprende, como se define en el presente documento, como un agente prebiótico para estimular el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de los mamíferos; en el que el producto de levadura es la subfracción soluble definida anteriormente de las paredes de las células de levadura o una fracción de las mismas.

En algunas realizaciones, la composición es un alimento o un suplemento alimenticio; preferiblemente un producto lácteo, un producto a base de fruta, una bebida, un alimento sólido o un suplemento alimenticio.

40 La presente invención, que se define por las reivindicaciones, permite abordar la necesidad de la técnica anterior. En particular, la invención proporciona un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para estimular el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de los mamíferos. Por "estimulación del crecimiento" se refiere a aumentar la población de bacterias del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de los mamíferos y/o aumentando su abundancia relativa frente a otras bacterias.

45 El producto de levadura comprende las paredes de las células de levadura o una fracción de las mismas. Por lo tanto, el producto de levadura, o la composición que lo comprende, es adecuado para su uso como agente prebiótico. Por "agente prebiótico" se refiere a un producto alimenticio no digerible o no totalmente digerible que afecta beneficiosamente al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias beneficiosas en el colon, mejorando así la salud del hospedador. Los agentes prebióticos se diferencian de los agentes probióticos en que el agente prebiótico no es un organismo vivo.

50 Los inventores han demostrado que la levadura, especialmente *Saccharomyces cerevisiae* o sus derivados, regula la microbiota intestinal, en particular estimulando el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes*, tal como las bacterias del género *Bacteroides*. Por lo tanto, se ha demostrado que los productos de levadura tienen un potencial prebiótico sobre la microbiota intestinal, al influir de forma positiva y selectiva tanto en su

metabolismo como en su composición. Este potencial prebiótico es particularmente beneficioso para prevenir o limitar patologías intestinales tales como diarreas y síndrome del intestino irritable, para estimular la inmunidad, para regular la glucemia y/o lipidemia, para tratar o limitar trastornos metabólicos asociados a la obesidad (por ejemplo, tolerancia a la glucosa y enfermedad del hígado graso).

5 Descripción de las realizaciones

La invención se describirá ahora con más detalle sin limitación en la siguiente descripción.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un producto de levadura tal como se define en las reivindicaciones, o una composición que lo comprende, para su uso como agente prebiótico para estimular el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes*, en la microbiota intestinal de los mamíferos. En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso no terapéutico de un producto de levadura según se define en las reivindicaciones, o una composición que lo comprende, para su uso como agente prebiótico para estimular el crecimiento de bacterias de filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de los mamíferos.

En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

En otras realizaciones, el mamífero es un animal.

15 los usos terapéuticos y no terapéuticos del producto de levadura dependen del sujeto a quien se administra.

Si el sujeto está sano, el producto de levadura puede administrarse para mantener el bienestar del sujeto y facilitar el funcionamiento del tracto gastrointestinal. El producto de levadura se puede utilizar de forma no terapéutica, por ejemplo, como complemento alimenticio, por ejemplo, para preservar el bienestar digestivo.

20 Si el sujeto está afectado o corre el riesgo de estar afectado por trastornos gastrointestinales o cualquier condición relacionada, el producto de levadura puede administrarse para prevenir, tratar o limitar tales trastornos y para restaurar o preservar el funcionamiento normal del tracto gastrointestinal. El producto de levadura puede luego usarse terapéuticamente y formularse como una composición farmacéutica.

25 El producto de levadura comprende las paredes de las células de levadura o una fracción de las mismas. Los inventores han demostrado que las paredes celulares de levadura o fracciones de las mismas son particularmente ventajosas.

La levadura puede seleccionarse del grupo que consiste en los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y/o *Wickehomomyces*; preferiblemente del grupo que consiste en las especies de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia jadinii* y *Kluyveromyces marxianus*. Más preferiblemente, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae* spp.

30 La levadura puede ser en particular levadura de panadería y/o levadura de cerveza.

La levadura comprende un citoplasma rodeado por una membrana celular. El citoplasma comprende compartimentos intracelulares, incluidos el núcleo, la mitocondria y el aparato de Golgi. La membrana celular está rodeada por la pared celular. El espacio entre la membrana y la pared celular forma el periplasma.

35 El producto de levadura puede seleccionarse del grupo que consiste en levadura entera desactivada, paredes celulares de levadura, fracciones de paredes celulares de levadura o mezclas de las mismas.

40 El producto de levadura, tal como las paredes celulares de levadura, se obtiene mediante tratamientos de disrupción convencionales. Tras la aplicación de un tratamiento de disrupción, se obtiene una fracción insoluble de células de levadura, que comprende las paredes celulares de la levadura. El tratamiento de disrupción puede ser un tratamiento bioquímico y/o un tratamiento mecánico. La disrupción mecánica puede obtenerse mediante perlas de vidrio, homogeneización presurizada, ultrasonidos o microondas. El tratamiento bioquímico puede seleccionarse del grupo que consiste en autólisis, plasmólisis térmica, hidrólisis enzimática, choque osmótico y/o ciclos repetidos de congelación-descongelación.

45 Lyside® Wall Basic es un ejemplo de producto de pared celular de levadura disponible comercialmente adecuado para implementar la invención reivindicada. Lyside® Wall Basic comprende desde aproximadamente 20 % a aproximadamente 29 % de β -1,3/1,6-glucanos, desde aproximadamente 18 % a aproximadamente 25 % de mananos y tiene una materia seca de al menos 94 %, en peso total del producto. El contenido de nutrientes de Lyside® Wall Basic es el siguiente: desde aproximadamente 10.0 % a aproximadamente 31.2 % de proteína, desde aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % de lípidos, desde aproximadamente 38 % de carbohidratos totales y de aproximadamente 3 % a aproximadamente 9 % de cenizas, por peso total del producto.

Se conocen métodos para obtener paredes celulares de levadura o fracciones de las mismas. Por ejemplo, los documentos la aplicación europea EP2170359, Solicitud PCT WO2005/021015 y Solicitud PCT WO2009/013357 divulgan productos de levadura compuestos por paredes celulares de levadura, que

comprenden un contenido específico total de materia seca de glucano y manano en peso, y un contenido específico de materia seca de glucógeno en peso.

5 En una realización, el producto de levadura puede ser una subfracción soluble obtenida sometiendo células de levadura completas a una plasmólisis térmica, luego tratando la mezcla obtenida con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar la subfracción insoluble rica en proteínas desde la subfracción soluble.

En una realización, el producto de levadura puede ser una subfracción soluble obtenida sometiendo células de levadura completas a una plasmólisis térmica, luego separando la fracción insoluble desde la fracción soluble, luego tratando la fracción insoluble obtenida con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar la subfracción insoluble rica en proteínas desde la subfracción soluble.

10 Los métodos para obtener tales subfracciones insolubles ricas en proteínas se divulgan en la unpublished French application 1853748 presentada el 27 de abril de 2018.

15 La subfracción insoluble rica en proteínas comprende menor que 3 % de nucleótidos y al menos el 72 % de proteínas. La subfracción soluble final comprende desde 45 a 70 % de carbohidratos en peso total de la fracción soluble. Los carbohidratos comprenden desde 25 a 40 % de glucanos y desde 25 a 35 % de mananos del peso total de los carbohidratos. La subfracción soluble también puede comprender nucleótidos, cuando se lleva a cabo una etapa de tratamiento con desaminasas.

20 La plasmólisis térmica puede llevarse a cabo a una temperatura de al menos 45 °C, preferiblemente entre 70 y 95 °C durante un período de tiempo según los expertos en la técnica, preferiblemente desde 30 s a 4 h, aun preferiblemente desde 1 min a 3 h, más preferiblemente desde 40 min a 2 h. La etapa de tratamiento con ribonucleasas y glucanasas puede llevarse a cabo a una temperatura entre 40 y 65 °C, preferiblemente 60 °C, y durante un período de tiempo desde 8 a 24 h; preferiblemente 18 h.

La etapa de tratamiento con ribonucleasas y glucanasas también puede llevarse a cabo en presencia de desaminasas.

25 La etapa de separación de la subfracción insoluble rica en proteínas desde la subfracción soluble se puede llevar a cabo en etanol, un disolvente o CO₂ supercrítico, con el fin de eliminar lípidos y aumentar la proporción de proteínas.

La preparación del producto de levadura puede comprender una etapa de secado, tal como secado por pulverización, secado al vacío, secado en lecho fluidizado, secado en tambor y/o liofilización.

30 En algunas realizaciones, el producto de levadura está preferiblemente libre de membrana celular de levadura, citoplasma de levadura y compartimentos celulares, sus derivados o mezclas de los mismos.

El producto de levadura no es un extracto de levadura y no contiene dicho extracto de levadura. Un extracto de levadura es la fracción soluble obtenida directamente al someter células de levadura completas a un tratamiento de disrupción, como un tratamiento bioquímico y/o un tratamiento mecánico.

35 El producto de levadura no es una levadura entera viva, como la levadura seca instantánea o la levadura seca activa.

Preferiblemente, el producto de levadura comprende glucanos.

40 El producto de levadura, y preferiblemente las paredes celulares de levadura o el derivado de la pared celular de levadura, pueden tener un contenido de β-glucano (expresado como masa equivalente de glucosa) desde 15 a 50 %, preferiblemente desde 20 a 40 %, más preferiblemente desde 20 a 30 %, en masa sobre una base de materia seca.

Preferiblemente, el glucano comprende β-1,3-glucanos, β-1,6-glucanos o combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, el producto de levadura comprende mananos, ya sea en forma libre o en forma de complejos de manoproteína.

45 El producto de levadura, y preferiblemente las paredes celulares de levadura o la fracción de pared celular de levadura, pueden tener un contenido de manano (expresado como masa equivalente de manosa) desde 10 a 40 %, preferiblemente desde 15 a 30 %, más preferiblemente desde 18 a 25 %, en masa sobre una base de materia seca.

50 El producto de levadura, y preferiblemente las paredes celulares de levadura o la fracción de pared celular de levadura, pueden tener un contenido de materia seca de al menos 90 %, preferiblemente de al menos 95 %, más preferiblemente de 98 %, en masa.

El potencial prebiótico del producto de levadura según la invención puede evaluarse, por ejemplo, utilizando un modelo *in vitro* a corto plazo que simula la fermentación en el colon proximal humano.

Un modelo adecuado es el Simulador del Ecosistema Microbiano Humano continuo, conocido como SHIME®, que se ha utilizado durante muchos años y validado con parámetros *in vivo*, y que consta de cinco reactores secuenciales que modelan el estómago, el intestino delgado y los tres compartimentos del colon (ascendente, transversal y descendente). También se han desarrollado versiones simplificadas.

El modelo de simulación a corto plazo *in vitro* permite establecer y probar comunidades microbianas representativas, que difieren tanto en la composición como en la funcionalidad en las diferentes regiones del colon. El potencial de un agente prebiótico sobre el metabolismo de la microbiota intestinal se puede evaluar controlando y midiendo diferentes parámetros relativos a la fermentación microbiana general, los cambios en la actividad microbiana y los cambios en la composición de la comunidad microbiana.

La fermentación microbiana general se puede controlar midiendo el pH y la producción de gas. Los cambios en la actividad microbiana pueden evaluarse comparando la cinética de la producción de metabolitos bacterianos (incluidos los SCFA y el lactato). Los cambios en la composición de la comunidad microbiana pueden evaluarse cuantificando secuencias bacterianas específicas (genes de ARNr 16S) mediante amplificación (qPCR dirigida y secuenciación de Illumina basada en 16S).

El control del pH durante una incubación colónica proporciona una buena indicación de la producción de SCFA, lactato. En general, se observa una caída del pH durante las primeras 24 h de incubación debido a la formación de SCFA y lactato. Esta caída del pH suele ir seguida de un aumento del pH durante las siguientes 24 h de incubación debido a la fermentación proteolítica.

La producción de gas es una buena medida de la actividad microbiana general y, de este modo, la velocidad de fermentación.

La producción de SCFA es resultado del metabolismo de los carbohidratos en el colon y está relacionada con diversos efectos sobre la salud. Los SCFA producidos con mayor abundancia consisten en acetato, propionato y butirato. Mientras que el acetato puede utilizarse como fuente de energía para el hospedador y como sustrato potencial para la síntesis de lípidos en el organismo, el propionato reduce la síntesis de colesterol y ácidos grasos en el hígado (efecto beneficioso sobre la homeostasis metabólica). El butirato, por otro lado, es una fuente importante de energía para los colonocitos e induce la diferenciación en estas células (relacionada con la prevención del cáncer), así como un modulador de la respuesta inmune en la mucosa intestinal (relacionado con un aumento en el número de células T reguladoras). Los niveles totales de SCFA reflejan la fermentación general de los ingredientes de prueba.

En algunas realizaciones, el producto de levadura de la presente invención estimula el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de los mamíferos independientemente de la composición microbiana inicial del donante y del enterotipo. El producto de levadura puede estimular el crecimiento de bacterias de la clase *Bacteroidia*; preferiblemente bacterias del orden *Bacteroidales*; más preferiblemente bacterias de la familia *Bacteroidaceae*; aún más preferiblemente bacterias del género *Bacteroides*; más preferiblemente *Bacteroides ovatus* spp.

En algunas realizaciones, el producto de levadura no estimula el crecimiento de bacterias del orden *Bifidobacteriales*; preferiblemente bacterias de la familia *Bifidobacteriaceae*; más preferiblemente bacterias del género *Bifidobacterium*. Asimismo, el producto de levadura puede no estimular el crecimiento de bacterias del orden *Lactobacillales*; preferiblemente bacterias de la familia *Lactobacillaceae*; más preferiblemente bacterias del género *Lactobacillus*.

En algunas realizaciones, el producto de levadura aumenta la proporción de bacterias del filo *Bacteroidetes* frente a las bacterias del filo *Firmicutes*. Se ha informado que la proporción de *Bacteroidetes* frente a *Firmicutes* es mayor en sujetos delgados en comparación con los obesos. Además, el aumento de esta proporción se ha asociado a la prevención de trastornos relacionados con la obesidad (aumento de peso, intolerancia a la glucosa o trastornos del hígado graso).

El producto de levadura puede administrarse por vía oral. El producto de levadura puede administrarse en una dosis diaria eficaz, por ejemplo, en una dosis diaria desde 500 mg a 15 g. La dosis diaria eficaz podrá administrarse hasta en diez tomas, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o más tomas. El producto de levadura puede administrarse como tal o en una composición, en una forma más adecuada para la administración oral.

La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes farmacéuticos activos.

La composición también puede ser un alimento y/o un complemento alimenticio. La composición puede ser un producto lácteo, un producto a base de fruta, una bebida, un alimento sólido o cualquier otro producto

comestible adecuado. La composición puede ser una composición nutracéutica, un suplemento dietético o cualquier otro suplemento alimenticio adecuado.

La composición puede ser un líquido, una pasta o una composición sólida.

- 5 La composición puede comprender uno o más componentes adicionales. Los componentes adicionales pueden ser vitaminas (por ejemplo, A, C, D, E, K, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12 o mezclas de las mismas), minerales (por ejemplo, calcio, fósforo, sodio, magnesio, hierro o mezclas de los mismos).

La composición está preferiblemente libre de extracto de levadura.

La composición está preferiblemente libre de levadura entera viva, tal como levadura seca instantánea o levadura seca activa.

- 10 El producto de levadura puede formularse como un comprimido, una cápsula, una píldora, un polvo, una goma, gránulos o una suspensión. Si se formula como polvo o gránulos, el agente prebiótico, o la composición que lo comprende, puede envasarse en una bolsita o en cualquier envase alternativo adecuado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla.

- 15 Ejemplo 1 - Evaluación in vitro del potencial prebiótico de una fracción de la pared celular de levadura

Resumen - Se estudió el enriquecimiento de microorganismos de seis microbiomas representativos, a partir de un conjunto representativo de donantes seleccionados según la estratificación del donante en enterotipo (Arumugam M, et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 474(7353):666-666; Costea PI, et al. (2018) Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. Nat Microbiol 3(1):8-16.), on
20 minimal media supplemented with Lynside® Wall Basic. Las suspensiones fecales diluidas se enriquecieron selectivamente en un medio suplementado con Lynside® Wall Basic utilizando estrictas técnicas de cultivo anaeróbico. El cultivo se realizó durante 48 h para permitir el crecimiento en el sustrato complejo. Se analizaron la producción de metabolitos y los cambios en la composición del microbioma después de 48 horas de enriquecimiento y se compararon con enriquecimientos no selectivos y un medio mínimo no suplementado para
25 identificar grupos funcionales predictivos de la respuesta al sustrato de fibra probado.

Agente prebiótico - Lynside® Wall Basic

Preparación del inóculo - Muestras fecales frescas de seis donantes representativas de los tres enterotipos descritos (es decir, *Ruminococcus*, *Prevotella* y *Bacteroides*) se utilizaron como inóculo para experimentos de
30 utilización del sustrato. Se recolectaron dos alícuotas de 200 g de cada muestra fecal fresca, se agregaron 978 µL de solución de EDTA 50 mM a cada alícuota para estabilizarlas y las alícuotas se almacenaron a -20 °C para su posterior extracción y perfilado de la microbiota. Se recolectaron dos alícuotas de 1 mL de la suspensión fecal diluida 1:10 utilizada para la inoculación y se centrifugaron a 16000 g durante 5', se eliminó el sobrenadante, se agregaron 978 µL de solución de EDTA 50 mM a las pellas para protección y las pellas se almacenaron a -20 °C.

35 Enriquecimiento del sustrato - Los experimentos a partir de diluciones de muestras fecales de los seis donantes se realizaron por triplicado en medio mínimo basado en M2 con y sin suplementación de Lynside® Wall Basic y en medio de caldo M2GSC (Miyazaki K, Martin J., Marinsek-Logar R, Flint H. (1997) Degradation and Utilization of Xylans by the Rumen Anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B14. Anaerobe 3(6):373-381), lo que dio como resultado 54 enriquecimientos. Los enriquecimientos se realizaron
40 durante 48 h a 37 °C. De cada enriquecimiento, se centrifugó 1 mL de cultivo a 16000 g durante 5', se eliminó el sobrenadante, se agregaron 978 µL de solución de EDTA 50 mM a las pellas para su estabilización y las pellas se almacenaron a -20 °C.

Análisis de SCFA - El análisis de SCFA es una evaluación del metabolismo de carbohidratos microbianos, es decir, la concentración relativa de metabolitos después de 48 h de incubación de acetato, propionato y butirato.

45 Los perfiles metabólicos de las seis muestras fecales y los sobrenadantes con y sin suplementación con Lynside® Wall Basic se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El análisis de HPLC se realizó con un dispositivo Hitachi LaChrome (Merck, Suiza) utilizando un cartucho SecurityGuart™ Carbo-H+ (4 × 32 mm) conectado a una columna Resex™ ROA-Ácido orgánico H+ (8 %) (300 × 7.8 mm). El análisis se llevó a cabo con un volumen de inyección de 40 µL, a una temperatura de 80 °C y con un caudal de
50 0.6 mL/min. Se utilizó como eluyente H₂SO₄ (10 mM) que contenía azida de sodio (0.005 %). Las concentraciones de metabolitos se cuantificaron mediante detección del índice de refracción (RI). Los límites de detección (mM) para los tres analitos fueron los siguientes: 2.06 mM para acetato, 1.61 mM para propionato y 1.55 mM para butirato. Los límites (mM) de cuantificación para los tres analitos fueron los siguientes: 6.23 mM para acetato, 4.89 mM para propionato y 4.69 mM para butirato.

Resultados del análisis de SCFA - Las concentraciones de SCFA obtenidas se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Spl	Tr	L	ΔA	ΔP	ΔB	Spl	Tr	L	ΔA	ΔP	ΔB
D1	#1	w/	14,16	6,83	5,08	D1	#1	w/o	8,5	1,86	2,70
D1	#2	w/	14,24	6,36	4,83	D1	#2	w/o	7,17	0,96	4,75
D1	#3	w/	15,36	6,95	6,27	D1	#3	w/o	8,52	1,83	4,54
D2	#1	w/	11,73	1,64	2,77	D2	#1	w/o	8,13	1,45	2,56
D2	#2	w/	8,45	2,32	2,31	D2	#2	w/o	5,82	2,00	4,69
D2	#3	w/	9,93	3,33	2,42	D2	#3	w/o	6,89	1,47	2,89
D3	#1	w/	14,52	5,67	5,41	D3	#1	w/o	8,34	0,66	3,23
D3	#2	w/	14,34	3,54	6,44	D3	#2	w/o	8,91	1,58	3,32
D3	#3	w/	15,67	1,93	5,22	D3	#3	w/o	9,37	1,43	2,76
D4	#1	w/	11,18	2,61	4,95	D4	#1	w/o	6,64	0,63	1,85
D4	#2	w/	10,61	1,96	7,21	D4	#2	w/o	6,50	0,76	3,75
D4	#3	w/	9,83	5,42	6,78	D4	#3	w/o	5,41	1,09	4,38
D5	#1	w/	9,07	5,79	9,64	D5	#1	w/o	7,14	1,48	1,74
D5	#2	w/	9,22	8,82	7,86	D5	#2	w/o	6,72	0,75	1,11
D5	#3	w/	11,92	8,03	6,45	D5	#3	w/o	7,47	0,94	1,62
D6	#1	w/	8,84	0,93	2,44	D6	#1	w/o	6,30	3,48	3,41
D6	#2	w/	11,72	0,97	5,11	D6	#2	w/o	6,01	0,95	3,88
D6	#3	w/	9,36	1,64	5,44	D6	#3	w/o	6,38	3,82	3,25

Nota: "Spl" para la muestra del donante (entre 6); "Tr" para el número de la prueba para cada donante (realizada por triplicado); "w/L" o "w/o L" para pruebas llevadas a cabo con y sin suplementación de Lynside®Wall Basic; " ΔA " para la concentración de acetato (mM); " ΔP " para la concentración de propionato (mM); y " ΔB " para la concentración de butirato (mM).

- 5 Extracción microbiana de ADN - La extracción de ADN microbiano se realizó para una alícuota congelada de muestras fecales frescas de cada donante, unas pellas de la dilución 1:10 de la materia fecal y para todos las pellas recolectadas de los experimentos de enriquecimiento. El ADN microbiano se extrajo utilizando el kit FastDNATM SPIN para suelo (MP Biomedicals, USA) según lo indicado por los productores. La calidad de los extractos de ADN se confirmó en un gel de agarosa TAE al 1.5 % y la concentración de ADN total de las muestras extraídas se determinó mediante el ensayo ADNbc Qubit utilizando un lector de placas multimodo Tecan Spark M10.
- 10

Secuenciación del amplicón del gen ARNr 16S - La composición microbiana se determinó mediante secuenciación del amplicón del gen ARNr 16S de la región V3V4. La secuenciación se realizó en la plataforma

MiSeq (Illumina, USA) utilizando el kit de reactivos de extremos emparejados MiSeq v3, obteniendo aproximadamente 7 Mio. de lecturas unidas de buena calidad (lecturas promedio de 17k por muestra y un promedio de 51k por tratamiento) de aproximadamente 450 pb de longitud.

- 5 Procesamiento bioinformático - Las lecturas sin procesar se recortaron, fusionaron y filtraron por calidad. La selección de unidades taxonómicas operativas (OTU) se realizó utilizando el algoritmo de eliminación de ruido unoise3 (cf. Edgar RC (2016) UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv*:81257). Se realizó una primera clasificación taxonómica de las OTU obtenidas utilizando la base de datos del tracto intestinal humano (HITdb - Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM (2015) Asignación taxonómica mejorada de secuencias de ARNr 16S intestinales humanos mediante una base de datos de referencia dedicada. *BMC Genomics* 16(1):1056) con un refinamiento manual final utilizando un árbol filogenético con la HITdb y las 881 OTU obtenidas (sin singletons).

Resultados - Se realizó la secuenciación de próxima generación del amplicón del gen ARNr 16S de las regiones variables V3V4 en el ADN bacteriano total de las muestras fecales.

- 15 El objetivo principal fue identificar los taxones filogenéticos promovidos selectivamente por el sustrato estudiado Lynside® Wall Basic. Por lo tanto, todas las muestras secuenciadas se categorizaron en tres grupos experimentales: (1) Muestras de donantes, que incluyen muestras fecales de los seis donantes y una dilución 1:10, respectivamente; (2) Muestras de Lynside, compuestas por todas las muestras de enriquecimientos en medio mínimo suplementado con el sustrato de prueba Lynside® Wall Basic; y (3) Enriquecimientos de control negativo en medio mínimo sin suplementación de sustrato.
- 20 En una comparación cruzada que incluyó todas las muestras, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA - Segata N, et al. (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12(6):R60) para identificar los taxones filogenéticos significativamente enriquecidos ($LDA \geq 2$) en cualquiera de los tres grupos experimentales en comparación con todos los demás grupos. Las puntuaciones LDA revelaron que los enriquecimientos en el medio suplementado con el sustrato estudiado Lynside® Wall Basic mostró un aumento significativo de taxones filogenéticos pertenecientes al filo *Bacteroidetes* hasta en cuatro órdenes de magnitud.
- 25 Se observó la promoción de representantes dentro del filo *Bacteroidetes* tras la suplementación con Lynside® Wall Basic en todos los donantes, independientemente de su enterotipo o abundancia inicial de *Bacteroidetes*.

Las puntuaciones LDA obtenidas se muestran en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Muestra	Taxones filogenéticos	Puntuación LDA	valor p
Con Lynside®	<i>Bacteria > Bacteroidetes</i>	4,9	3,60 ⁻¹⁰
Con Lynside®	<i>Bacteria >> Bacteroidia</i>	4,9	3,60 ⁻¹⁰
Con Lynside®	<i>Bacteria >>> Bacteroidales</i>	4,9	3,60 ⁻¹⁰
Con Lynside®	<i>Bacteria >>>> Bacteroidaceae</i>	4,8	2,51 ⁻¹⁰
Con Lynside®	Bacterias >>>>> Bacteroides	4,8	2,51 ⁻¹⁰
Con Lynside®	Bacterias >>>>>> Bacteroides_uniformis	4,1	7,91 ⁻¹⁰
Con Lynside®	Bacterias >>>>>> Bacteroides_faecis	4,1	1,23 ⁻¹⁰
Con Lynside®	Bacterias >>>>>> Bacteroides_xylanisolvans	3,8	5,39 ⁻¹⁰
Con Lynside®	Bacterias >>>>>> Bacteroides_ovatus	3,6	9,74 ⁻¹⁰
Control negativo	Bacterias >>>>>> Especies de Bacteroides	3,9	4,02 ⁻¹⁰
Control negativo	Bacterias >>>>>> Bacteroides_vulgatus	3,6	4,35 ⁻¹⁰
Control negativo	Bacterias >>>>>> Bacteroides_salysiae	2,8	4,02 ⁻¹⁰

Donante	Bacterias >>>>> <i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	2,8	1,60 ⁻¹⁰
Donante	Bacterias >>>>> <i>Bacteroides caccae</i>	2,4	9,11 ⁻¹⁰
Nota - Los taxones filogenéticos son los siguientes: Bacterias > Bacteroidetes > Bacteroidia > Bacteroidales > Bacteroidaceae > Bacteroides > especies Bacteroides			

Un enriquecimiento significativo y selectivo de los degradadores de sustrato presentes en las muestras de heces de los seis donantes estudiados en un medio suplementado con el sustrato de prueba Lynside® Wall Basic se mostró. Se observaron variaciones menores en la composición de metabolitos entre donantes, mientras que no se observó ningún patrón dependiente del enterotipo. Los resultados de la secuenciación de próxima generación revelaron un patrón claro con el enriquecimiento de un taxón filogenético claramente definido, *Bacteroidetes*, en medios suplementados con el sustrato de prueba Lynside® Wall Basic. Además, *Bacteroidetes* presentó el mejor desempeño independientemente de la composición microbiana inicial del donante, lo que indica la necesidad de un conjunto complejo de enzimas para la degradación del sustrato. Estos resultados demuestran que Lynside® Wall Basic, que es un producto de pared celular de levadura, estimula el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes*, tal como las bacterias del género *Bacteroides*, en la microbiota intestinal humana.

Ejemplo 2

Agente prebiótico- Se probaron dos materiales, es decir, AGENTE #1; y AGENTE #2. Ambos materiales son subfracciones insolubles ricas en proteínas obtenidas después del tratamiento de disrupción y luego del tratamiento con ribonucleasas y glucanasas, según el método divulgado en el documento unpublished French application 1853748 presentada el 27 de abril de 2018. Ambos materiales comprenden 34.0 % en peso de glucanos totales (incluido 31.0 % en peso de β -glucanos) y 31.0 % en peso de mananos. Tienen diferentes tamaños de partículas.

Medio nutritivo - El medio nutricional es un medio nutricional pobre en azúcar que contiene nutrientes basales presentes en el colon (por ejemplo, glicanos derivados del hospedador, como la mucina).

Dosis - Los agentes prebióticos se probaron a una dosis óptima de 5 g/L y frente a un blanco (control negativo).

Inóculo - Como fuente de microbiota colónica, se agregó un inóculo fecal humano recién preparado.

Incubaciones - Las incubaciones se realizaron durante 48 h a 37 °C, bajo agitación (90 rpm) y condiciones anaeróbicas. Este procedimiento permitió evaluar el efecto específico de los ingredientes de prueba sobre el perfil metabólico y de composición comunitaria de la microbiota colónica.

Parámetros medidos - Se controlaron diferentes aspectos, es decir, la fermentación microbiana general (pH y producción de gas), cambios en la actividad microbiana para comparar la cinética en la producción de metabolitos bacterianos (ácidos grasos de cadena corta o SCFA y análisis de lactato) y cambios en la composición de la comunidad microbiana (qPCR dirigida y secuenciación de Illumina basada en 16S).

pH - El grado de acidificación durante el experimento es una medida de la intensidad del metabolismo bacteriano del prebiótico potencial (fermentación). El pH de las incubaciones se determinó a las 0, 3, 6, 24 y 48 h de iniciada la incubación, dando de este modo una indicación aproximada de la velocidad de fermentación de las diferentes mezclas de fibras.

Producción de gas - Las incubaciones de colon se realizaron en sistemas de incubación cerrados. Esto permitió evaluar la acumulación de gas en el espacio de cabeza, que se puede medir con un medidor de presión. La producción de gas es una medida de la actividad microbiana y, de este modo, de la velocidad de fermentación de los sustratos potencialmente prebióticos. El H₂ y CO₂ son los primeros gases que se producen durante la fermentación microbiana; posteriormente pueden utilizarse como sustratos para la producción CH₄, reduciendo el volumen de gas. El H₂ también se puede utilizar para reducir el sulfato a H₂S, resultante de la fermentación proteolítica. Como resultado, N₂, O₂, CO₂, H₂ y CH₄ Constituyen el 99 % del volumen del gas intestinal. El 1 % restante se compone de NH₃, H₂S, aminoácidos volátiles y ácidos grasos de cadena corta. La producción de gas durante las incubaciones se determinó a las 0, 3, 6, 24 y 48 h después de iniciada la incubación.

Análisis de SCFA - El análisis de SCFA es una evaluación del metabolismo de los carbohidratos microbianos (acetato, propionato y butirato) y se puede comparar con patrones de fermentación típicos de la microbiota GI normal. Las muestras para el análisis de SCFA se analizaron después de 0, 3, 6, 24 y 48 h de incubación.

Análisis de lactato - El intestino humano alberga bacterias que producen lactato y bacterias que utilizan lactato. El lactato es producido por las bacterias del ácido láctico y disminuye el pH del ambiente, actuando así también

como agente antimicrobiano. El ácido láctico protonado puede penetrar la célula microbiana, después de lo cual se disocia y libera protones dentro de la célula, lo que resulta en acidificación y muerte celular microbiana. También puede ser rápidamente convertido, en especial en butirato, por otros microorganismos. Las muestras para análisis de lactato se analizaron después de 0, 3, 6, 24 y 48 h de incubación.

- 5 qPCR dirigida – La PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica molecular que se basa en la cuantificación de secuencias bacterianas específicas (genes del ARNr 16S) mediante amplificación. Para el presente proyecto se realizó una cuantificación de bifidobacterias y lactobacilos al inicio de la incubación, después de 24 h y después de 48 h.

- 10 Secuenciación de Illumina basada en 16S - Debido a que el método de secuenciación de Illumina se basa en PCR, las secuencias microbianas se amplifican hasta que se alcanza un nivel de saturación. Por lo tanto, los resultados que se expresan en diferentes niveles filogenéticos (filó microbiano, familia y género o nivel OTU) se presentan como valores proporcionales frente a la cantidad total de secuencias dentro de cada muestra, proporcionando de este modo resultados semicuantitativos. La metodología aplicada involucra cebadores que abarcan 2 regiones hipervariables (V3-V4) del ADNr 16S. Utilizando un enfoque de secuenciación de pares, la
- 15 secuenciación de 2 × 250 pb da como resultado amplicones de 424 pb. Tales fragmentos son taxonómicamente más útiles en comparación con fragmentos más pequeños que son taxonómicamente menos informativos. Se tomaron muestras al inicio y al final de las 48 h de incubación.

Resultados - Se obtuvieron los siguientes resultados:

Disminución del pH - Se controló el pH. Las medidas de pH obtenidas se muestran en la tabla 3 a continuación:

20

Tabla 3

Tiempo de incubación	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
0 h	6.59	6.53	6.55
3 h	6.40	6.39	6.51
6 h	6.25	6.26	6.49
24 h	6.01	6.13	6.53
48 h	5.98	6.05	6.44

La disminución inicial del pH (después de 3 h y 6 h) fue comparable entre ambos productos y más fuerte que la incubación en blanco.

- 25 La disminución del pH de los productos se produjo principalmente entre 0-24 h y fue mucho más fuerte que en el blanco. Después de 24 h de fermentación, hubo una disminución del pH ligeramente más fuerte para el AGENTE #1 frente al AGENTE #2.

El pH se mantuvo relativamente constante durante el intervalo de 24-48 h para la incubación con el AGENTE #1, mientras que disminuyó ligeramente aún más en la incubación con el AGENTE #2.

- 30 Disminuciones más fuertes del pH con agentes prebióticos frente al blanco ilustraron consistentemente una alta fermentabilidad de ambos productos de prueba.

Producción de gas - Se controló la producción promedio de gas (kPa) en diferentes intervalos de tiempo durante la fermentación de 5 g/L de los agentes prebióticos probados y el control negativo. Las medidas obtenidas se muestran en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4

Intervalo de tiempo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
24-48 h	2.4	2.0	4.0
6-24 h	26.2	22.9	10.9

3-6 h	7.4	9.5	3.6
0-3 h	9.1	10.5	5.5

La producción inicial de gas (desde 0-3 h y desde 3-6 h) fue considerablemente mayor para el AGENTE #1 y para el AGENTE #2 que para el blanco.

5 La producción de gas fue mayor en el período de 6-24 horas. En comparación con el blanco, ambos productos sugirieron una alta tasa de fermentación.

Ambos productos dieron como resultado un aumento adicional similar pero pequeño en la producción de gas durante el intervalo de tiempo de 24-48 h, siendo ligeramente inferior al del blanco.

Los niveles más altos de producción de gas con ambos agentes prebióticos frente al blanco ilustraron consistentemente una alta fermentabilidad de ambos productos de prueba.

10 Producción de SCFA- Se controlaron las producciones promedio de acetato, propionato, butirato y SCFA totales (mM) en diferentes intervalos de tiempo durante la fermentación de 5 g/L de los agentes prebióticos probados y el control negativo.

Las mediciones obtenidas para la producción total de SCFA (mM) se muestran en la tabla 5 a continuación:

Tabla 5

Intervalo de tiempo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
24-48 h	4.5	7.2	6.5
6-24 h	40.2	35.0	16.4
3-6 h	8.6	10.6	3.6
0-3 h	13.8	14.5	7.5

15

Ambos agentes prebióticos aumentaron de forma fuerte y similar los niveles totales de SCFA a casi 70 mM, duplicando de este modo la producción de SCFA en comparación con el control.

Las medidas obtenidas para la producción de lactato (mM) se muestran en la tabla 6 a continuación:

Tabla 6

Intervalo de tiempo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
24-48 h	0.2	1.7	1.0
6-24 h	23.9	21.3	12.2
3-6 h	4.7	6.0	2.1
0-3 h	8.1	8.5	3.5

20

Ambos agentes prebióticos duplicaron los niveles de acetato en comparación con el control negativo, con un aumento de aproximadamente casi 20 mM.

Las medidas obtenidas para la producción de propionato (mM) se muestran en la tabla 7 a continuación:

Tabla 7

Intervalo de tiempo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
24-48 h	1.5	2.6	2.3
6-24 h	15.8	13.0	3.6
3-6 h	3.9	4.5	1.4
0-3 h	3.4	3.7	1.8

Al igual que el acetato, el propionato puede ser producido por una amplia gama de microbios intestinales, y los productores de propionato más abundantes son *bacteroides spp.* (filo = *Bacteroidetes*) y *Akkermansia muciniphila* (filo = *Verrucomicrobia*). Como este último es un microbio que degrada la mucina, las producciones de propionato observadas probablemente se puedan atribuir a *bacteroides spp.* Nuevamente, ambos productos duplicaron los niveles finales de propionato frente al control negativo.

Las medidas obtenidas para la producción de butirato (mM) se muestran en la tabla 8 a continuación:

Tabla 8

Intervalo de tiempo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
24-48 h	1.08	1.30	1.03
6-24 h	4.20	4.11	2.54
3-6 h	0.25	0.30	0.12
0-3 h	0.46	0.50	0.17

La producción de butirato aumentó considerablemente tras la administración de ambos productos.

En conclusión, ambos agentes prebióticos duplicaron la producción total de SCFA en comparación con el control. Este aumento estuvo relacionado con el aumento de la producción de acetato, propionato y butirato, que fueron casi el doble frente al control. De acuerdo con los resultados del pH y la producción de gas, los aumentos fueron más fuertes durante las primeras 24 h, lo que indica una alta tasa de fermentación inducida por ambos productos.

Producción de lactato - Se controló la producción promedio de lactato (mM) en diferentes intervalos de tiempo durante la fermentación de 5 g/L de los agentes prebióticos probados y el control negativo.

Las medidas obtenidas para la producción de lactato (mg/L) se muestran en la tabla 9 a continuación:

Tabla 9

Intervalo de tiempo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
24-48 h	-0.43	-0.24	-0.12
6-24 h	-1.28	-1.61	0.01
3-6 h	-0.17	-0.19	-0.21
0-3 h	1.90	2.16	0.71

Ambos agentes prebióticos dieron como resultado una alta producción inicial de lactato (0-3 h) en comparación con el control. A partir de las 3 h de incubación se consumió lactato, con un consumo leve durante los periodos

de 3-6 h y 24-48 h y un consumo máximo durante el periodo de 6-24 h. El consumo de lactato dentro del período de 6 a 24 horas se corresponde bien con la alta producción de butirato que ocurrió principalmente en este período de tiempo, indicando de este modo que el lactato podría haber servido como precursor del butirato.

- 5 Nivel de bifidobacterias - El nivel de bifidobacterias (número absoluto promedio de *Bifidobacteria* expresados como copias del gen ARNr 16S/mL) en diferentes puntos de tiempo tras la fermentación de 5 g/L de los agentes prebióticos probados y se controló el control negativo.

Los números absolutos promedio de *Bifidobacteria*, expresados como copias del gen ARNr 16S/mL, se muestran en la tabla 10 a continuación:

Tabla 10

Tiempo de incubación	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
0 h	BDL	BDL	BDL
24 h	1.9×10^5	2.0×10^5	1.8×10^5
48 h	1.8×10^5	2.1×10^5	2.0×10^5
BDL: por debajo del límite de detección			

10

Al comienzo de la incubación, los niveles de *Bifidobacteria* estaban por debajo del límite de detección. Durante la incubación, las Bifidobacterias se enriquecieron de manera similar al blanco. Por tanto, no se observó ningún efecto estimulante de los tratamientos sobre las Bifidobacterias.

- 15 Nivel de lactobacilos - El nivel de *Lactobacilo* (número absoluto promedio de *Lactobacillus* expresado como copias del gen ARNr 16S/mL) en diferentes puntos de tiempo tras la fermentación de 5 g/L de los agentes prebióticos probados y se controló el control negativo.

Los números absolutos promedio de *Lactobacillus*, expresados como copias del gen ARNr 16S/mL, se muestran en la tabla 11 a continuación:

Tabla 11

Tiempo de incubación	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
0 h	1.5×10^5	1.5×10^5	1.5×10^5
24 h	1.2×10^6	2.5×10^6	2.7×10^6
48 h	1.7×10^6	2.7×10^6	2.5×10^6

20

Los agentes prebióticos no estimularon los niveles de *Lactobacillus* frente al blanco.

Secuenciación de Illumina dirigida a 16S (nivel de filo) - Se determinó la abundancia relativa (%) de los diferentes filos en el inóculo original y en las incubaciones de colon tras la adición de los agentes prebióticos frente al blanco.

- 25 La abundancia relativa de los diferentes filos se muestra en la tabla 12 a continuación:

Tabla 12

Filo	Inóculo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
<i>Actinobacteria</i>	3.8 %	0.6 %	0.6 %	1.3 %
<i>Bacteroidetes</i>	45.2 %	78.5 %	69.7 %	58.2 %

<i>Firmicutes</i>	50.9 %	13.1 %	19.3 %	20.5 %
<i>Proteobacteria</i>	0.1 %	7.9 %	10.4 %	20.1 %

Todos los filos principales que estaban originalmente presentes en el inóculo también se conservaron durante las incubaciones in vitro. Ambos agentes prebióticos enriquecieron los niveles de *Bacteroidetes* después de 48 horas de incubación, en comparación tanto con el inóculo original como con el blanco. La proporción de *Bacteroidetes*, que contiene muchas especies productoras de propionato, fue mayor en las incubaciones con el AGENTE #1 (78.5 %) frente al AGENTE #2 (69.7 %), lo que estuvo en consonancia con las concentraciones de propionato ligeramente más altas que se asociaron con la fermentación de este producto. Debido al fuerte aumento de *Bacteroidetes*, La abundancia relativa de *Firmicutes* disminuyó significativamente durante las incubaciones con los productos de prueba.

- 5 10 Secuenciación de Illumina dirigida a 16S (familia y OTU) - Se determinó la abundancia relativa (%) de bacterias de filo *Bacteroidetes* / Familia *Bacteroidaceae* y filo *Firmicutes* / familia *Erysipelotrichaceae* en el inóculo original y en las incubaciones en el colon tras la adición de los agentes prebióticos frente al blanco.

La abundancia relativa de bacterias del filo *Bacteroidetes* / familia *Bacteroidaceae* y bacterias del filo *Firmicutes* / familia *Erysipelotrichaceae* se muestra en la tabla 13 a continuación:

15 Tabla 13

Familia filo	Inóculo	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
<i>Bacteroidetes Bacteroidaceae</i>	43.1 %	78.0 %	69.1 %	57.2 %
<i>Firmicutes Erysipelotrichaceae</i>	1.0 %	4.1 %	8.4 %	0.1 %

En el inóculo, la proporción restante de bacterias del filo *Bacteroidetes* compuesto esencialmente de bacterias de familia *Porphyromonadaceae* (1.3 %) y de bacterias de familia *Rikenellaceae* (0.8 %).

- 20 Se muestra un mayor enriquecimiento de *Bacteroidaceae* y *Erysipelotrichaceae* por los agentes prebióticos, que en el blanco.

Entre las bacterias del filo *Bacteroidetes* / familia *Bacteroidaceae*, se determinó la abundancia relativa de las especies *Bacteroides ovatus*. Asimismo, entre las bacterias del filo *Firmicutes* / familia *Erysipelotrichaceae*, se determinó la abundancia relativa de las especies *Clostridium XVIII* (OTU5). Los datos se muestran en la tabla 14 a continuación:

25 Tabla 14

Especies	AGENTE #1	AGENTE #2	Blanco
<i>Bacteroides ovatus</i>	68.4 %	57.0 %	9.8 %
<i>Erysipelotrichaceae Clostridium XVIII OTU5</i>	3.9 %	8.1 %	0.0 %

Entre las bacterias de la familia *Bacteroidaceae*, los agentes prebióticos indujeron un enriquecimiento muy fuerte en *Bacteroides ovatus* frente al blanco. Entre las bacterias de la familia *Erysipelotrichaceae*, los agentes prebióticos indujeron un enriquecimiento muy fuerte de *Clostridium XVIII* frente al blanco.

- 30 Conclusión - Se evaluó el potencial de los agentes prebióticos probados en incubaciones colónicas a corto plazo y se comparó con un control negativo, es decir, incubación sin fibras. Múltiples criterios de valoración demostraron el gran potencial prebiótico de ambos agentes, dando como resultado: (1) una disminución del pH y un aumento en la producción de gas; (2) un aumento en la producción de SCFA acetato, propionato y butirato, que promueven la salud; (3) la estimulación de la producción inicial de lactato, seguida por el consumo, lo que probablemente conduce a mayores concentraciones de butirato. Además, no se pudo observar ningún efecto estimulante de ambos agentes prebióticos hacia las Bifidobacterias y los Lactobacilos. Además, se pudo
- 35

observar un efecto estimulante de los agentes prebióticos sobre *Bacteroidetes*, particularmente sobre *Bacteroides ovatus*, lo que explica su efecto estimulante sobre la producción de acetato y propionato.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso como agente prebiótico para estimular el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes*, en la microbiota intestinal de los mamíferos;

en el que el producto de levadura es una subfracción soluble de las paredes de las células de levadura;

5 en el que la subfracción soluble se obtiene sometiendo células de levadura completas a un tratamiento de disrupción, separando una fracción soluble de una fracción insoluble, luego tratando la fracción insoluble con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar una subfracción insoluble rica en proteínas de una subfracción soluble; o sometiendo células de levadura completas a un tratamiento de disrupción, luego tratando la mezcla
10 obtenida con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar una subfracción insoluble rica en proteínas de una subfracción soluble.

2. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso según la reivindicación 1, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y/o *Wickehomomyces*; preferiblemente, en el que la levadura se selecciona del grupo
15 que consiste en las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia jadinii*, *Kluyveromyces marxianus*; más preferiblemente en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que las bacterias de los filos *Bacteroidetes* son bacterias de la clase *Bacteroidia*; preferiblemente bacterias del orden *Bacteroidales*; más preferiblemente bacterias de la familia *Bacteroidaceae*; aún más preferiblemente bacterias del género *Bacteroides*; más preferiblemente *Bacteroides ovatus* spp.

20 4. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de levadura aumenta la proporción de bacterias del filo *Bacteroidetes* frente a las bacterias del filo *Firmicutes* en la microbiota intestinal de los mamíferos.

5. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de levadura tiene un contenido de β -glucano (expresado como masa equivalente de glucosa) desde 15 a 50 % en masa sobre una base de materia seca; y/o un contenido de manano (expresado
25 como masa equivalente de manosa) desde 10 a 40 % en masa sobre una base de materia seca.

6. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de levadura no estimula el crecimiento de bacterias del género *Bifidobacterium* y/o bacteria del género *Lactobacillus*.

30 7. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de levadura, o la composición que lo comprende, se administra por vía oral; preferiblemente en el que el producto de levadura, o la composición que lo comprende, se administra por vía oral en una dosis diaria desde 500 mg a 15 g; preferiblemente en el que el producto de levadura, o la
35 composición que lo comprende, se administra por vía oral en una dosis diaria desde 500 mg a 5 g en hasta 10 tomas.

8. Una composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que la composición está formulada como una goma, un comprimido, una cápsula, una píldora, un polvo, gránulos o una suspensión.

9. Un producto de levadura, o una composición que lo comprende, para su uso según cualquier reivindicación anterior, comprendiendo dicho uso además prevenir o limitar patologías intestinales tales como diarreas y
40 síndrome del intestino irritable, para estimular la inmunidad, para regular la glucemia y/o la lipidemia, para tratar o limitar trastornos metabólicos asociados a la obesidad.

10. Uso no terapéutico de un producto de levadura, o una composición que lo comprende, como agente prebiótico para estimular el crecimiento de bacterias del filo *Bacteroidetes* en la microbiota intestinal de
45 mamíferos en un sujeto sano; en el que el producto de levadura es una subfracción soluble de las paredes de células de levadura, obtenida sometiendo células de levadura completas a un tratamiento de disrupción, separando una fracción soluble de una fracción insoluble, luego tratando la fracción insoluble con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar una subfracción insoluble rica en proteínas de una subfracción soluble; o
50 sometiendo células de levadura completas a un tratamiento de disrupción, luego tratando la mezcla obtenida con ribonucleasas y glucanasas, antes de separar una subfracción insoluble rica en proteínas de una subfracción soluble.

11. Uso no terapéutico de una composición según la reivindicación 10, en el que la composición es un alimento o un complemento alimenticio; preferiblemente un producto lácteo, un producto a base de fruta, una bebida, un alimento sólido o un complemento alimenticio.