

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 735**

51 Int. Cl.:

C08B 30/18 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C30B 30/06 (2006.01)

A23L 33/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2017** **PCT/US2017/013957**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017** **WO17127436**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2017** **E 17741856 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 3405500**

54 Título: **Maltosil-isomaltooligosacáridos**

30 Prioridad:

18.01.2016 US 201662280026 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2025

73 Titular/es:

ISOTHRIVE INC. (100.00%)
2165 Toyon Drive
Healdsburg, CA 95448, US

72 Inventor/es:

MADSEN, LEE y
OSWALD, JACK

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

Observaciones:

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

ES 3 016 735 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

Maltosil-isomaltooligosacáridos

5 Antecedentes

Los complementos alimenticios son o bien alimentos o bien constituyentes de alimentos que supuestamente proporcionan beneficios médicos o para la salud tales como la prevención de enfermedades (Stephen, D.F.L., Trends in Food Sci. Tech, 1995, 6:59-61). El término normalmente incluye las siguientes clases representativas: probióticos, prebióticos, fibra alimenticia, ácidos grasos omega-3 y antioxidantes (Pandey, M. *et al.*, Asian J. Pharm. Clin. Res., 2010, 3:11-15). Debido al creciente número de consumidores preocupados por la salud en Asia, Estados Unidos, y Europa, el mercado de complementos alimenticios, específicamente en el área de oligosacáridos y prebióticos, ha demostrado un crecimiento significativo durante las últimas tres décadas (Goffin, D. *et al.*, Crit. Rev. Food. Sci. Nutr., 2011, 51:394-409; Roberfroid, M.B., Br. J. Nutr., 2002, 88 supl. 2:S133-8). Se demandan productos nuevos y mejorados, así como métodos nuevos y económicos para su producción.

Los prebióticos son materiales, o mezclas de los mismos, que contienen entidades o bien físicas (por ejemplo, fibra alimenticia) o bien químicas (por ejemplo, butirato) que pueden sobrevivir al tránsito a través de la porción alta del tubo digestivo, y pueden llegar intactas al colon para promover el crecimiento de flora beneficiosa seleccionada (probiótica) (Chung, C.H., *et al.*, Poult. Sci., 2004, 83: 1302-6). En algunos casos, los prebióticos pueden ejercer cierto efecto beneficioso directamente sobre las células epiteliales intestinales tales como mejorar la captación de calorías nutritivas, vitaminas, minerales, y otros materiales beneficiosos. Dado que muchos prebióticos pueden superar la resistencia de la barrera digestiva para facilitar la proliferación y/o actividad de poblaciones deseadas de bacterias *in situ* (Gibson G. R. *et al.*, J. Nutr., 1995, 125: 1401-12; Van Loo, J. *et al.*, Br. J. Nutr., 1999, 81:121-32), la investigación y el desarrollo en este ámbito han experimentado un auge. Adicionalmente, algunos prebióticos están presentes de manera natural en los alimentos, especialmente en alimentos fermentados, y generalmente son compatibles con la mayoría de las formulaciones alimentarias (Macfarlane, S. *et al.*, Aliment Pharmacol. Ther, 2006, 24:701-14; Manning, T.S. *et al.*, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol, 2004, 18:287-98).

Algunos agentes prebióticos de glucooligosacáridos resistentes pueden estar disponibles comercialmente, pero algunos tipos de glucooligosacáridos son mejores agentes prebióticos que otros.

Day y Chung han producido glucooligosacáridos, incluyendo maltosil-isomaltooligosacáridos (MIMO), mediante fermentación (patente estadounidense n.º 7.291.607, véase también la solicitud de patente estadounidense 2008/0064657 (Day), ahora la patente estadounidense 7.772.212). Sin embargo, Day y Chung no dan a conocer las composiciones ni los métodos de producción descritos en esta solicitud.

El documento WO 2016/029198 (Masden *et al.*, publicado el 25 de febrero de 2016)) da a conocer un método para la producción de oligosacáridos mediante la fermentación de microorganismos productores de dextran con sacarosa y maltosa. El procedimiento dado a conocer permite el control de la composición final de los isomaltooligosacáridos mediante ajustes del pH y de la razón inicial de sacarosa con respecto a maltosa.

Sumario

Las composiciones descritas en el presente documento contienen oligosacáridos resistentes, donde la maltosa es una parte constituyente. Estas composiciones, denominadas maltosil-isomaltooligosacáridos (MIMO), promueven el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas, incluyendo *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium* spp., con respecto a bacterias no beneficiosas en el intestino.

La solicitud describe composiciones que comprenden maltosil-isomaltooligosacáridos con una distribución de peso molecular promedio en masa de 730 a 900 Dalton y en las que al menos el 40 % de los maltosil-isomaltooligosacáridos en la composición tienen un grado de polimerización (DP) de 5 o más.

Los maltosil-isomaltooligosacáridos en las composiciones contienen generalmente más enlaces α -(1,6)-glucosilo que enlaces α -(1,2), α -(1,3), o α -(1,4)-glucosa. Por ejemplo, los maltosil-isomaltooligosacáridos pueden tener al menos el 50 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 52 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 55 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 60 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 65 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 70 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 75 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 80 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 83 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 85 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 87 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 88 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 89 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo, o al menos el 90 % de enlaces α -(1,6)-glucosilo. Algunos de los maltosil-isomaltooligosacáridos en la composición pueden tener opcionalmente uno o dos enlaces α -(1,4)-glucosilo, o uno o dos enlaces α -(1,2)-glucosilo, o uno o dos enlaces α -(1,3)-glucosilo. Por tanto, los maltosil-isomaltooligosacáridos son generalmente α -(1,6)-glucooligosacáridos lineales, terminados con maltosa en el extremo reductor. Los residuos de azúcar en los extremos reductores de los maltosil-isomaltooligosacáridos están conectados normalmente a la parte restante de la molécula de MIMO mediante un enlace α -(1,4).

- Si bien, en algunos casos, las composiciones pueden tener poco o nada de manitol, las composiciones tienen normalmente algo de manitol en ellas. Por ejemplo, las composiciones pueden tener más del 3 %/brix de manitol, o más del 4 % %/brix de manitol, o más del 5 % %/brix de manitol, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID refractiva. Generalmente, la cantidad de manitol en las composiciones es de menos del 30 %/brix de manitol, o menos del 20 %/brix de manitol, o menos del 15 %/brix de manitol, o menos del 12 %/brix de manitol, o menos del 10 %/brix de manitol, o menos del 9 %/brix de manitol, o menos del 8 %/brix de manitol, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.
- Los maltosil-isomaltooligosacáridos en las composiciones tienen generalmente no más de aproximadamente 17 unidades de glucosilo, o no más de aproximadamente 16 unidades de glucosilo, o no más de aproximadamente 15 unidades de glucosilo, o no más de aproximadamente 14 unidades de glucosilo, o no más de aproximadamente 13 unidades de glucosilo, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.
- Las composiciones tienen generalmente menos del 2 %/brix de isomaltosa, o menos del 1 %/brix de isomaltosa, o menos del 0,5 %/brix de isomaltosa, o menos del 0,2 %/brix de isomaltosa, o menos del 0,1 %/brix de isomaltosa, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID. En algunos casos, las composiciones no tienen isomaltosa, o tienen niveles por debajo del límite de detección (por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID).
- Las composiciones también tienen generalmente menos del 5 %/brix de glucosa libre, o menos del 4 %/brix de glucosa libre, o menos del 3 %/brix de glucosa libre, o menos del 2 %/brix de glucosa libre, o menos del 1 %/brix de glucosa libre, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.
- Las composiciones también tienen normalmente menos del 5 %/brix de sacarosa, o menos del 4 %/brix de sacarosa, o menos del 3 %/brix de sacarosa, o menos del 2 %/brix de sacarosa, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.
- Las composiciones también tienen generalmente menos del 4 %/brix de fructosa, o menos del 3 %/brix de fructosa, o menos del 2 %/brix de fructosa, o menos del 1 %/brix de fructosa, o menos del 0,5 %/brix de fructosa, o menos del 0,25 %/brix de fructosa, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.
- Las composiciones contienen normalmente cantidades pequeñas o no detectables de ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico. Por ejemplo, las composiciones pueden tener menos del 16 %/brix de ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico; menos del 3 %/brix de ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico; menos del 2 %/brix de ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico; o menos del 1 %/brix de ácido láctico, ácido acético, y ácido fórmico; o menos del 0,5 %/brix de ácido láctico, ácido acético, y ácido fórmico; o menos del 0,2 %/brix de ácido láctico, ácido acético, y ácido fórmico; o menos del 0,1 %/brix de ácido láctico, ácido acético, y ácido fórmico, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID. En algunos casos, las composiciones pueden no tener ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico, tal como se mide mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.
- Las composiciones también tienen bajas cantidades de maltosa libre. Por ejemplo, las composiciones tienen normalmente menos del 8 %/brix de maltosa, o menos del 7 %/brix de maltosa, o menos del 6 %/brix de maltosa, o menos del 5 %/brix de maltosa, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.
- Las composiciones pueden administrarse a, o ingerirse por, animales, incluyendo seres humanos, animales domesticados, animales de zoológico, y animales salvajes. Por tanto, en el presente documento se describen métodos que implican administrar cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento a un animal. Tal administración o ingesta puede tener efectos beneficiosos para el animal. Por ejemplo, los animales que pueden beneficiarse de tal administración o ingesta pueden padecer enfermedades o afecciones tales como cáncer, afección/afecciones precancerosa(s), predisposiciones cancerosas, diabetes (por ejemplo, diabetes tipo 2, o diabetes tipo 1), enfermedad(es) autoinmunitaria(s), reflujo de ácido, infecciones bacterianas (por ejemplo, en la boca, los senos paranasales, y/o el tubo digestivo), hipovitaminosis, trastorno(s) del estado de ánimo, degradación de revestimiento(s) de la mucosa, colitis ulcerosa, irregularidades digestivas (por ejemplo, síndrome del intestino irritable, reflujo de ácido, estreñimiento, o una combinación de los mismos), enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enteritis infecciosa, diarrea asociada a antibióticos, diarrea, colitis, pólipos en el colon, síndrome de poliposis familiar, síndrome de Gardner, infecciones por *Helicobacter pylori*, cánceres intestinales, o combinaciones de los mismos. Las composiciones pueden fomentar el crecimiento y la actividad de determinados tipos de bacterias (por ejemplo, cepas de *L. lactis*), lo que conduce a la producción de diversos tipos de bacteriocinas (por ejemplo, nisinas) por esas bacterias. Tales bacteriocinas (por ejemplo, nisinas) pueden actuar como agentes antineoplásicos y/o como agentes antimicrobianos, que pueden reducir los síntomas de, o tratar, las enfermedades o afecciones.
- La solicitud también describe métodos de preparación de las composiciones. Por ejemplo, las composiciones pueden generarse mediante un método que implica lo siguiente:

(a) poner en contacto células bacterianas de *Leuconostoc citreum* ATCC 13146 (NRRL B-742) con un medio de cultivo acuoso que comprende una razón de sacarosa con respecto a maltosa que oscila entre 2,0 y aproximadamente 4,5 para formar una mezcla de fermentación;

5 (b) fermentar la mezcla de fermentación a un pH de entre 4 y 8;

(c) eliminar las células bacterianas para generar un licor libre de células;

10 (d) pulir el licor libre de células mediante eliminación de impurezas insolubles; decoloración (por ejemplo, usando carbón activo, carbono activado, una resina aniónica de base débil, o una combinación de los mismos), retirada de cenizas (por ejemplo, usando una resina catiónica de ácido fuerte para retirar los iones metálicos, o usando un procedimiento de dos etapas que usa un ácido fuerte seguido de una base débil); eliminación de proteína (por ejemplo, mediante calentamiento, evaporación del medio de cultivo acuoso, y centrifugación o filtración, o mediante el uso de una resina aniónica de base débil); eliminación de ácidos orgánicos (por ejemplo, utilizando una resina aniónica de base débil, cromatografía de líquidos que usa una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte de tipo gel de calidad cromatográfica en forma de calcio (SAC-Ca⁺⁺); o cualquier combinación de los mismos, para generar un producto pulido;

20 e) lavar las impurezas insolubles, los agentes de decoloración, los agentes de retirada de cenizas, los mecanismos de evaporación (por ejemplo, un evaporador de película agitada), los sedimentos de centrifugación, los filtros, la ración, las resinas aniónicas de base débil, las resinas cromatográficas, las resinas de intercambio catiónico de ácido fuerte de tipo gel de calidad cromatográfica, o cualquier combinación de los mismos para generar uno o más lavados; y combinar uno o más lavados juntos, o con el licor libre de células; o con el producto pulido;

25 en el que la composición final comprende maltosil-isomaltooligosacáridos con una distribución de peso molecular promedio en masa de aproximadamente 640 a 1000 Dalton y al menos el 3 % de manitol.

30 En algunos casos, la razón de sacarosa con respecto a maltosa en la etapa (a) oscila entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,5, o entre aproximadamente 2,1 y aproximadamente 4,0, o entre aproximadamente 2,2 y aproximadamente 3,5, o entre aproximadamente 2,3 y aproximadamente 3,0, o entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,0, o entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 2,9, o entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 2,8, o es de aproximadamente 2,75. Estas razones de sacarosa con respecto a maltosa son en el momento de inoculación.

35 Dado que el pH de los métodos de biosíntesis usados para preparar las composiciones de maltosil-isomaltooligosacáridos se controla al óptimo para la(s) enzima(s) dextranasa, la composición resultante no es un producto de la naturaleza. En la naturaleza, en el transcurso de los procesos metabólicos, las bacterias crearán ácidos orgánicos. A medida que se produce esto, el pH disminuirá hasta 3,5-4,2. Por tanto, el pH final en un producto natural es significativamente menor que el intervalo óptimo de las enzimas dextranasa (por ejemplo, pH de 5,6, véase la figura 7), lo que limitará tanto el rendimiento como la distribución de peso molecular promedio en masa de los MIMO así preparados. Por tanto, un producto preparado en la naturaleza tendrá normalmente un intervalo de grado de polimerización (DP) de entre 3 y 6, con una ponderación importante hacia un DP de 3. En comparación, el DP de las composiciones descritas en el presente documento puede ser superior. Por ejemplo, la mayoría de los oligosacáridos MIMO en las composiciones proporcionadas en el presente documento tienen un DP de 4 o más, o incluso un DP de 5 o más. A continuación se muestra un ejemplo de una composición de MIMO preparada tal como se describe en el presente documento.

%brix:					
Brix	63,01				
manitol	6,23				
glucosa	0,85				
fructosa	0,16				
sacarosa	1,86				
maltosa	4,29				
MIMO	84,77				
Lactato	0,00				
Glicerol	0,41				
Formiato	0,00				
Acetato	0,00				
TOTAL,					
%:	98,58				
Pureza,					
%:	86,00				
MWD,					
Da:	776,47				

DP:	%brix:		
MIMO-DP3	14,89		
MIMO-DP4	22,19		
MIMO-DP5	23,66		
MIMO-DP6	15,23		
MIMO-DP7	5,75		
MIMO-DP8	2,48		
MIMO-DP9	0,58		

HPLC, %:	α -(1,6), %:	α -(1,3), %:
90,34	10,12	
RMN, %:	95,65	4,35

Por ejemplo, al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 55 %, o al menos el 57 %, o al menos el 60 %, o al menos el 62 %, o al menos el 65 % de los MIMO en las composiciones descritas en este caso tienen un DP de 5 o más.

Además, las composiciones producidas tal como se describe en el presente documento están significativamente libres de ácidos orgánicos, pero esos ácidos orgánicos estarán presentes en un producto fermentado natural. Además, en condiciones equivalentes en cuanto a la cantidad de sacarosa presente, el producto natural contendrá significativamente más manitol (por ejemplo, el 33 %brix) que la composición descrita en el presente documento (normalmente el 6-8 %brix).

Descripción de las figuras

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención mediante referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en la que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 ilustra el metabolismo de *Leuconostoc spp.* (véase Dols, *et al.* 1997).

La figura 2 muestra la cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) de diversas preparaciones de oligosacáridos: (1) un caldo de fermentación final generado usando el procedimiento ISOThrive con NRRL B-1299; (2) una formulación de MIMO comercial preparada usando una enzima dextranasa inmovilizada a partir de NRRL B-1299; y (3) un producto típico preparado usando un procedimiento descrito en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 14/833.094, presentada el 22 de agosto de 2015 (incorporada en el presente documento mediante referencia en su totalidad) usando NRRL B-742. Obsérvese que se observan componentes a-j equivalentes, que corresponden a a. sacarosa, b. maltosa, y c-j. MIMO con un grado de polimerización (DP) de 3-9, respectivamente. El subíndice C1 indica MIMO con (1) cadenas α -(1,6) lineales; (2) cadenas α -(1,2) ramificadas; y (3) cadenas α -(1,3) ramificadas.

La figura 3 muestra la HPAEC-PAD de (1) medio de fermentación preparado para contener MIMO ISOThrive™ correspondiente a material de tipo "A2". (2), (3), y (4) corresponden al mismo medio después de la fermentación con *L. casei* NRRL B-1922 durante 3, 5, y 7 días, respectivamente. Los componentes marcados son A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: sacarosa; E: maltosa; F: MIMO-DP3 (por ejemplo, panosa), y G-K: MIMO-DP4 a MIMO-DP8. Obsérvese que el consumo de MIMO se produce mediante escisión de maltosa y despolimerización de la cadena principal de α -(1,6)-glucano.

La figura 4 muestra la HPAEC-PAD de (1) medio de fermentación preparado para contener un producto de MIMO comercial fabricado usando dextranasa inmovilizada aislada a partir de NRRL B-1299. (2) y (3) corresponden al mismo medio después de la fermentación con *L. casei* NRRL B-1922 durante 3 y 6 días, respectivamente. Los componentes marcados son A: L-arabinosa (patrón interno); B: D-glucosa; C: D-fructosa; D: maltosa; donde E, F, G,

y H corresponden a MIMO con estructuras principales α -(1,6) lineales que oscilan en cuanto a DP entre 3 y 6, y E2, F2, G2, y H2 corresponden a MIMO con estructuras principales α -(1,6) lineales y ramificaciones o bien α -(1,2)-glucosilo o bien α -(1,3)-glucosilo que oscilan en cuanto a DP entre 3 y 6. Obsérvese el consumo preferencial de las moléculas α -(1,6) lineales con respecto a los restos ramificados. Obsérvese también la misma distribución/mecanismo de productos tal como se indica en la figura 3.

La figura 5 muestra la HPAEC-PAD de (1) MIMO producido en un cultivo iniciador de masa madre fermentado de manera espontánea a partir de trigo rojo duro (se confirmó *P. pentosaceus* mediante secuenciación de ARNr 16S); (2) licor separado de kimchi (se halló que contenía varias *Leuconostoc* spp., principalmente *L. gasicomitatum*, mediante secuenciación de ARNr 16S) con sacarosa y maltosa añadidas a una razón de 3:1; y (3) una muestra de MIMO ISOThrive™ producida mediante fermentación de sacarosa y maltosa con NRRL B-742. Los componentes marcados son A: sacarosa; B: rafinosa (patrón interno); C: maltosa, donde D, E, F, G, H, I, L, M, y N corresponden a MIMO con estructuras principales α -(1,6) lineales que oscilan en cuanto a DP entre 3 (panosa) y 10.

La figura 6 muestra el efecto que tiene la razón sacarosa:maltosa (S/M, p/p) en el momento de inoculación sobre la distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) a un pH fijo de 5,5. A medida que aumenta S/M, así lo hace la distribución de peso molecular.

La figura 7 muestra el pH óptimo para la dextransacarasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F o bien sin (cuadrados de color blanco) o bien con (cuadrados de color negro) estabilización mediante la adición de dextrano T-70 (Monchois, *et al.* 1998). La distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) aumenta a medida que se aproxima al óptimo.

La figura 8 muestra la curva de calentamiento/enfriamiento empleada durante un ciclo típico de esterilización *in situ* (SIP) ejecutado en un fermentador BioFlo 410 de New Brunswick.

La figura 9 muestra el comportamiento del pH de fermentación durante el transcurso de una fermentación de 14 l con *Leuconostoc citreum* ATCC 13146, la designación NRRL B-742. Obsérvese el inicio del control de pH con NaOH (40 % p/p) para mantener un pH de 5,50 a las 6 horas aproximadamente en la fase de crecimiento logarítmico.

La figura 10 muestra el avance de la fermentación mediante la densidad óptica (DO) durante el crecimiento en fase logarítmica de una fermentación de 14 l con *L. citreum* NRRL B-742.

La figura 11 muestra cromatogramas de HPAEC-PAD de (1) una mezcla de patrones; y (2) el producto de material compuesto New Classic (NC) descrito en el ejemplo 1, en el que los componentes son A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: sacarosa; F: maltosa; G-M se refieren a MIMO-DP3 a MIMO-DP9, respectivamente; y N-Q se refieren a maltooligosacáridos [α -(1,4)] con DP de 3-6, respectivamente.

La figura 12 muestra cromatogramas de HPAEC-PAD de productos de material compuesto (1) A2, y (2) NC en los que los componentes son A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: sacarosa; F: maltosa; G-M se refieren a MIMO-DP3 a MIMO-DP9, respectivamente. Obsérvense áreas de pico relativas más grandes para DP > 4 en el producto de material compuesto NC.

La figura 13 muestra los componentes de hidrato de carbono, mediante cromatografía de líquidos de alta presión-detección de índice de refracción (HPLC-RID) de (1) mezcla de patrones; productos de material compuesto (2) A2; y (3) NC en los que los componentes son A: MIMO con DP > 3; B: MIMO-DP3; C: maltosa; D: D-glucosa; E: D-manitol; F: maltotriosa; y G: D-fructosa.

La figura 14 muestra la segunda mitad de la superposición de HPLC-RID mostrada en la figura 13, aumentada en un factor de aproximadamente 10, de (1) mezcla de patrones; productos de material compuesto (2) A2; y (3) NC en los que los componentes son H: ácido láctico; I: glicerol; J: ácido acético; K: ácido fórmico; L: ácido propiónico; y M: ácido isobutírico.

La figura 15 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de materiales de referencia de desplazamiento químico incluyendo (1) D-panosa (MIMO-DP3); (2) isomaltotriosa; (3) maltotriosa; y (4) D-glucosa, equilibrados de manera anomérica, en los que la señal A corresponde a los protones anoméricos α -(1,4); B corresponde a los protones anoméricos α -(1,6); y C, D corresponden a los protones anoméricos α y β , respectivamente, en el extremo reductor.

La figura 16 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones anoméricas de 1 y 2, productos de material compuesto NC y A2, respectivamente y, 3, D-panosa (referencia de δ) en las que señal A corresponde a los protones anoméricos α -(1,4); la señal B corresponde a los protones anoméricos α -(1,6); las señales C y D corresponden a los protones anoméricos α y β , respectivamente, en el extremo reductor; y las señales E y F corresponden a los protones anoméricos α -(1,3) y α -(1,2), respectivamente.

La figura 17 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las

regiones no anoméricas de los productos de material compuesto (1) A2 y (2) NC.

La figura 18 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones alquílicas de los productos de material compuesto (1) NC y (2) A2 en las que la señal A se desconoce, B corresponde a los protones de acetilo (la diferencia se debe al pH, A2 = pH de 4,81, NC = pH de 6,57), C corresponde a los protones de metilo C3 de lactato; y D no está asignado. Obsérvese que la cantidad de acetato/lactato en 2 (A2) era inferior al límite de detección mínimo de HPLC-RID y apenas detectable en el material compuesto NC.

La figura 19 ilustra gráficamente la generación de especies químicas (tal como se detecta mediante HPAEC-PAD y HPLC-RID) durante todo el transcurso de una fermentación de 10 l (razón sacarosa:maltosa (S/M, p/p) = 2,00) con *L. citreum* NRRL B-742.

La figura 20 ilustra gráficamente la evolución de la distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) de los MIMO durante todo el transcurso de una fermentación de 10 l (razón sacarosa:maltosa (S/M, p/p) = 2,00) con *L. citreum* NRRL B-742. Obsérvese que la MWD continúa aumentando (hasta aproximadamente 15 horas) después del agotamiento de la sacarosa (a las 10 horas aproximadamente). La velocidad de crecimiento de cadena tiene lugar entonces a una velocidad inferior, pero constante, hasta el final de la fermentación (55 horas) cuando se logró una MWD de 642,5 Da.

La figura 21 ilustra gráficamente la generación de especies químicas (tal como se detecta mediante HPAEC-PAD y HPLC-RID) durante todo el transcurso de una fermentación de 10 l (sacarosa/maltosa = 2,75) con *L. citreum* NRRL B-742.

La figura 22 ilustra gráficamente la evolución de la distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) de los MIMO durante todo el transcurso de una fermentación de 10 l (S/M = 2,75) con *L. citreum* NRRL B-742. Obsérvese que la MWD continúa aumentando (hasta aproximadamente 15 horas) después del agotamiento de la sacarosa (a las 10 horas aproximadamente). La velocidad de crecimiento de cadena tiene lugar entonces a una velocidad inferior, pero constante, hasta el final (55 horas) cuando se logró una MWD de 760,7 Da.

La figura 23 muestra el comportamiento del pH y la densidad óptica (DO_{600}) durante la fase de crecimiento logarítmico de una fermentación de siembra de 300 l (sacarosa/maltosa = 2,00, lote #150622) con *L. citreum* NRRL B-742. Obsérvese que no se controla el pH, el cultivo alcanzó la fase logarítmica tardía/estacionaria, y la DO final fue de aproximadamente 2,8.

La figura 24 ilustra gráficamente el comportamiento del pH y la DO durante la fase de crecimiento logarítmico de una fermentación de 3000 l (sacarosa/maltosa = 2,75, lote #150622) con *L. citreum* NRRL B-742. Obsérvese que se controló el pH para que se mantuviera a 5,50 y que la DO_{600} final fue de aproximadamente 10,2.

La figura 25 ilustra gráficamente la generación de especies químicas (tal como se detecta mediante HPAEC-PAD y HPLC-RID) durante todo el transcurso de una fermentación de 3000 l (sacarosa/maltosa = 2,75, lote #150622) con *L. citreum* NRRL B-742.

La figura 26 ilustra gráficamente la evolución de la distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) de los MIMO durante todo el transcurso de una fermentación de 3000 l (sacarosa/maltosa = 2,75, lote #150622) con *L. citreum* NRRL B-742. Obsérvese que la distribución de peso molecular promedio en masa continúa aumentando (hasta aproximadamente 15 horas) después del agotamiento de la sacarosa (a las 10 horas aproximadamente). La velocidad de crecimiento de cadena tiene lugar entonces a una velocidad inferior, pero constante, hasta el final (55 horas) cuando se logró una distribución de peso molecular promedio en masa de 789,5 Da.

La figura 27 muestra un cromatograma de HPAEC-PAD del lote de producto #150622 en el que los componentes se identifican como A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: sacarosa; F: maltosa; y donde G-M corresponden a MIMO-DP3 a MIMO-DP9.

La figura 28 muestra cromatogramas de HPAEC-PAD durante la eliminación de manitol a partir del licor madre 1, y 2, 3 correspondientes a las etapas de cristalización de compuesto, 1 y 2, respectivamente. Los componentes se identifican como A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: sacarosa; F: maltosa; y G-M correspondientes a MIMO-DP3 a MIMO-DP9. Obsérvese que se reduce el manitol y que, de ese modo, se aumenta la pureza de MIMO.

La figura 29 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones anoméricas de 1 y 2, productos NC y lote #150622, respectivamente y, 3, D-panosa (referencia de δ) en las que la señal A corresponde a los protones anoméricos α -(1,4); la señal B corresponde a los protones anoméricos α -(1,6); las señales C y D corresponden a los protones anoméricos α y β , respectivamente, en el extremo reductor; y las señales E y F corresponden a las regiones correspondientes a los protones anoméricos α -(1,3) y α -(1,2), respectivamente. Obsérvese el segundo doblete mínimo o ausente en el lote #150622; este se debe probablemente

a la etapa de acidificación, que evita la posible epimerización catalizada por álcali de C2.

La figura 30 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones no anoméricas de los productos 1) NC, y 2) lote #150622.

La figura 31 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones alquílicas de los productos (1) lote #150622; y (2) A2. La señal A se desconoce; la señal B corresponde a los protones de acetilo (la diferencia se debe al pH, $A_2 = 4,81$, lote #150622 = 6,08); la señal C corresponde a los protones de metilo C3 de lactato; y la señal D no está asignada. Obsérvese que la cantidad de acetato/lactato tanto en 1 como en 2 (A2) era inferior al límite de detección mínimo (MDL) de HPLC-RID.

La figura 32 muestra las cantidades de especies químicas tal como se detecta mediante HPAEC-PAD y HPLC-RID durante todo el transcurso temporal de una fermentación de 3000 l (S/M = 2,75, lote #151105) usando *L. citreum* NRRL B-742.

La figura 33 ilustra la evolución de la distribución de peso molecular promedio en masa de los MIMO durante todo el transcurso de una fermentación de 3000 l (S/M = 2,75, lote #151105) con *L. citreum* NRRL B-742. Obsérvese que la MWD continúa aumentando (hasta aproximadamente 15 horas) después del agotamiento de la sacarosa (a las 10 horas aproximadamente). La velocidad de crecimiento de cadena tiene lugar entonces a una velocidad inferior, pero constante, hasta el final de la fermentación (55 horas) cuando se logró el peso molecular de aproximadamente 776,5 Da.

La figura 34 muestra cromatogramas de HPAEC-PAD de (1) lote de producto #150622, y (2) lote de producto #151105, en los que los componentes se identifican como A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: D-leucrosa; F: sacarosa; G: maltosa; y donde H-N corresponden a MIMO-DP3 a MIMO-DP9, respectivamente. Por ejemplo, obsérvese la alta proporción de MIMO-DP5 (J), MIMO-DP6 (K), y MIMO-DP7 (L).

La figura 35 muestra una superposición de cromatogramas de HPAEC-PAD que comparan el (5) producto de MIMO ISOThrive™ lote #150622 con productos basados en MIMO comerciales, (1) polvo IMO (Bioneutra VitaFiber); (2) polvo IMO (Baolingbao IMO-900); (3) polvo IMO (TopHealth AdvantaFiber 90); y (4) polvo IMO (Solabia Bioecolians). Los componentes de estas composiciones se identificaron como A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: isomaltosa; F: sacarosa; G: maltosa; y H-N correspondientes a MIMO-DP3 a MIMO-DP9, respectivamente. Obsérvese la presencia del 30-45 % de isomaltosa en los IMO 1, 2, y 3. Las MWD tenían un punto de corte brusco en DP 5 para IMO 1. Hubo trazas prácticamente indetectables de MIMO-DP6 en los IMO 2 y 3. Obsérvese también la presencia de una extensa ramificación en IMO 4 que no se observa en la composición generada tal como se describe en el presente documento.

La figura 36 es un diagrama esquemático de un método de fabricación de MIMO.

Las figuras 37A-37B ilustran gráficamente la inhibición del crecimiento de células de cáncer de colon mediante medios obtenidos a partir del cultivo de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus gasseri* usando un ensayo de proliferación de células CyQUANT NF. La dosificación fue de 0 (control), 100, 200, 400, y 800 $\mu\text{g/ml}$ de proteína equivalente (ensayo BCA) en ambos casos. La figura 37A muestra que el caldo a partir de cultivos de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus gasseri* redujo la proliferación de células de cáncer de colon HCT-15 de manera dependiente de la dosis con respecto a medios de cultivo de control. La proliferación de células se redujo en un 60 % a la dosis máxima sometida a prueba, lo que indica una dosis de aproximadamente 1,3 $\mu\text{g/g}$ de nisina A equivalente. El caldo producido usando *L. gasseri* demostró un claro umbral de efecto equivalente a aproximadamente 0,65 $\mu\text{g/g}$ de nisina A. La figura 37B muestra que el caldo a partir de cultivos de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus gasseri* redujo la proliferación de células de cáncer de colon DLD-1 de manera dependiente de la dosis con respecto a medios de cultivo de control. La actividad antiproliferativa fue similar a la observada frente a células HCT-15. De nuevo, el caldo producido con *Lactobacillus gasseri* demostró un umbral de dosis de aproximadamente la mitad de la dosis equivalente de nisina A. La barra más a la izquierda en cada agrupación muestra el crecimiento de células cancerosas sin intervención. La segunda barra (desde la izquierda) muestra el crecimiento de células cancerosas en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de caldo de intervención indicado como *Lactococcus lactis* o *Lactobacillus gasseri*. La tercera barra (desde la izquierda) muestra el crecimiento de células cancerosas en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de caldo de control. La cuarta barra (desde la izquierda) muestra el crecimiento de células cancerosas en presencia de 400 $\mu\text{g/ml}$ de caldo de control. La quinta barra (desde la izquierda o la barra más a la derecha) muestra el crecimiento de células cancerosas en presencia de 800 $\mu\text{g/ml}$ de caldo de control.

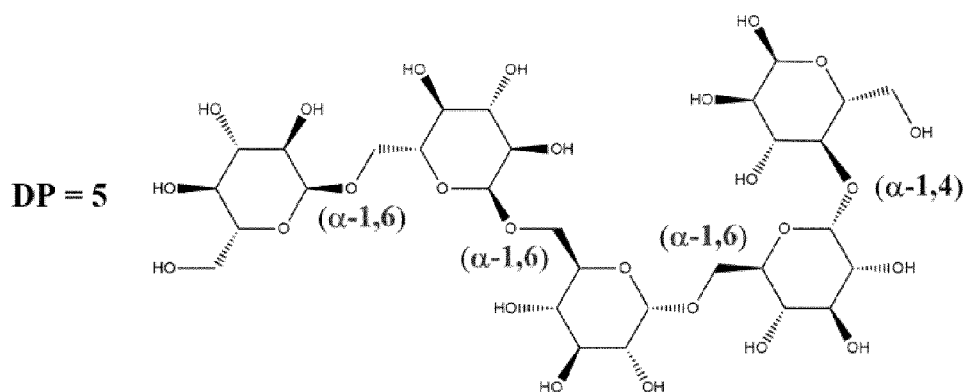
La figura 38 ilustra gráficamente el crecimiento de *Weissella viridescens* en presencia de cantidades conocidas de nisina A (líneas de color negro) y nisina Z (líneas de color gris). Las líneas a trazos ilustran el análisis de regresión para proporcionar una aproximación de las concentraciones inhibitorias mínimas de nisina A (línea a trazos de color negro) y nisina Z (línea a trazos de color gris) para inhibir el crecimiento de *Weissella viridescens*.

Descripción detallada

Las composiciones descritas en el presente documento contienen oligosacáridos que contienen maltosa, denominados maltosil-isomaltooligosacáridos (MIMO), que son una fuente de energía preferida de diversas bacterias intestinales beneficiosas (por ejemplo, *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium spp.*) con respecto a otros tipos de prebióticos de oligosacáridos. Las composiciones descritas en el presente documento pueden fomentar el crecimiento y las actividades de tales bacterias intestinales beneficiosas. Dado que determinados tipos de bacterias beneficiosas (por ejemplo, cepas de *L. lactis*) pueden producir diversos tipos de bacteriocinas (por ejemplo, nisinas) que pueden actuar como agentes antineoplásicos y/o como agentes antimicrobianos, las composiciones descritas en el presente documento pueden ayudar a reducir los síntomas o la incidencia de cierto tipo de enfermedades y afecciones. Por ejemplo, los estudios iniciales indican que las composiciones descritas en el presente documento pueden reducir o eliminar los síntomas en el 81 % de los usuarios que identificaron por sí mismos que tenían síntomas de reflujo de ácido una vez a la semana o más.

Los maltosil-isomaltooligosacáridos en las composiciones descritas en el presente documento incluyen residuos de glucosa unidos principalmente mediante enlaces α -(1,6), y uno o dos residuos de maltosa (por ejemplo, en el extremo reductor) que pueden unirse a una unidad de glucosa mediante un enlace α -(1,4). La mayoría de los enlaces entre las unidades de glucosa en los maltosil-isomaltooligosacáridos en las composiciones son enlaces α -(1,6), aunque pueden estar presentes pequeños números de enlaces α -(1,2), α -(1,3), y α -(1,4). Por tanto, los maltosil-isomaltooligosacáridos son normalmente oligosacáridos lineales, con pocos puntos de ramificación. Los maltosil-isomaltooligosacáridos terminan en una unidad de maltosa. La distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) de los MIMO en las composiciones descritas en el presente documento puede variar dependiendo del grado de polimerización (DP). Por ejemplo, las composiciones de maltosil-isomaltooligosacáridos pueden contener una distribución de peso molecular promedio en masa de aproximadamente 520 a 1200 Dalton, o de aproximadamente 640 a 1000 Dalton. En algunos casos, las composiciones de maltosil-isomaltooligosacáridos contienen una distribución de peso molecular promedio en masa de aproximadamente 730 a 900 Dalton.

Un ejemplo de un MIMO con un único enlace maltosilo [-O- α -(1,4)-] en el extremo reductor, y un DP de 5, puede tener la siguiente estructura química:



Los MIMO en las composiciones descritas en el presente documento pueden tener varias unidades de glucosa. Por ejemplo, los MIMO en las composiciones descritas en el presente documento pueden tener desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 18 unidades de glucosa, o desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 17 unidades de glucosa, o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 16 unidades de glucosa, o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 15 unidades de glucosa, o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 14 unidades de glucosa, o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 13 unidades de glucosa, o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 12 unidades de glucosa. En general, los oligosacáridos que contienen maltosa tienen no más de aproximadamente 17 unidades de glucosa, o no más de aproximadamente 16 unidades de glucosa, o no más de aproximadamente 15 unidades de glucosa, o no más de aproximadamente 14 unidades de glucosa, o no más de aproximadamente 13 unidades de glucosa, o no más de aproximadamente 12 unidades de glucosa, o no más de aproximadamente 11 unidades de glucosa, o no más de aproximadamente 10 unidades de glucosa, por ejemplo, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.

Tal como se indica, los MIMO en las composiciones descritas en el presente documento pueden tener pequeños números de enlaces α -(1,2)-glucosilo, α -(1,3)-glucosilo, y α -(1,4)-glucosilo. Por tanto, los MIMO en las composiciones descritas en el presente documento pueden tener pequeños números de puntos de ramificación. Por ejemplo, los MIMO en las composiciones descritas en el presente documento pueden tener 0-4 puntos de ramificación, o 0-3 puntos de ramificación, o 0-2 puntos de ramificación, o 0-1 puntos de ramificación.

Oligosacáridos y métodos de preparación de los mismos

Los oligosacáridos son una clase extremadamente diversa de moléculas, que consisten en cadenas cortas de moléculas de monosacárido que se componen de menos de dieciocho, menos de dieciséis, menos de catorce,

menos de doce, o menos de diez unidades de monosacárido. Los monosacáridos observados en los oligosacáridos prebióticos son normalmente galactosa (galactooligosacáridos, GOS), glucosa (glucooligosacáridos, GlcOS), xilosa (xilooligosacáridos, XOS), y fructosa (fructooligosacáridos, FOS). Los GlcOS son una clase de oligómeros de hidratos de carbono que incluyen los isomaltooligosacáridos (IMO). Los IMO son glucosil-sacáridos con una estructura de núcleo basada en una estructura principal con enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6) que puede incluir ramificaciones con enlaces α -(1 $\rightarrow$ 4), α -(1 $\rightarrow$ 3) (nigeroooligosacáridos) y/o α -(1 $\rightarrow$ 2) (kojioligosacáridos) (Yun, J. *et al.*, Biotechnol. Lett., 1994, 16:1145-1150). Estos enlaces glucosídicos se encuentran normalmente en jarabes de IMO comerciales (Goffin, D. *et al.*, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 51:394-409 (2011)).

Los oligosacáridos pueden extraerse a partir de plantas (FOS a partir de agave, yacón; inulina/FOS a partir de achicoria), obtenerse a partir de almidón hidrolizado o exopolisacárido (por ejemplo, dextrano, GlcOS, IMO, MIMO), prepararse mediante transglucosilación mediante enzimas inmovilizadas, o generarse mediante productos de fermentación que se adecúan al exopolisacárido (EPS) específico de especie en presencia de una molécula aceptora (MIMO). Los isomaltooligosacáridos, o IMO, son oligodextranos resultantes de la homopolimerización de la glucosa y, por tanto, son una subclase distinta de glucooligosacáridos (GlcOS).

Sin embargo, los tipos de los MIMO proporcionados en el presente documento no son producidos por las plantas. Por tanto, los MIMO descritos en el presente documento no se encuentran en los alimentos que ingieren normalmente los seres humanos. En su lugar, los MIMO descritos en el presente documento son producidos en condiciones de fabricación controladas por cepas específicas de bacterias que expresan tipos singulares de enzimas necesarias para proporcionar los atributos estructurales de los MIMO objeto.

El dextrano puede ser producido, por ejemplo, por determinadas enzimas. Por ejemplo, la mayoría de las especies de *Leuconostoc* expresan una enzima glucosiltransferasa (o un conjunto de isoformas de enzima) conocida como dextran-sacarasa. Esta enzima, en presencia de sacarosa, realiza dos funciones. En primer lugar, la enzima escinde la sacarosa y expulsa la fructosa. Luego, la enzima escinde otra molécula de sacarosa y la unidad de glucosa procedente de tal escisión se une de manera glicosídica a la primera glucosa. Esto continúa hasta que resultan cadenas de α -(1,6)-poliglucano muy largas (de >10 kDa hasta aproximadamente 40 MDa), conocidas como "dextrano".

Si el dextrano se trata con una enzima dextranasa, puede dar como resultado α -(1,6)-glucosidasa, IMO, que tendrá los enlaces ramificados intrínsecos a la dextran-sacarasa producida por el organismo parental incluyendo, por ejemplo, un grado de polimerización (DP) de 2-10, y el 15 % de enlaces α -(1,3) (cuando se usa *L. mesenteroides* NRRL B-1426; Kothari y Goyal, 2015).

En algunos casos, un tratamiento controlado de dextrano procedente de *L. mesenteroides* B-512F produciría una distribución de moléculas α -(1,6) lineales (no ramificadas) (oligodextranos) y un tratamiento similar mediante *L. citreum* B-1299 produciría un dextrano con una distribución de moléculas α -(1,6) con ramificaciones α -(1,2) (oligodextranos ramificados). También sería posible mezclar tipos de dextrano antes de la hidrólisis.

Sin embargo, la dextran-sacarasa, en presencia de sacarosa y una molécula aceptora (tal como maltosa), creará MIMO. Luego se "interrumpe" la ruta típica para la síntesis de dextrano mediante dextran-sacarasa por la molécula aceptora provocando que termine prematuramente el crecimiento de la cadena. En efecto, la presencia de un aceptor tal como la maltosa limita el peso molecular del oligosacárido. Cuando se produce esto, específicamente con la maltosa, resultarán cadenas cortas de glucosa terminadas con maltosa. Estas moléculas se denominan maltosil-isomaltooligosacáridos de tipo panosa.

Kuriki, *et al.* (1993) observaron que el tratamiento del almidón con enzimas, tales como amilasa/neopulalanasa, o bien conjuntamente o bien secuencialmente, producía panosa (MIMO-DP3), isopanosa, y maltooligosacáridos en el intervalo de 3 a aproximadamente 5 (con una ponderación importante hacia un DP de 3), lo que puede producir una distribución de moléculas ramificadas resistentes (dextrina). Sakano, *et al.* (1978) observaron que también se ha hallado que el tratamiento del pululano con isopulalanasa produce panosa (MIMO-DP3).

Tal como se indica, la dextran-sacarasa es una glucosiltransferasa que cataliza la transferencia de un residuo de glucosa desde la sacarosa hasta una cadena de poliglucano en crecimiento. Muchas especies de bacterias, en particular *Leuconostoc spp.*, producen una o más de estas enzimas, y el patrón de ramificación singular del dextrano así formado depende de la cepa. De hecho, los patrones de ramificación del dextrano formado por un organismo pueden usarse para la especiación a nivel de cepa. Por tanto, el tipo de enzima o microbio usado para generar un oligosacárido puede influir significativamente en la estructura final de la mezcla de oligosacáridos producida.

Hay dos amplias variedades de dextran-sacarasa (cada una con una o más isoformas). En primer lugar, está la fracción soluble, que puede aislarse a partir de caldo centrifugado (sobrenadante). En segundo lugar, hay una fracción que contiene dextran-sacarasa "insoluble" o "poco soluble" dado que está unida a la pared celular como un complejo de dextrano. Siendo responsable de la formación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) capsulares, esta dextran-sacarasa insoluble establece la capa necesaria para la conversión de sacarosa en dextrano en un medio a granel, y tarda aproximadamente dos horas en formarse después de expresarse por la presencia de

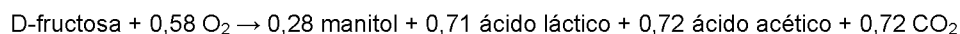
sacarosa en los medios (Brooker, 1977). Una vez formado, el dextrano forma una cápsula gruesa alrededor de la célula. Cuando se produce esto en mezclas a granel, se forman biopelículas gruesas y recalcitrantes. La distinción entre dextranosa soluble e insoluble es importante dado que las dos pueden producir dextranos con distribuciones de peso molecular diferentes y patrones de enlace diferentes. Esto es la causa de que, además de la distorsión conformacional del/de los sitio(s) activo(s), las enzimas inmovilizadas se comportan de manera diferente a las de una fermentación en masa.

Mecánicamente, las enzimas dextranosa pueden ser el "reactivo" de síntesis principal para la producción de oligosacáridos, incluyendo MIMO. Por ejemplo, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512FMC puede producir >95 % de α -(1,6)-poliglucano lineal a partir de la sacarosa.

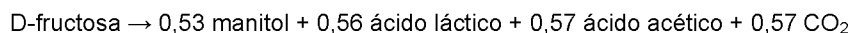
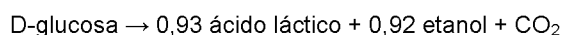
Metabólicamente, *Leuconostoc spp.* utiliza normalmente hidratos de carbono (sacarosa, glucosa, y fructosa) mediante fermentación heteroláctica (Dols, *et al.* 1997), por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1. En todos estos procedimientos de producción mediados por microbios, parte de la sacarosa se transporta al interior de la célula con propósitos metabólicos, lo que explica por qué el rendimiento del dextrano y/o de los oligosacáridos producidos se limita a aproximadamente el 50-55 %/sacarosa total. Esto también indica que las velocidades competitivas de metabolismo y producción de dextrano pueden tener un impacto en el resultado de una fermentación.

A continuación se proporciona la estequiometría de fermentación esperada para condiciones aerobias y microaerobias.

Aerobias



Microaerobias



Las mezclas de isomaltooligosacáridos se producen generalmente mediante la acción de enzimas inmovilizadas en materias primas de monosacáridos o disacáridos. También pueden producirse isomaltooligosacáridos mediante transglucosilación de hidrolizados de almidón seguido de separación cromatográfica. En un procedimiento preliminar, Chludzinski *et al.* produjeron isomaltooligosacáridos ramificados usando dextranosa (EC 2.4.1.5) expresada a partir de cultivos bacterianos tales como *Leuconostoc spp.* y *Streptococcus spp.* (Chludzinski, A. M., *et al.*, J. Bacteriol. B:1-7 (1974)). Roper y Koch dieron a conocer más adelante la producción de mezclas de isomaltooligosacáridos a partir de hidrolizados de almidón (maltosa y maltodextrinas) a través de la acción de la α -transglucosidasa (EC 2.4.1.24) a partir de *Aspergillus spp.* (Starch, 1988, 40:453-459).

Una diferenciación adicional dentro de la clase de MIMO implica la adición de ramificaciones de glucosilo. Tal como se ilustra en el presente documento, una ramificación de este tipo puede tener una longitud de un único monosacárido. Esto puede producirse en las posiciones α -(1,2), α -(1,3), y α -(1,4), normalmente más cerca del extremo no reductor de la cadena de oligosacárido.

Los patrones de ramificación son singulares al conjunto de dextranosas expresado por una especie bacteriana particular, y varían enormemente entre las diferentes cepas bacterianas. Por ejemplo, mientras que *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F crea EPS de dextrano casi apenas ramificado, que consiste en >95 % de enlaces α -(1,6), el dextrano producido por *L. mesenteroides* NRRL B-1299 contiene una distribución de tres oligómeros ramificados por DP [aproximadamente el 65 % de α -(1,6), el 22 % de α -(1,2), y el 12 % de α -(1,3)], y *L. citreum* NRRL B-742 produce un dextrano que se encuentra en un punto intermedio y puede contener el 5 %-15 % de α -(1,3). En el caso de NRRL B-512F, las diferencias pueden atribuirse a una única enzima sacarosa-glucanotransferasa que es responsable de los enlaces α -(1,6), y en el caso de NRRL B-1299, las diferencias pueden deberse a al menos tres isoformas de enzima (Dols, *et al.* Appl Environ Microbiol 64(4): 1298-1302 1998). B-1299 también es capaz de expresar glucosa-glucosiltransferasa y fructosa-glucosiltransferasa cuando se cultiva en medio de glucosa y fructosa, respectivamente (*id.*). Estas enzimas también pueden crear diferentes patrones de ramificación. Las diferencias se ilustran en la figura 2.

Los inventores también han observado que el mismo conjunto de enzimas (producido por *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *mesenteroides* (Tsenkovskii) van Tieghem ATCC® 11449™ NRRL B-1299) produce un patrón de ramificación diferente cuando se inmoviliza que cuando es nativo en disolución libre; los resultados fueron claros para los oligosacáridos con DP de 5.

Tanto el patrón de ramificación como el peso molecular pueden tener un profundo efecto sobre la selectividad de una composición prebiótica. Por ejemplo, Hu *et al.* (2013) observaron que, mientras que *Lactobacillus reuteri* consumió MIMO de cadena más corta, las cadenas más largas (de mayor peso molecular) son las preferidas por *Bifidobacteria*. Además, qué bacterias comerán un oligosacárido prebiótico determinado depende del conjunto de enzimas glicolíticas expresado por ese tipo bacteriano. Por ejemplo, el MIMO contenido en la composición descrita en el presente documento [$>80\%$ de α -(1,6) lineal; también denominado ISOThrive™] puede ser fermentado por *Lactobacillus casei* NRRL B-1922. En la figura 3 se proporcionan evidencias de ello, donde el material compuesto ISOThrive™ A2 (véase el ejemplo #1) se despolimeriza para dar D-glucosa y D-maltosa. Por tanto, las composiciones descritas en el presente documento (que incluyen MIMO tales como los de ISOThrive™) pueden caracterizarse como prebióticos para *Lactobacillus casei* NRRL B-1922, que es representativa de una clase bacteriana probiótica que es grande y popular.

Por medio de comparación con una composición que contiene un MIMO de tipo altamente ramificado (producido mediante dextranasa de NRRL B-1299), puede demostrarse que los enlaces α -(1,6) son los preferidos por este organismo, y que los enlaces α -(1,2), y α -(1,3) no lo son. Esta comparación se proporciona en la figura 4.

Moller, *et al.* (2012) observaron además que otra cepa probiótica popular, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, prefería MIMO-DP3 (panosa) con respecto a moléculas de IMO α -(1,6) lineales (DP de 3-5). Kothori y Goyal (2012) observaron que los IMO producidos a partir de dextranasa de NRRL B-1426 (DP de 2-10, aproximadamente el 15 % de enlaces de ramificación α -(1,3)) eran resistentes a la acción de dextranasa, α -glucosidasa, y α -amilasa. Dado que la glucosidasa α -(1,6) es necesaria para una utilización eficiente de los IMO por muchas especies bacterianas (por ejemplo, *L. casei* y *acidophilus*), la resistencia a la dextranasa tiende a descartar el potencial prebiótico de esta clase de IMO para las cepas de *Lactobacillus* probióticas más prevalentes.

Los MIMO que se adecúan a la estructura de oligosacáridos de tipo panosa pueden existir de manera natural, o pueden ser inducidos por el hombre, en una variedad de alimentos fermentados (valorados como edulcorante más que prebiótico) incluyendo kimchi con cultivo iniciador de *Leuconostoc* fortificado con sacarosa y maltosa (Cho, *et al.* 2014). De hecho, se han aislado muchas especies bacterianas, que se sabe que sintetizan exopolisacáridos (EPS), por ejemplo, dextrano o levano, a partir de sacarosa, a partir de cultivos iniciadores de masa madre. Los ejemplos incluyen los siguientes (véase Tieking, *et al.* 2003):

Especies aisladas, TMW #:	Tipo de EPS:	Monómero:
<i>L. sanfranciscensis</i> spp.	Levano	Fructosa
<i>L. frumenti</i> spp.	Levano	Fructosa
<i>L. pontis</i> spp.	Levano	Fructosa
<i>L. panis</i> 1.649	Levano	Fructosa
<i>L. reuteri</i> 1.106	Dextrano	Glucosa
<i>L. reuteri</i> 1.109	Reuterano	Glucosa
<i>W. confusa</i> 1.617	Dextrano	Glucosa
<i>W. confusa</i> 1.934	Levano	Fructosa

También se han observado otros organismos heterofermentativos anaerobios facultativos incluyendo (Corsetti y Settanni, 2007) *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, y *Streptococcus* spp., que se han aislado a partir de masa madre.

Tal como muestran los inventores, todos excepto *Enterococcus* spp. (que produce EPS heteropolimérico) producen o bien dextrano o bien levano (véase también Mozzi, *et al.* 2006). Los inventores han mostrado que está presente algo de MIMO en una fermentación espontánea de masa madre de harina de trigo rojo, donde se observó que surgía de la sacarosa en la harina y la maltosa procedente del almidón. Véase, por ejemplo, la figura 5. Un análisis posterior reveló que el cultivo iniciador era *Pediococcus pentosaceus*.

Las cepas bacterianas presentes en el kimchi (comienzo y fin de la fermentación) se determinaron mediante PCR de alto rendimiento y secuenciación del ARNr 16S; los resultados se proporcionan a continuación:

ID de muestra	Especie	Zumo de kimchi
NR 102781	<i>Leuconostoc carnosum</i> JB16	6,8 %
NR 074997	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> LMG	42,1 %
NR 102984	<i>Leuconostoc gelidum</i> JB7	12,2 %

NR 025204	<i>Leuconostoc inhae</i> IH003	2,6 %
-----------	--------------------------------	-------

Recientemente, se ha notificado el uso de la enzima glucosiltransferasa aislada a partir de *Leuconostoc mesenteroides* por parte de Remaud *et al.*, que dieron a conocer la producción de oligosacáridos lineales y con ramificaciones cortas con enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6) y una maltosa en el extremo reductor (Remaud, M., *et al.*, J. Carbohydrate Chem., 1992, 11(3):359-378). Remaud *et al.* usaron una razón inicial de materias primas de sacarosa:maltosa 7:1 en una reacción catalizada por glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 13146 extracelular que producía dextranos ramificados con enlaces α -(1-3) (*id.*). El mismo grupo ha notificado la producción de mezclas de isomaltooligosacáridos α -(1,2) ramificados a partir de sacarosa con una reacción aceptora catalizada por dextranasa (Remaud-Simeon, M. *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol. 1994, 44:101-17).

Paul *et al.* dieron a conocer la síntesis y purificación de mezclas de isomaltooligosacáridos ramificados que contienen un enlace α -(1,2) mediante la acción de glucosiltransferasa soluble e insoluble aislada a partir de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 en sacarosa y un aceptor de glucosilo tal como maltosa (o un material rico en maltosa, tal como un producto de hidrólisis de almidón), isomaltosa, metil- α -glucósido, isomaltotriosa o glucosa (o un material rico en glucosa, tal como un producto de hidrólisis de almidón) (Paul, F. *et al.*, patente estadounidense n.º 5.141.858).

La D-fructosa, el subproducto de transglucosilación mediante sacarosa, es un compuesto difícil de separar a partir del producto de isomaltooligosacárido, y el uso de este producto en la nutrición humana puede ser perjudicial, dada la información actual sobre los efectos negativos de los jarabes de alto contenido en fructosa (véanse: Ouyang, X., *et al.*, J. Hepatol., 2008, 48(6):993-9. doi: 10.1016/j.jhep.2008.02.011. Epub del 10 de marzo de 2008; Dhingra, R. *et al.*, Circulation, 2007, 116:480-488; Swanson, J. E., *et al.*, Am. J. Clin. Nutr., 1992, 55(4):851-856; y Vartanian, L. R., *et al.*, Am. J. Public Health, 2007, 97(4):667-75. Epub del 28 de febrero de 2007).

Métodos de producción de composiciones de MIMO preferidos

En la figura 36 se proporciona un diagrama de flujo de procedimiento del procedimiento de fabricación. En general, el procedimiento consiste en dos etapas incluyendo, en primer lugar, la síntesis enzimática de MIMO mediante dextranasa extracelular expresada por un organismo adecuado durante la fermentación, en medio rico que contiene sacarosa, y en segundo lugar, el procesamiento posterior para eliminar biomasa, sales/minerales residuales, y metabolitos bacterianos.

Determinados metabolitos, particularmente el D-manitol, pueden permanecer en la composición de productos de MIMO y afectar positivamente a su carácter organoléptico.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden tener un pH que sea lo suficientemente bajo (pH de 1,5 a 2,8, pH de 1,5 a 4,2, o pH de 2,0 a 4,2) como para impedir el deterioro por microbios y/o los agentes patógenos mientras que se mejora el carácter organoléptico de la composición. Por ejemplo, en algunos casos, el pH del producto puede ser un pH de 1-7, o un pH de 1-6, o un pH de 1-4, o un pH de 1-3, o un pH de 1,5-3,0, donde se prefiere un pH de 1,5-2,8. Pueden añadirse una variedad de acidulantes incluyendo, pero sin limitarse a, ácidos orgánicos incluyendo los ácidos cítrico, málico, láctico, tartárico, fumárico, succínico, ascórbico, benzoico, adípico, caprílico, propiónico, acético, y sales (mono-, di- y tri- Na, Mg, Ca, etc.), estereoisómeros (L/D, R/S, meso), rotámeros, ésteres, y mezclas de los mismos, y ácidos minerales incluyendo los ácidos fosfórico, clorhídrico, sulfúrico, y sales, ésteres, y mezclas de los mismos, y aminoácidos, incluyendo lisina, cisteína, metionina, ácido glutámico, y ácido aspártico, y sales, ésteres, y mezclas de los mismos.

Además, en algunos casos, la composición puede concentrarse hasta una actividad de agua (aW) lo suficientemente alta como para proteger la vida útil de almacenamiento.

Por tanto, en algunos casos, las bajas cantidades de agua y el bajo pH pueden proteger la composición frente al deterioro o al crecimiento microbiano.

La distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) del MIMO tiende a aumentar con la razón sacarosa:maltosa (S/M) presente en el momento de inoculación (véase la figura 6). Una aproximación de la relación entre la razón sacarosa:maltosa y la MWD del producto ($\pm 6\%$, $R^2 = 0,9715$, $N = 29$) puede obtenerse como: $MWD, Da = 151,56 * S/M + 358,58$. Obsérvese que, aunque una solicitud de patente estadounidense previa con n.º de serie 14/833.094, presentada el 22 de agosto de 2015, menciona que, a medida que aumenta S/M, así lo hace la distribución de peso molecular, esa solicitud previa no proporcionó ninguna relación matemática entre la razón sacarosa:maltosa y la MWD del producto. Se han realizado estudios adicionales, y en el presente documento se ha definido con mayor precisión la relación entre la razón sacarosa:maltosa y la MWD del producto.

La distribución de peso molecular promedio en masa también depende del pH óptimo de la(s) dextranasa(s) expresada(s) por el organismo fermentador. Para las dextranasas procedentes de *Leuconostoc spp.* (NRRL B-512F, B-742, y B-1299), este óptimo es de $5,5 \pm 0,3$ (Miller *et al.* 1986, Dols-Lafargue *et al.* 2001). Parece que este

comportamiento con respecto al pH se conserva dentro de enzimas producidas por una variedad de organismos. Por ejemplo, el pH óptimo para la dextranasa aislada a partir de *Pediococcus pentosaceus* es de 5,4 (Patel, *et al.* 2011) y el de *Streptococcus mutans* era óptimo a 5,5 (Chludzinski *et al.* 1974). El pH óptimo es bastante amplio, y puede verse afectado por la concentración de sustrato (Sarwat, *et al.* 2008), la fuerza iónica, y la presencia de determinados cationes tales como magnesio y calcio (Patel, *et al.* 2011). Además, las delecciones de genes que modifican el extremo carboxilo-terminal del sitio activo en la dextranasa de NRRL B-512F no afectaron ni a la actividad ni al pH óptimo (Monchois, *et al.* 1998). En la figura 7 se proporciona una curva típica de pH óptimo para la enzima de B-512F, y la dextranasa implicada en la síntesis de la composición descrita en el presente documento es típica.

La aproximación de la distribución de peso molecular promedio en masa (MWD) se obtiene mediante una función dictada por el pH óptimo, pero, en el procedimiento realizado, está atenuada, y parece que a una razón sacarosa:maltosa, S/M, de 2,00 (aproximadamente 2,73 en el momento de inoculación) tiene un máximo cuadrático entre un pH de 5,5 y 6,0 cuya aproximación puede obtenerse mediante lo siguiente:

$$\text{MWD, Da} = -159,1 * \text{pH}^2 + 1866,1 * \text{pH} - 4688.$$

Obsérvese que, aunque una solicitud de patente estadounidense previa menciona que, a medida que el pH o bien aumenta por encima o bien disminuye por debajo del intervalo óptimo para la enzima, disminuyen tanto la distribución de peso molecular como el rendimiento de MIMO, esa solicitud previa no proporcionó ninguna relación matemática entre el pH establecido durante la fermentación y la MWD del producto. Se han realizado estudios adicionales, y en el presente documento se ha definido con mayor precisión la relación entre el pH y la MWD del producto.

Los organismos usados en el presente documento, incluyendo *Leuconostoc mesenteroides*, son capaces de producir dextranasa, y pueden utilizarse para producir la composición que contiene maltosil-isomaltoligosacáridos según los métodos descritos en el presente documento. En otro ejemplo, puede usarse *L. citreum* ATCC 13146 (NRRL B-742). Los expertos en la técnica conocen esta bacteria por otras designaciones, incluyendo la designación *Leuconostoc citreum* ATCC 13146, la designación NRRL B-742, la designación *Leuconostoc citreum* Farrow, y la designación *L. amelibiosum*. También puede emplearse la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *mesenteroides* (Tsenkovskii) van Tieghem ATCC® 11449™ (NRRL B-1299). Además, los inventores también han sometido a prueba *L. citreum* B-1355, *Weissella confusa* B-1064, y *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27651. *L. citreum* B-1355 y *Weissella* producen MIMO, y pueden producir moléculas de MIMO más grandes.

Otros microorganismos productores de dextranasa/alternansacarasa útiles incluyen, pero sin limitarse a, *Leuconostoc spp.* (específicamente *mesenteroides*, *citreum*, *gasicomitatum*, *carosum*, *gelidum*, *inhae*, y *kimchi*), *Weissella spp.* (específicamente *confusa*, *kimchi*), *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.* (específicamente *mutans*), *Lactobacillus spp.* (por ejemplo, *reuteri*), *Pediococcus spp.* (específicamente *pentosaceus*), y determinadas *E. coli* mutantes.

También pueden aislarse microorganismos útiles, o cultivos mixtos de los mismos, a partir de fuentes naturales incluyendo, pero sin limitarse a, cultivos iniciadores de masa madre espontáneos (naturales) (la mezcla de bioorganismos usada en la producción de pan de masa madre) y kimchi.

El organismo usado en los ejemplos descritos en el presente documento es *Leuconostoc citreum* Farrow ATCC 13146 (NRRL B-742).

Síntesis

En general, tras el inicio del procedimiento de fermentación, se lava, limpia y esteriliza todo el sistema del equipo. Se carga un tanque de fermentación con los componentes necesarios del medio (vitaminas, sulfatos, fosfatos, sales y otros materiales típicos usados para el cultivo bacteriano, sacarosa, y maltosa en una razón de sacarosa con respecto a maltosa definida. Ninguno de los componentes es OMG y todos ellos están certificados como Kosher/Pareve, incluyendo la reserva de viales bacterianos. Por separado, se cultiva el inóculo (en el enfoque preferido, ATCC 13146) hasta lograr una densidad óptica de al menos 1 (DO, o absorbancia a 660 nm mediante un espectrofotómetro UV-VIS), y se añade a la fermentación en un volumen en el intervalo de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 % (1 % en el enfoque preferido) de la cantidad contenida en el medio a granel. La fermentación tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 27 °C y se mantiene a un pH de 4,0-6,0 (5,5 en el enfoque preferido) mediante la adición de hidróxido de sodio al 50 % p/p. La fermentación no se airea, pero el espacio de cabeza se presuriza con aire según sea necesario para mantener una presión positiva. La fermentación continúa hasta que no haya presente fructosa, durante un periodo de aproximadamente 25 a 60 horas. Las características y el comportamiento de la materia prima, los productos, y los metabolitos durante todo el transcurso de la fermentación se proporcionan en los ejemplos 3, 4, 6, y 7. La mayor parte, si no la totalidad, de la sacarosa y la maltosa se consume o se convierte en MIMO en el plazo de unas pocas horas, habitualmente en el plazo de aproximadamente 10 horas.

La fermentación continúa durante una determinada cantidad de tiempo a partir de entonces para permitir que los MIMO producidos se reorganicen enzimáticamente para producir cadenas más largas (mayor MWD), si se desea. Normalmente, el tiempo necesario para crear un producto, por ejemplo, de MWD objetivo de 760-800 Da es de aproximadamente 55 h. Idealmente, el lote se procesará, con muestreo periódico y análisis mediante HPAEC-PAD y/o RMN, hasta que se alcance la MWD objetivo y el caldo esté esencialmente libre de fructosa. Entonces se terminaría la fermentación y se pasaría al procesamiento posterior. El comportamiento de la MWD de MIMO durante todo el transcurso de una fermentación comercial de 3000 l se proporciona en los ejemplos 6 y 7.

Procesamiento posterior

Durante la producción de la composición de maltosil-isomaltooligosacáridos, puede determinarse que la fermentación de MIMO está completa tal como se determina mediante la conversión de la fructosa en manitol y mediante el logro de una distribución de peso molecular objetivo. En algunos casos, se determina que la fermentación de MIMO está completa cuando se consume la fructosa, mediante la conversión de fructosa en manitol, y/o mediante el cese de la absorción de álcali. Por tanto, la cantidad de fructosa en el fluido de fermentación final puede ser de menos del 4 %/brix de fructosa, o menos del 3 %/brix de fructosa, o menos del 2 %/brix de fructosa, o menos del 1 %/brix de fructosa, o menos del 0,5 %/brix de fructosa, o menos del 0,25 %/brix de fructosa, tal como se detecta mediante HPAEC-PAD o HPLC-RID.

Las células pueden separarse del caldo mediante microfiltración, centrifugación, o mediante otros procedimientos de clarificación de caldo. Luego se desechan las células.

El caldo puede concentrarse mediante evaporación hasta 35-45 brix y decolorarse con carbono activado en polvo (CAP, 0,4-2,0 %/masa de caldo) a aproximadamente 60-80 °C. Alternativamente, puede usarse o bien carbono activado granulado (CAG) o bien carbono activado en polvo (CAP), que después se elimina mediante filtración. En otro ejemplo, puede empaquetarse carbono activado granulado (CAG) o carbono activado en polvo (CAP) en una columna con camisa y usarse para la decoloración en una operación de un solo paso o de múltiples pasos.

Luego se desmineraliza el licor decolorado y se eliminan los metabolitos de ácidos orgánicos mediante un procedimiento de intercambio iónico (IEX) de dos etapas, mediante el cual, en primer lugar, se pone el licor en contacto con una resina de intercambio iónico de catión de ácido fuerte (SAC), y en segundo lugar, se pone el licor en contacto con una resina de IEX de anión de base débil (WBA).

Se ajusta el licor resultante (2-10 brix) a un pH < 4,2 (normalmente 2,0-4,0) con ácido fosfórico (H₃PO₄, 85 %, 0,25-2,00 kg) y se concentra mediante evaporación hasta 45-60 brix (56 brix es el enfoque preferido). Se enfría lentamente el concentrado resultante, con agitación suave, hasta temperatura ambiente y se deja cristalizar.

Se separa el licor resultante de los cristales (D-manitol) mediante filtración (Nutsch) o mediante centrifuga de cesta. Se lava la torta de cristal con agua (100-200 % de masa de torta con del 77 % al 95 % de sólidos, se prefiere el 125-150 %). Los lavados o bien se conservan para procesamientos de lote futuros o bien se combinan con el licor y se concentran mediante evaporación hasta 60-70 brix (se prefiere 67-69 brix).

Se enfría lentamente el concentrado resultante, con agitación suave, hasta temperatura ambiente (19-25 °C) y se permite la siembra de los cristales. Una vez que se ha alcanzado la temperatura objetivo inicial, luego se enfría lentamente todo ello hasta 2-10 °C (se prefiere 5 °C) hasta que se complete la cristalización.

Se separa el licor resultante de los cristales (D-manitol) mediante filtración (Nutsch) o mediante centrifuga de cesta. Se lava la torta de cristal con agua fría (100-200 % de masa de torta con del 77 % al 95 % de sólidos, se prefiere el 125-150 % de masa de torta con el 95 % de sólidos).

Se pasteuriza el licor de producto (70 °C durante 30 min) antes del envasado. Se conservan los lavados y se congelan para recircularlos al siguiente procesamiento de lote según sea apropiado.

La concentración de los componentes en la composición así preparada se encontrará dentro de los intervalos establecidos a continuación. La composición puede ser líquida al 59-68 %/brix o un polvo liofilizado/secado por pulverización. La MWD puede estar dentro del intervalo de 730 a 900 Da (promedio en masa).

Componente:	Mínimo %/brix:	Máximo %/brix:
MIMO-DP3 a MIMO-DP9:	69,00	100,00
D-Manitol:	0,00	14,00
D-Glucosa	0,00	2,50
D-Fructosa	0,00	0,50

ES 3 016 735 T3

Sacarosa	0,00	6,00
D-Maltosa	0,50	7,00
Lactato	0,00	6,50
Glicerol	0,00	2,50
Formiato	0,00	1,00
Acetato	0,00	10,00
Pureza, %:	69,00	100,00

Se prepara la siguiente composición a escala comercial y se prefiere. Los jarabes están normalmente entre 62 y 65 brix.

Componente:	Mínimo %/brix:	Máximo %/brix:
MIMO-DP3 a MIMO-DP9	84,77	95,51
D-Manitol	6,23	8,35
D-Glucosa	0,46	0,85
D-Fructosa	0,05	0,16
Sacarosa	1,75	1,86
D-Maltosa	4,29	4,39
Glicerol	0,41	0,51
Total	98,58	111,03

- 5 Los MIMO se distribuyen a lo largo del intervalo de valores de DP entre dos y nueve con una distribución de peso molecular promedio en masa en el intervalo de 730-900 Da:

Componente:	Mínimo %/brix:	Máximo %/brix:
maltosa	0,93	6,83
MIMO-DP3	4,17	14,89
MIMO-DP4	10,80	31,62
MIMO-DP5	13,04	29,89
MIMO-DP6	8,03	21,03
MIMO-DP7	2,90	13,79
MIMO-DP8	1,24	8,25
MIMO-DP9	0,00	3,69

- 10 En la que se prepara comercialmente una MWD de 780 Da $\pm$ 1,65 % y, por tanto, se prefiere:

Componente:	Mínimo %/brix:	Máximo %/brix:
maltosa	4,29	4,39
MIMO-DP3	11,89	14,89
MIMO-DP4	22,19	28,06
MIMO-DP5	23,66	28,67
MIMO-DP6	15,23	16,77
MIMO-DP7	5,75	6,58
MIMO-DP8	2,48	2,80
MIMO-DP9	0,58	0,73

En la que la composición difiere de todos los demás productos de IMO comerciales en virtud de la composición global (pureza de MIMO), la MWD de MIMO, y/o la proporción de tipos de enlaces glicosídicos.

Se entiende que la terminología usada en el presente documento tiene el único propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, puesto que el alcance de la presente solicitud está limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

5 Tratamiento

Las composiciones descritas pueden administrarse en una régimen que fomente el crecimiento y/o la actividad de los microorganismos probióticos que pueden estar presentes en el aparato digestivo o gastrointestinal de un animal. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a animales, incluyendo seres humanos, animales domesticados, animales de zoológico, y animales silvestres. Las composiciones pueden usarse de manera rutinaria o intermitente para fomentar el crecimiento y/o la actividad de los microorganismos probióticos que pueden estar presentes en el aparato digestivo o gastrointestinal de un animal.

Las composiciones contienen una cantidad de MIMO que puede ser eficaz para fomentar el crecimiento y/o la actividad de los microorganismos probióticos. Una cantidad eficaz puede ser, por ejemplo, una cantidad suficiente para fomentar el crecimiento de los microorganismos probióticos en al menos aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 %, o el 99,9 %. En algunos casos, la población de microorganismos probióticos puede aumentarse en el aparato gastrointestinal de un animal que ha recibido las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, la población de microorganismos probióticos puede aumentarse en aproximadamente dos veces, o aproximadamente tres veces, o aproximadamente cuatro veces, o aproximadamente cinco veces, o aproximadamente seis veces, o aproximadamente siete veces, o aproximadamente diez veces.

Las composiciones pueden administrarse o ingerirse una vez al día, o dos veces al día, o tres veces al día. En algunos casos, las composiciones pueden administrarse o ingerirse cada día durante una semana, o durante un mes, o durante dos meses, o durante tres meses, o durante seis meses, o durante un año, o durante dos años, o durante tres años. En muchos casos, las composiciones pueden administrarse o ingerirse cada día indefinidamente. Las composiciones pueden administrarse en dosificaciones únicas o divididas.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir una mezcla de MIMO tal como se describe en el presente documento. En las composiciones pueden estar presentes componentes inactivos tales como manitol y algunos de los demás componentes descritos en el presente documento. Por ejemplo, los MIMO pueden estar presentes como aproximadamente el 50 %, o aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 65 %, o aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 75 %, o aproximadamente el 80 %, o aproximadamente el 85 %, o aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de la composición.

Las composiciones pueden administrarse o ingerirse en cantidades de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente de 300 a 500 mg/kg, de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente de 100 a 300 mg/kg, o de al menos aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente de 50 a 100 mg/kg de peso corporal, aunque otras dosificaciones pueden proporcionar resultados beneficiosos. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse o ingerirse en cantidades de al menos aproximadamente 0,1 g, o al menos aproximadamente 0,25 g, o al menos aproximadamente 0,5 g, o al menos aproximadamente 0,7 g, o al menos aproximadamente 0,8 g, o al menos aproximadamente 0,9 g, o al menos aproximadamente 1,0 g, o al menos aproximadamente 1,1 g, o al menos aproximadamente 1,2 g. La dosificación unitaria puede variar desde aproximadamente 0,01 g hasta aproximadamente 50 g, desde aproximadamente 0,01 g hasta aproximadamente 35 g, desde aproximadamente 0,1 g hasta aproximadamente 25 g, desde aproximadamente 0,5 g hasta aproximadamente 12 g, desde aproximadamente 0,5 g hasta aproximadamente 8 g, desde aproximadamente 0,5 g hasta aproximadamente 4 g, o desde aproximadamente 0,5 g hasta aproximadamente 2 g.

La cantidad administrada variará dependiendo de diversos factores incluyendo, pero sin limitarse a, qué tipos de compuesto(s), y/u otros agentes terapéuticos, se administran, la vía de administración, la evolución o la falta de evolución de la enfermedad, el peso, el estado físico, la salud, la edad del paciente, si pretende lograrse prevención o tratamiento, y si el antígeno o ligando está modificado químicamente. Tales factores pueden ser determinados fácilmente por el médico empleando modelos animales u otros sistemas de prueba que están disponibles en la técnica.

Los compuestos y las composiciones de los mismos pueden administrarse en una dosis única, en múltiples dosis, de manera continua o intermitente, dependiendo de, por ejemplo, el estado fisiológico del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios expertos. La administración de las composiciones puede ser esencialmente continua a lo largo de un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas. Se contempla la administración tanto local como sistémica.

En algunos casos, las composiciones se formulan como formulaciones líquidas. Alternativamente, los compuestos

de MIMO y los demás componentes pueden estar en forma de polvo, obtenidos por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización a partir de una disolución, para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

5 Cuando los MIMO se preparan para administración oral, pueden combinarse con un portador. Un portador de este tipo puede ser un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden proporcionarse en forma de una forma de dosificación unitaria. Para la administración oral, los MIMO pueden estar presentes como un polvo, una formulación granular, una disolución, una suspensión, una emulsión o en una resina o un polímero natural o sintético para la ingesta de los componentes activos a partir de un chicle. Los agentes terapéuticos también pueden presentarse como un bolo, un electuario o una pasta.

En algún caso, las composiciones pueden prepararse para, y administrarse como, composiciones orales. Por ejemplo, los comprimidos o comprimidos oblongos que contienen los compuestos, y opcionalmente un portador, pueden incluir agentes de tamponamiento tales como carbonato de calcio, óxido de magnesio y carbonato de magnesio. Los comprimidos y comprimidos oblongos también pueden incluir componentes inactivos tales como celulosa, almidón pregelatinizado, dióxido de silicio, hidroxipropilmetilcelulosa, estearato de magnesio, celulosa microcristalina, almidón, talco, dióxido de titanio, ácido benzoico, ácido cítrico, almidón de maíz, aceite mineral, polipropilenglicol, fosfato de sodio, estearato de zinc, y similares. Las cápsulas de gelatina dura o blanda que contienen al menos un agente terapéutico de la invención pueden contener componentes inactivos tales como gelatina, celulosa microcristalina, laurilsulfato de sodio, almidón, talco, y dióxido de titanio, y similares, así como vehículos líquidos tales como polietilenglicoles (PEG) y aceite vegetal. Además, los comprimidos o comprimidos oblongos con recubrimiento entérico que contienen uno o más de los compuestos de la invención están diseñados para resistir la disgregación en el estómago y disolverse en el entorno más neutro a alcalino del duodeno.

Las composiciones también pueden incluir antioxidantes, tensioactivos, conservantes, agentes formadores de película, queratolíticos o comedolíticos, perfumes, aromatizantes y colorantes. Pueden añadirse antioxidantes tales como t-butilhidroquinona, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado y α -tocoferol y sus derivados.

Los sujetos a los que están dirigidos las composiciones pueden padecer una o más enfermedades o afecciones. Los ejemplos de enfermedades o afecciones pueden incluir cáncer, afección/afecciones precancerosa(s) o predisposiciones cancerosas, diabetes (por ejemplo, diabetes tipo 2, o diabetes tipo 1), enfermedad(es) autoinmunitaria(s), reflujo de ácido, hipovitaminosis, trastorno(s) del estado de ánimo, degradación de revestimiento(s) de la mucosa, colitis ulcerosa, irregularidades digestivas (por ejemplo, síndrome del intestino irritable, reflujo de ácido, estreñimiento, o una combinación de los mismos), enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enteritis infecciosa, diarrea asociada a antibióticos, diarrea, colitis, pólipos en el colon, síndrome de poliposis familiar, síndrome de Gardner, infección por *Helicobacter pylori*, síndrome del intestino irritable, y cánceres intestinales. Las composiciones pueden fomentar el crecimiento y la actividad de determinados tipos de bacterias (por ejemplo, cepas de *L. lactis*), lo que conduce a la producción de diversos tipos de bacteriocinas (por ejemplo, nisinas) que pueden actuar como agentes antineoplásicos y/o como agentes antimicrobianos. Por ejemplo, los estudios iniciales indican que las composiciones descritas en el presente documento pueden reducir o eliminar los síntomas en el 81 % de los usuarios que identificaron por sí mismos que tenían síntomas de reflujo de ácido una vez a la semana o más.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o pruebas de la presente solicitud puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Tal como se utiliza según la presente divulgación, debe entenderse que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

“Brix”, también conocido como grados Brix (símbolo °Bx), se refiere al contenido de azúcar de una disolución acuosa. Un grado Brix es 1 gramo de sacarosa en 100 gramos de disolución y representa la concentración de la disolución como porcentaje en peso (% p/p). Brix también representa las sales, los ácidos orgánicos, y otros solutos disueltos que aumentan el índice de refracción de la disolución. Como tal, es menos útil como medida cuantitativa del contenido de sacáridos en un caldo complejo (mezclas de fermentación), pero es bastante preciso con respecto al producto refinado. Por tanto, 1 grado brix = 1 g de sólidos secos refractivos por 100 g de material. Si la disolución contiene sólidos disueltos distintos de sacarosa pura, entonces °Bx sólo proporciona una aproximación del contenido de sólidos disueltos. Sin embargo, cuando los componentes constituyentes de las composiciones que van a compararse son similares y/o están dentro de intervalos similares, los valores de Brix son reproducibles y proporcionan una aproximación que, en este caso, es una medición precisa (con respecto a los sólidos secos reales por evaporación) de los sólidos secos relativos por cada composición.

“Densidad óptica” o “DO” se refiere a una estimación de la densidad celular en una fermentación. Normalmente se

usa para determinar el avance de una fermentación, se determina mediante la absorbancia de luz a 600 nm y puede estar relacionada con la masa celular seca.

“HPAEC-PAD” se refiere a una técnica analítica instrumental compuesta conocida como cromatografía de líquidos de intercambio aniónico de alta presión (HPAEC) (ThermoDionex ICS-5000+) con un detector amperométrico pulsado (PAD). En el ámbito de este trabajo, este instrumento se usa únicamente para la separación de alta resolución (ThermoDionex CarboPac PA-100, pH >12,5, elución en gradiente de acetato) de alcoholes de azúcar, monosacáridos y disacáridos, y oligosacáridos. La cuantificación se realiza mediante un patrón interno usando L-arabinosa y factores de respuesta relativos al compuesto puro o a una maltodextrina purificada de peso molecular equivalente.

“HPLC-RID” se refiere a una técnica analítica instrumental compuesta conocida como cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, Agilent 1100) con un detector de índice de refracción (RID). En el ámbito de este trabajo, este instrumento se usa para separar (BioRad Aminex HPX-87H, H₂SO₄ 0,008 N isocrático) y cuantificar los ácidos orgánicos (carboxílicos) que resultan de la fermentación bacteriana. Este instrumento también se usa para confirmar DP3, maltosa, y manitol. La cuantificación se realiza mediante el método de patrón externo frente a un patrón mixto preparado a partir de compuestos objetivo de pureza conocida.

“SIP” se refiere a esterilización *in situ*.

“SBF” se refiere a esterilización mediante filtración a través de una membrana de 0,2 µm.

“CIP” se refiere a limpieza *in situ*.

“DSP” se refiere a procesamiento posterior.

“PRMXE” se refiere a cartuchos de filtro de la serie PRMXE o cartuchos de calidad para esterilización (SG) de membrana de polietersulfona plisada de doble capa “Pur-Maxx E”; 0,20 µm.

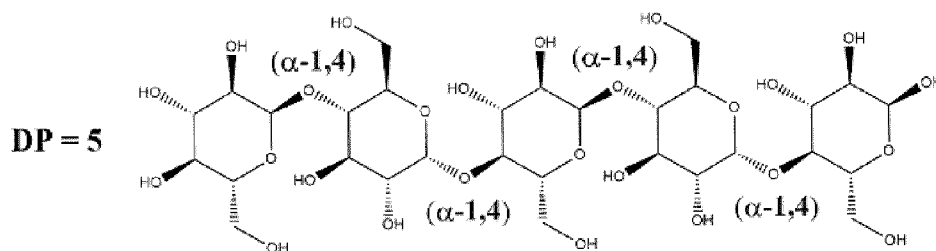
“Grado de polimerización”, o “DP”, se refiere al número de unidades de azúcar de monosacárido en un oligosacárido dado.

“Oligosacáridos” se refiere a glicanos de todo tipo con DP ≥ 3 y ≤ 10.

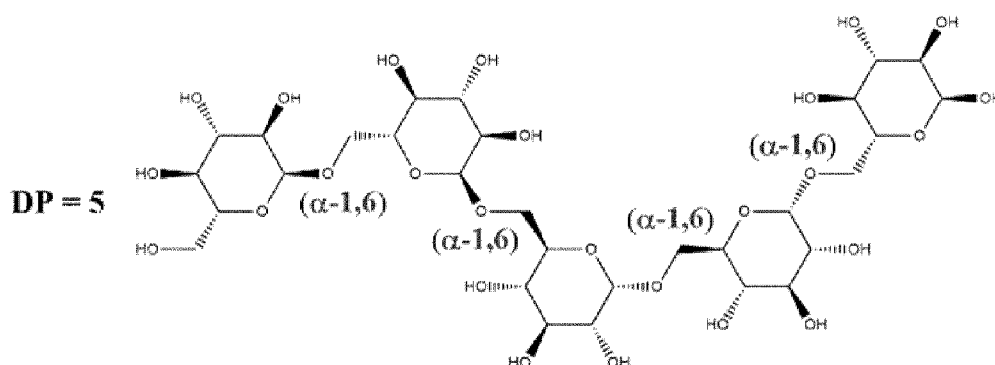
“Distribución de peso molecular,” o “MWD”, se refiere al peso molecular promedio en masa de una distribución de oligosacáridos.

“Oligosacáridos” se refiere a glicanos de todo tipo, generalmente con un grado de polimerización (DP) mayor que o igual a 3 y menor que o igual a 18.

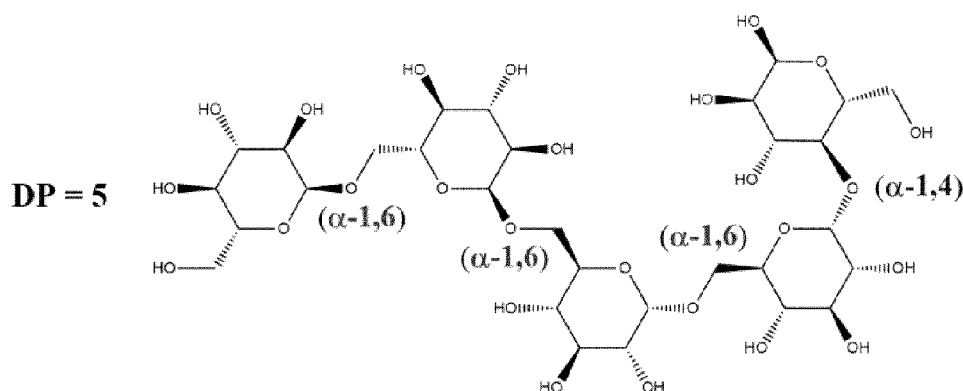
“Glucooligosacárido”, o “GlcOS”, se refiere a oligosacáridos homopoliméricos (compuestos por glucosa en cualquier disposición estructural). Los GlcOS incluyen la serie de maltooligosacáridos, normalmente derivada de almidón vegetal. Un ejemplo es [-O-α-(1,4)-], maltopentosa, que tiene la siguiente estructura química:



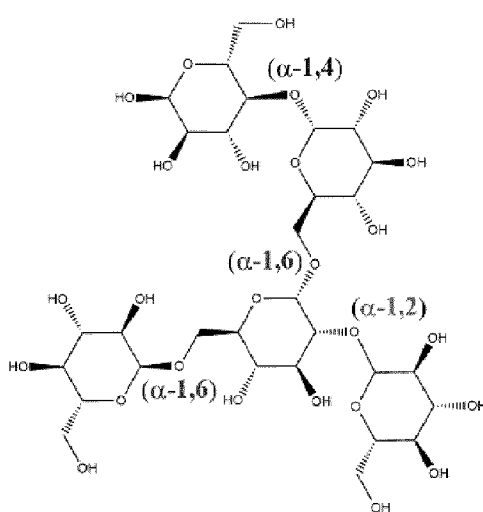
“Isomaltooligosacárido”, o “IMO”, se refiere a glucosilacáridos con una estructura de núcleo basada en una estructura principal con enlaces α-(1→6) que pueden incluir ramificaciones con enlaces α-(1→4), α-(1→3) (nigerooligosacáridos o kojooligosacáridos), y/o α-(1→4) (maltooligosacárido). IMO es un GlcOS ensamblado con un núcleo de enlaces [-O-α-(1,6)-], acorde con la estructura de núcleo de dextrano. Un ejemplo es la isomaltopentosa, que tiene la siguiente estructura química:

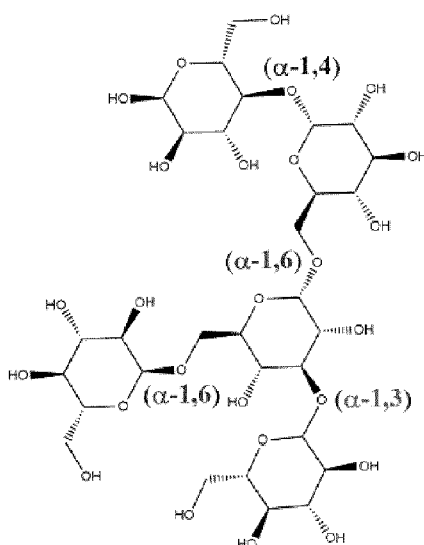


“Maltosil-isomalttooligosacárido,” o MIMO, se refiere a un oligosacárido, específicamente IMO, normalmente con grados de polimerización menores de 10-18 compuesto por enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6) y terminado con un enlace α -(1,4)-glucosilo. El grupo terminal α -(1 $\rightarrow$ 4) se origina a partir de la maltosa. Por tanto, el maltosil-isomalttooligosacárido o MIMO se produce por una reacción aceptora mediante maltosa u otro maltooligosacárido. Un ejemplo de un MIMO con un único enlace maltosilo [-O- α -(1,4)-] en el extremo reductor, y acorde con la estructura de núcleo de panosa, es la maltosil-isomaltotriosa, que tiene la siguiente estructura química:

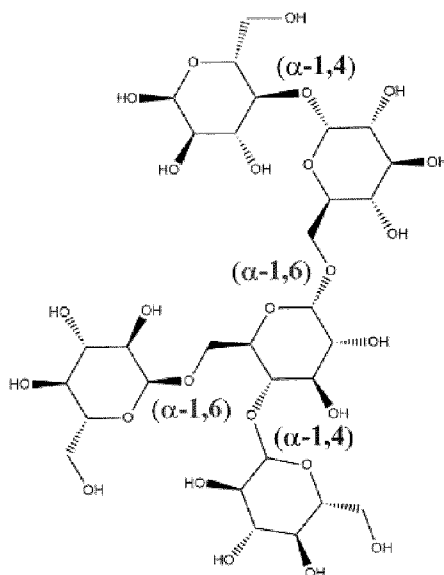


“MIMO ramificado” se refiere a un oligosacárido, específicamente MIMO, con grados de polimerización menores de o iguales a 10 compuesto por enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6) terminado con un enlace α -(1,4)-glucosilo y ramificaciones α -(1,2), α -(1,3) y/o α -(1,4). Los ejemplos de un MIMO ramificado con enlaces de ramificación de glucosa en las posiciones 1,2 y 1,3 y/o 1,4 tienen las siguientes estructuras:

MIMO-[-O- α -(1,2)]



MIMO-[-O-α-(1,3)]



MIMO-[-O-α-(1,4)]

“Complemento alimenticio” se refiere a un alimento, componente alimentario, o aditivo alimentario que produce un beneficio para la salud. Hidratos de carbono tales como los oligosacáridos pueden ser complementos alimenticios.

“SAC” significa una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte, normalmente una con grupos ácido sulfónico, es decir, un equivalente de ácido sulfúrico. En algunos casos, SAC se refiere a Purolite C-150S, que tiene una capacidad de H⁺ de 1,8 mol/l.

“WBA” significa una resina de intercambio aniónico de base débil, normalmente una con grupos amina terciaria, que no es más fuerte que la base libre correspondiente (pKa de ~9,8). En este caso, WBA se refiere a Purolite A-133 que tiene una capacidad de base libre de 1,8 mol/l.

Los ejemplos ilustran parte del trabajo experimental realizado en el desarrollo de la invención.

EJEMPLO 1

Se usaron dos variaciones de producto en los ensayos clínicos. Variaban únicamente en cuanto a distribución de peso molecular, y esto se controló variando la razón de sacarosa con respecto a maltosa (S/M). Los productos de tipo “A2” tienen un peso molecular de aproximadamente 750 Da y los productos de tipo “Classic” o “NC” tienen un peso molecular de aproximadamente 800 Da. Cada uno de los dos tipos era un material compuesto de seis

fermentaciones de 16 kg de cada uno de los tipos A2 y NC (12 fermentaciones en total). Los ensayos clínicos eran ambos estudios controlados por placebo con doble enmascaramiento, y a continuación se proporcionan los parámetros para cada uno de ellos.

5 Protocolo de ensayo clínico

Propósito: comparar los efectos de la ingesta diaria de dos formulaciones diferentes del complemento ISOThrive frente a un placebo sobre el criterio de valoración primario de peso corporal y los criterios de valoración secundarios (marcadores séricos de inflamación y saciedad, hambre/saciedad, medidas relacionadas con la salud y calidad de vida notificada por el paciente) en un grupo de adultos con sobrepeso pero por lo demás sanos.

Diseño del estudio: ensayo de control de diseño paralelo, aleatorizado, controlado por placebo, con doble enmascaramiento para comparar los efectos de la ingesta diaria durante un periodo de 3 meses del complemento ISOThrive frente a un placebo.

El diseño del estudio incluía 3 ramas de tratamiento:

(1) Complemento ISOThrive (tipo 1, "A2")

20 (2) Complemento ISOThrive (tipo 2, "NC")

(3) Complemento de placebo (jarabe de alto contenido en maltosa con 64 brix)

Los dos complementos ISOThrive (tipos 1 y 2) tienen los mismos componentes activos, y una dosificación de 1000 mg de MIMO. Los dos tipos de complemento difieren en cuanto a pureza (MIMO/total) y distribución de peso molecular promedio en masa del MIMO, que es el componente principal.

Los participantes del estudio incluían 105 hombres y mujeres con sobrepeso en el intervalo de edades de 18 a 75 años, que no eran fumadores, con un índice de masa corporal (IMC) ≥ 25 y un peso corporal máximo de 350 libras

Otro protocolo de ensayo

Propósito: en primer lugar, evaluar, mediante secuenciación de ARNr 16S de hisopados fecales, el efecto de un complemento nutricional (fibra soluble específica conocida como isomalto-oligosacáridos) sobre la abundancia, la diversidad, y la función génica prevista del microbioma de las bacterias intestinales. En segundo lugar, evaluar el estado general del sujeto en cuanto a peso corporal, y datos de salud intestinal notificados por el paciente. Los grupos de prueba se compararon entre complementos y con el grupo de placebo.

Diseño del estudio: ensayo aleatorizado, controlado por placebo, con un aumento de la dosis a la mitad del periodo de intervención.

Los sujetos tenían de 18 y 45 años, con un peso máximo de 350 libras, y un índice de masa corporal de 25 kg/m² o superior, y tenían una buena salud general notificada por el paciente.

Se aleatorizaron 60 sujetos a tres ramas (20 cada una: complemento de tipo 1, fórmula de complemento de tipo 2, o placebo) y tomaron una dosis diaria de complemento A, complemento B, o placebo durante 8 semanas.

Las dosis incluían 500 mg de MIMO durante las primeras 4 semanas y luego incluían 1000 mg de MIMO durante las segundas 4 semanas.

Composición para los ensayos clínicos: productos de tipo "A2" y "Classic"

Se llevaron a cabo seis fermentaciones para generar cada tipo de producto usando un fermentador de 20 l (BioFlo 410 de New Brunswick), que se cargó con el siguiente medio:

Tipo "A2"

N=6	kg:	Desv. est.:	DER, %:
Agua	12,594	0,0144	0,114
Sacarosa	1,800	0,0000	0,000
Maltosa-H ₂ O	0,998	0,0000	0,000
MnSO ₄ -H ₂ O	0,0002	0,0000	1,000
MgSO ₄	0,0015	0,0000	0,209

Tipo "Classic"

N=6	kg:	Desv. est.:	DER, %:
Agua	12,600	0,0004	0,003
Sacarosa	1,910	0,0004	0,021
Maltosa-H ₂ O	0,864	0,0000	0,000
MnSO ₄ -H ₂ O	0,0002	0,0000	1,610
MgSO ₄	0,0015	0,0000	0,281

ES 3 016 735 T3

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0002	0,0000	1,454	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0002	0,0000	0,801
KH ₂ PO ₄	0,0400	0,0000	0,014	KH ₂ PO ₄	0,0400	0,0000	0,076
NaCl	0,0002	0,0000	0,824	NaCl	0,0002	0,0000	1,058
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0008	0,0000	0,390	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,001	0,0000	1,479
Extracto de levadura	0,075	0,0004	0,543	Extracto de levadura	0,076	0,0008	1,108
NaOH, 50 %	0,016	0,0003	2,056	NaOH, 50 %	0,016	0,0007	4,379
Total:	15,53	0,040	0,25	Total:	15,51	0,0232	0,15
ST, %:	17,38	0,042	0,24	ST, %:	17,33	0,0259	0,15
Brix, %:	18,19	0,031	0,17	Brix, %:	18,15	0,0313	0,17
S/M:	2,00	0,000	0,00	S/M:	2,45	0,0005	0,02

Se ajustó el pH del medio a 7,00 con NaOH (50 %).

- 5 Se transfirieron 200 ml del medio a un matraz de Erlenmeyer, se selló y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, se enfrió, y se le inoculó 1 ml de reserva de viales (0,5 ml de cultivo en fase logarítmica tardía en glicerol al 20 %, almacenado a -75 °C). Se incubó la siembra con agitación a 27 °C y se dejó crecer durante aproximadamente 16 h. Se transfirió el resto del medio al fermentador mediante una bomba sanitaria. Se selló el fermentador y se sometió a esterilización *in situ* (SIP) hasta 116 °C, luego se enfrió rápidamente hasta 30 °C (véase la curva de temperatura en la figura 8). Se modeló la curva, y se usó el modelo para determinar el tiempo de
- 10 permanencia en cada régimen microbiológicamente relevante. Los resultados fueron los siguientes:

T °C:	h:
> 70	2,43
> 80	2,22
> 90	1,86
> 100	1,16
> 110	0,46

- 15 Estos resultados son relevantes dado que, cuando se mezcla el medio completo y se ajusta a un pH de 7,00 (para evitar la inversión de sacarosa), se pierden cantidades significativas de maltosa (un azúcar reductor) mediante la reacción de Maillard. Además de generar una gran cantidad de material coloreado (> 10.000 UI), esto aumenta la S/M del medio (tal como se detecta mediante HPLC-RID), y tiene el efecto de aumentar la distribución de peso molecular final del producto.

- 20 Se le inocularon al fermentador 150 ml del cultivo de siembra de matraz que contenía *Leuconostoc citreum* ATCC 13146 (NRRL B-742) y se corrigió el pH del medio a 6,50 usando una disolución de HCl al 37 %. Se dejó avanzar la fermentación durante 55 h con ajuste de pH usando una disolución de NaOH al 40 % para mantener el pH a 5,50.

- 25 Normalmente, hay un periodo de inducción de 4-6 horas, o fase de latencia, antes del crecimiento logarítmico. La fase de crecimiento logarítmico dura aproximadamente 10 horas (cuando se produce la mayor parte del crecimiento), pero normalmente tarda aproximadamente 18 horas en alcanzar el crecimiento estacionario. Normalmente se logra un pH de 5,5 en el plazo de aproximadamente 2 horas de crecimiento en fase logarítmica, y este pH se mantiene a partir de entonces. Se eligió este pH según el pH óptimo determinado experimentalmente para la enzima dextranasa.

- 30 Las fermentaciones consumieron 450 ± 29,3 y 468 ± 22,3 g de NaOH al 40 % para los lotes de tipo A2 y NC, respectivamente.

La figura 9 ilustra gráficamente el comportamiento típico del pH durante la fermentación después de la inoculación.

- 35 Se determinó la curva de crecimiento (inicio y fase logarítmica) mediante la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀), y se muestra en la figura 10.

- 40 La completitud de la fermentación se indicó por el consumo de fructosa, que se convirtió en manitol, y por el cese de la absorción de álcali. Tras la completitud, se recogió la fermentación, y se eliminaron las células mediante centrifugación (Sorvall RC-5B Plus, rotor G3, 13.689 g durante 20 min a 5-10 °C). Se concentró el caldo mediante evaporación (evaporador rotatorio R-20 de Buchi, baño a 70 °C, vapor a 54 °C a 26" Hg) hasta 40 brix, y se decoloró mediante tratamiento con 250 g de carbono activado en polvo (CAP) Carbochem CA-50S mientras que todavía

ES 3 016 735 T3

estaba caliente (50-65 °C). Se agitó la suspensión durante 20 minutos y se filtró a vacío (usando un embudo Büchner de 2 x 240 mm, matraz de brazo lateral de 2 l, papeles de filtro Whatman #3 y una precapa de 100 g de Celite 545). Se lavaron las tortas de carbono activado en polvo con 3 x 250 ml de agua cada una, y se recogió todo el lavado.

Se eliminaron los minerales/sales (principalmente sodio) y los metabolitos de ácidos orgánicos (principalmente los ácidos láctico y acético) en un procedimiento de intercambio iónico de dos etapas secuencial. En primer lugar, se hace pasar el concentrado decolorado, normalmente 6-7 kg con 32-36 °bx, a través de 6,8 l de resina de intercambio catiónico de ácido fuerte (Purolite C-150S) para eliminar los minerales/sales. Luego, se hace pasar el caldo al que se le han retirado las cenizas a través de 14,7 l de resina de intercambio aniónico de base débil (Purolite A-133) para eliminar los ácidos orgánicos. Luego se concentra el licor al que se le han retirado las cenizas mediante evaporación hasta 56,78 brix.

Se transfiere en caliente el licor (aproximadamente 56 brix) a un recipiente de cristalización de 2,5 galones y se deja enfriar lentamente hasta temperatura ambiente (19-22 °C) y cristalizar durante la noche.

Se homogeneiza la mezcla resultante para producir una suspensión de cristales que puede verterse. Los cristales de manitol pueden separarse mediante centrifuga de cesta (Robitel RA 20 VX con una bolsa de filtro de polipropileno de 10 µm).

Una pequeña porción de la torta de cristal (0,320 kg con el 95 % de sólidos, torta #1) puede lavarse con 500 ml de agua desionizada helada, y pueden conservarse 0,697 kg de lavado de torta (lavado #1) con 20,5 brix para su recirculación mientras que pueden refrigerarse 2,626 kg de licor (licor #1) con 51,70 brix hasta 3 °C para su cristalización durante la noche.

Puede retirarse y lavarse otra porción de los cristales (torta #2, 0,109 kg con el 95 % de sólidos) tal como antes. El lavado de torta #2 puede combinarse con el lavado #1 para su recirculación. El licor de producto #2 con 49,0 brix puede analizarse (HPAEC-PAD, HPLC-RID, brix, pH y conductividad) y refrigerarse a la espera de su combinación con lotes similares (o bien A2 o bien Classic). Una vez combinado, todo el material compuesto puede evaporarse hasta 65-67 brix antes de su análisis para el certificado final de análisis y envasado en las formas de dosificación del ensayo. El envasado se realiza en una campana de flujo laminar esterilizada donde pueden envasarse cantidades de 32 g (por ejemplo) por volumen (24,16 ml), tal como se confirma por la masa del lote, en óvalos de vidrio ámbar CRGXTA-1oz sometidos a esterilización en autoclave (Berry Plastics Corporation) con sellos de tapón adaptador SealSafe Penetrex de 20 mm sometidos a esterilización en autoclave para la dispensación de dosis mediante jeringa de plástico con punta Luer (Andwin Scientific, #760020G).

Resultados analíticos y reproducibilidad

Producto de tipo A2:

Lote-->	021815	022315	022615	030215	033015	040915	A2 comp.
S/M:	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
DP1, %/bx:	2,60	1,26	1,67	1,36	0,59	1,80	1,51
DP2, %/bx:	6,48	2,92	2,71	9,46	5,35	8,17	6,54
MIMO, %/bx:	74,89	77,57	76,02	80,00	73,94	71,94	76,53
Manitol, %/bx:	11,17	10,59	10,87	10,03	11,08	12,11	10,42
Lactato, %/bx:	0,00	0,00	0,12	0,00	0,26	0,00	0,00
Formiato, %/bx:	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acetato, %/bx:	0,00	0,00	0,06	0,00	0,10	0,00	0,00
Glicerol, %/bx:	1,48	1,44	1,60	1,55	1,39	1,45	1,47
TOTAL, %/bx:	96,62	93,78	93,05	102,41	92,71	95,48	96,48
PUREZA:	77,51	82,71	81,70	78,12	79,75	75,35	79,33
MWD, Da:	746,89	758,02	777,60	748,74	762,34	746,75	760,37
Brix, %:	50,51	49,00	53,76	54,93	51,32	47,39	67,27
µS/cm:	10,53	12,8	15,65	15,19	2260	364	260
pH:	4,9	4,59	3,45	5,28	5,82	6,91	4,47

Producto de tipo "New Classic" o "NC":

Lote-->	012015	031015	032015	032315	032515	040215	NC comp.
---------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	----------

ES 3 016 735 T3

S/M:	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33	2,33
DP1, %/bx:	2,73	2,08	1,10	1,14	1,87	1,38	1,95
DP2, %/bx:	5,54	6,96	5,93	1,96	5,47	5,06	1,73
MIMO, %/bx:	71,88	71,22	73,63	74,59	69,79	76,19	72,61
Manitol, %/bx:	13,25	10,94	10,83	12,36	12,27	10,63	11,97
Lactato, %/bx:	0,000	0,000	0,000	0,000	0,969	0,20	0,30
Formiato, %/bx:	0,000	0,000	0,000	0,000	0,405	0,00	0,27
Acetato, %/bx:	0,033	0,000	0,000	0,000	0,364	0,05	0,12
Glicerol, %/bx:	1,558	2,269	1,562	1,562	1,990	1,58	1,76
TOTAL, %/bx:	94,99	93,47	93,04	91,61	93,13	95,10	90,72
PUREZA:	75,68	76,20	79,13	81,42	74,94	80,12	80,05
MWD, Da:	817,69	808,88	804,03	820,12	811,74	806,52	834,69
Brix, %:	49,06	52,16	46,44	50,08	51,23	50,54	65,07
μS/cm:	239	279	43,2	350	2070	1415	410
pH:	6,82	6,43	6,69	7,13	6,83	6,94	5,12

Donde DP1 = glucosa + fructosa y DP2 = sacarosa + maltosa:

A2, %/brix	021815DA	022315DA	022615DA	030215DA	033015DA	040915DA	A2 comp.
Glucosa	2,27	1,11	1,46	1,26	0,56	1,69	1,41
Fructosa	0,32	0,15	0,21	0,10	0,03	0,12	0,10
Sacarosa	0,71	0,69	0,90	3,81	0,68	1,34	0,87
Maltosa	5,77	2,23	1,82	5,65	4,67	6,83	5,68
NC, %/brix	012015DA	031015DA	032015DA	032315DA	032515DA	040215DA	NC comp.
Glucosa	2,42	1,94	1,05	0,99	1,79	1,36	1,67
Fructosa	0,30	0,14	0,04	0,15	0,09	0,02	0,27
Sacarosa	0,75	1,52	1,25	0,27	1,09	0,70	0,36
Maltosa	4,79	5,44	4,68	1,69	4,38	4,36	1,37

5 Se proporcionan cromatogramas comparativos (HPAEC-PAD) y ¹H-RMN de 300 MHz para los dos productos de material compuesto en las figuras 11 a 18.

10 Los MIMO de estos productos tenían una distribución reproducible de DP de 3-9 que variaban según la S/M presente al inicio de la fermentación:

N=6 cada uno	A2, media:	DESV. EST.:	DER, %:	NC, media:	DESV. EST.:	DER, %:
MIMO-DP3	12,522	1,003	8,007	8,88	0,50	5,61
MIMO-DP4	23,510	1,173	4,991	17,46	1,00	5,75
MIMO-DP5	23,357	0,685	2,931	22,59	1,38	6,12
MIMO-DP6	10,888	0,423	3,883	13,73	0,28	2,06
MIMO-DP7	3,280	0,181	5,515	5,09	0,38	7,52
MIMO-DP8	2,251	0,229	10,167	3,96	0,41	10,35
MIMO-DP9	0,683	0,047	6,933	1,14	0,17	14,53

EJEMPLO 2

15 Después de realizar los procedimientos descritos en el ejemplo #1, se observó que el manitol cristalizaba a partir de los productos finales tras la refrigeración o el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente más fría. Este ejemplo ilustra la variabilidad en la composición del producto con respecto al procedimiento de cristalización empleado. Adicionalmente, se usó el lote generado tal como se describe en este ejemplo para someter a prueba el efecto de la esterilización (o vapor) *in situ* sobre la razón sacarosa:maltosa.

ES 3 016 735 T3

Composición mejorada mediante la manipulación de los parámetros de cristalización

A un fermentador de 20 l (BioFlo 410 de New Brunswick) se le añadió el siguiente medio:

Lote:		
051315	kg:	
Agua	12,600	
Sacarosa	1,800	
Maltosa-H ₂ O	0,998	
MnSO ₄ -H ₂ O	0,00015	g:
MgSO ₄	0,00146	0,15083
FeSO ₄ -7H ₂ O	0,00015	1,46045
KH ₂ PO ₄	0,04000	0,14997
NaCl	0,00015	40,00375
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,00080	0,14985
Extracto de levadura	0,077	0,80170
NaOH, 50 %	0,017	16,68234
Total:	15,534	
ST, %:	17,374	
Brix, %:	18,198	
S/M:	2,00	

5

Se ajustó el pH del medio a 7,00 con NaOH (50 %) y se tomaron muestras del medio esterilizado (antes de la inoculación) para el análisis de S/M mediante HPLC-RID. Se transfirieron 200 ml del medio a un matraz de Erlenmeyer, luego se selló el matraz y esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se enfrió el medio, y se le inoculó 1 ml de reserva de viales (0,5 ml de cultivo en fase logarítmica tardía de *Leuconostoc citreum* ATCC 13146, NRRL B-742, en glicerol al 20 %, almacenado a -75 °C). Se incubó la siembra con agitación a 27 °C y se dejó crecer durante 16 h.

10

Se transfirió el resto del medio al fermentador mediante una bomba sanitaria. Se selló el fermentador y se sometió a esterilización *in situ* (SIP) hasta 116 °C, tal como se describió previamente en el ejemplo 1. Se le inocularon al fermentador 150 ml del cultivo de siembra de matraz y se corrigió el pH del medio a 6,50 usando HCl al 37 %. Se dejó avanzar la fermentación durante 55 h con ajuste de pH con NaOH al 40 % (40 %) para mantenerlo a 5,50.

15

Normalmente, hay un periodo de inducción de 6 horas antes del crecimiento logarítmico. El crecimiento logarítmico normalmente avanza durante aproximadamente 10 horas. Normalmente se logra un pH de 5,5 en el plazo de aproximadamente 2 horas de crecimiento en fase logarítmica, y este pH se mantiene a partir de entonces.

20

La fermentación consumió 464 g de NaOH al 40 %.

La completitud de la fermentación se indicó por el consumo de fructosa, que se convirtió en manitol, y por el cese de la absorción de álcali. Se recogió la fermentación, y se eliminaron las células mediante centrifugación (Sorvall RC-5B Plus, rotor G3, 13.689 g durante 20 min a 5-10 °C). Se concentró el caldo mediante evaporación (evaporador rotatorio R-20 de Büchi, baño a 70 °C, vapor a 54 °C a 26" Hg) hasta 40 brix, y se decoloró mediante tratamiento con 266 g de carbono activado en polvo (CAP, Carbochem CA-50S) mientras que todavía estaba caliente (50-65 °C). Se agitó la suspensión durante 20 minutos y se filtró a vacío (embudo Büchner de 2 x 240 mm, matraz de brazo lateral de 2 l, papeles de filtro Whatman #3 y una precapa de 100 g de Celite 545). Se lavaron las tortas de CAP con 3 x 250 ml de agua cada una, y se recogió todo ello.

25

30

Se eliminaron los minerales/sales (principalmente sodio) y metabolitos de ácidos orgánicos (principalmente los ácidos láctico y acético) en un procedimiento de intercambio iónico de dos etapas secuencial. En primer lugar, se hicieron pasar 6,236 kg de caldo con 35,5 brix a través de 6,8 l de resina de intercambio catiónico de ácido fuerte (Purolite C-150S) para eliminar los minerales/sales. Luego, se hizo pasar el caldo al que se le han retirado las cenizas a través de 14,7 l de resina de intercambio aniónico de base débil (Purolite A-133) para eliminar los ácidos orgánicos. Se ajustó el pH del licor al que se le han retirado las cenizas a 6,16 (desde 10,80) con HCl (37 %), y se concentró mediante evaporación hasta 57,01 brix. Se transfirió en caliente el concentrado al que se le han retirado las cenizas a un recipiente de cristalización de 2,5 galones y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente (19-22 °C) y cristalizar durante la noche.

35

40

ES 3 016 735 T3

Se homogeneizó la mezcla resultante para producir una suspensión de cristales que puede verterse. Se separaron los cristales de manitol mediante centrifuga de cesta (Robitel RA 20 VX con una bolsa de filtro de polipropileno de 10 µm).

- 5 Se lavó una pequeña porción de la torta de cristal (0,279 kg con el 95 % de sólidos, torta #1) con 500 ml de agua desionizada helada, y se conservaron 0,672 kg de lavado de torta (lavado #1) con 18,7 brix para su recirculación mientras que se recogieron 2,403 kg de licor (licor #1) con 52,56 brix.

- 10 Se concentró el licor #1 mediante evaporación hasta 65,68 brix. Se dividió el concentrado resultante en dos porciones. Se cristalizó la primera porción (0,921 kg) nuevamente a temperatura ambiente (19-22 °C). Se cristalizó la segunda porción hasta una temperatura de aproximadamente 2 °C. Se dejó que ambas cristalizaciones avanzaran durante la noche.

- 15 Se eliminaron los cristales a temperatura ambiente (torta #2RT, 0,039 kg con el 95 % de sólidos), tal como se describió anteriormente. Se combinó el lavado de torta #2RT (0,552 kg) con el lavado #1 para su recirculación.

Se eliminaron los cristales refrigerados (torta #2RC, 0,094 kg con el 95 % de sólidos), tal como antes. Se combinó el lavado de torta #2RC (0,626 kg) con el lavado #1 para su recirculación.

- 20 Se analizaron los licores de producto #2RT con 64,08 brix y #2RC con 63,82 brix (HPAEC-PAD, HPLC-RID, brix, pH y conductividad).

Resultados

- 25 La HPLC-RID determinó que la razón sacarosa/maltosa antes de la inoculación había aumentado desde 2,00 hasta 2,73 después de la esterilización en el procedimiento:

Compuesto:	%/brix antes de SIP	%/brix después de SIP
Sacarosa	62,26	61,14
Maltosa	31,31	22,38
Glucosa	0,27	4,61
Fructosa	0,00	0,15
Total:	93,84	88,28
S/M:	1,99	2,73

- 30 A continuación se muestra la composición de los productos producidos tal como se describe en este ejemplo después de la segunda cristalización en frío y a temperatura ambiente:

2ª crist. en frío, T°C:		
Componente	2 %/brix:	% p/p
Glucosa	0,79	0,50
Fructosa	0,03	0,02
Sacarosa	1,76	1,12
Maltosa	4,93	3,15
MIMO	89,08	56,85
Manitol	8,82	5,63
Lactato	0,33	0,21
Glicerol	0,38	0,24
Formiato	0,00	0,00
Acetato	0,13	0,09
TOTAL	106,25	67,81
Brix, %:	63,82	
Pureza, %:	83,84	
Mw, Da:	737	
DP de MIMO	%/brix:	
MIMO-DP3	13,84	
MIMO-DP4	31,62	
MIMO-DP5	27,75	
MIMO-DP6	11,50	

2ª crist. a temp. amb., T°C:		
Componente	20 %/brix:	% p/p
Glucosa	0,76	0,49
Fructosa	0,02	0,02
Sacarosa	1,62	1,04
Maltosa	4,84	3,10
MIMO	87,75	56,23
Manitol	11,20	7,18
Lactato	0,32	0,20
Glicerol	0,37	0,24
Formiato	0,00	0,00
Acetato	0,11	0,07
TOTAL	106,99	68,56
Brix, %:	64,08	
Pureza, %:	82,02	
Mw, Da:	739	
DP de MIMO	%/brix:	
MIMO-DP3	13,71	
MIMO-DP4	30,82	
MIMO-DP5	27,30	
MIMO-DP6	11,48	

ES 3 016 735 T3

MIMO-DP7 3,11
MIMO-DP8 1,26
MIMO-DP9 0,00

MIMO-DP7 3,19
MIMO-DP8 1,25
MIMO-DP9 0,00

Por tanto, para los lotes preparados mediante esterilización por filtración en frío de los azúcares, una razón sacarosa/maltosa de 2,73 debe proporcionar una MWD similar, por ejemplo, de 740 a 790 Da.

- 5 Aumentar el brix del licor #1 hasta más de 65 y enfriar la segunda cristalización hasta 2-5 °C mejoraron la pureza del producto (con respecto a la cristalización a temperatura ambiente con 52 ó 65,78 brix) en aproximadamente un 26 % (-3,15 %/brix). El producto final así obtenido demostró una estabilidad en almacenamiento mejorada y no cristalizó más una vez almacenado a 5 ó 20 °C.

- 10 Esta iteración de procedimiento (concentración del licor #1 y cristalización secuencial, en primer lugar a temperatura ambiente y luego a 2-5 °C) y la composición obtenida de este modo se han integrado en el procedimiento a escala comercial.

EJEMPLO 3

- 15 Este ejemplo demuestra la fermentación a escala de 10 l usando una razón sacarosa:maltosa de 2,00 en el momento de inoculación, y con la introducción de azúcares mediante filtración a través de un filtro de 0,2 mm (sometido a esterilización por filtración, SBF).

- 20 Fermentación de ensayo de 10 l a una S/M = 2,0 con SBF de azúcares

Se preparó una disolución de reserva de azúcares y sales que contenía lo siguiente:

10 l #1	kg:
Agua	4,471
Sacarosa	1,430
Maltosa-H ₂ O	0,795
NaCl	0,00012
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,00064
Total:	6,698
ST, %:	32,05
Brix, %:	32,06
S/M:	1,990

- 25 Se añadieron los siguientes componentes a un fermentador de 10 l (BioFlo 410 o equivalente):

10 l #1	SIP, kg:
Agua	4,500
MnSO ₄ -H ₂ O	0,000098
MgSO ₄	0,000951
FeSO ₄ -7H ₂ O	0,000098
KH ₂ PO ₄	0,02606
Extracto de levadura	0,04887
Total:	4,576
ST, %:	0,00
Brix, %:	1,66
S/M:	n/a

- 30 Se sometió a esterilización *in situ* esta mezcla (dentro del fermentador) a 121 °C durante 30 minutos, luego se enfrió hasta temperatura ambiente, y se transfirieron (SBF) 5,4697 kg de la disolución de reserva de azúcares y sales al fermentador mediante un filtro de 0,2 µm para proporcionar un medio antes de la inoculación (se tomaron muestras para su análisis) con la siguiente composición:

ES 3 016 735 T3

10 l #1	Total, kg:
Agua	8,402
Sacarosa	1,168
Maltosa-H ₂ O	0,650
MnSO ₄ -H ₂ O	0,000
MgSO ₄	0,001
FeSO ₄ -7H ₂ O	0,000
KH ₂ PO ₄	0,026
NaCl	0,000
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,001
Extracto de levadura	0,049
NaOH, 50 %	0,000
Total:	10,296
ST, %:	17,03
Brix, %:	17,77
S/M:	1,990

Se ajustó el medio a un pH de 6,50 con NaOH al 50 %, y se le inocularon 100 g de *L. citreum* NRRL B-742 en fase logarítmica tardía cultivada en medio de la misma composición. Se dejó avanzar la fermentación durante 55 horas con control del pH para mantener el pH a 5,5 una vez que se logró el pH mediante acidogénesis bacteriana. Se tomaron muestras del fermentador a intervalos regulares para su análisis mediante HPAEC-PAD y HPLC-RID.

Resultados:

Se confirmó la razón sacarosa:maltosa (S/M) del medio antes de la inoculación mediante HPLC-RID (BioRad Aminex, HPX-87P, 80 °C, agua a 0,6 ml/min):

Compuesto:	%/brix antes de la inoc.:
Sacarosa	61,88
Maltosa	32,00
Glucosa	0,25
Fructosa	0,00
Total:	94,14
S/M:	1,93

La cantidad de materia prima (sacarosa y maltosa), producto (MIMO), producto intermedio (fructosa), y subproductos (ácidos orgánicos totales y manitol) a lo largo del tiempo, tal como se detecta mediante HPLC-RID y HPAEC-PAD, se proporciona en la figura 19. La evolución del peso molecular promedio en masa del MIMO se muestra en la figura 20.

Finalmente, la razón sacarosa:maltosa inicial de aproximadamente 2,00 (1,93 en el momento de inoculación) produjo un 51,17 %/brix de MIMO (60,11 %/azúcares totales) que tenía una MWD promedio en masa de 642,46. Véase el diagrama a continuación.

Componente	%/brix:		%/brix	
Glucosa	0,35	/	MIMO-DP3	14,69
Fructosa	0,01			
Sacarosa	0,34			
Maltosa	6,56			
MIMO	50,29		MIMO-DP4	20,17
Manitol	25,02		MIMO-DP5	11,92
Lactato	10,210		MIMO-DP6	2,88
			MIMO-DP7	0,62
			MIMO-DP8	0,00

Glicerol	0,828	MIMO-DP9	0,00
Formiato	0,120		
Acetato	4,547		
TOTAL:	98,28		
MIMO:	50,29		
Pureza, %:	51,17		
Mw, Da:	642,46		

EJEMPLO 4

5 Este ejemplo ilustra que la fermentación a escala de 10 l, usando una razón sacarosa:maltosa de 2,75 en el momento de inoculación, con la introducción de azúcares mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm (sometido a esterilización por filtración, SBF), proporcionará una MWD similar a la que surge a partir de un lote de fermentación con una razón sacarosa:maltosa inicial de 2,00 antes de SIP (es decir, de aproximadamente 2,73 en el momento de inoculación, véase la figura 8).

10 Fermentación de ensayo de 10 l a una S/M = 2,75 en el momento de inoculación con SBF de azúcares

Experimentalmente, esta fermentación es idéntica a la demostrada en el ejemplo #3 con la excepción de que se ha alterado la cantidad tanto de sacarosa como de maltosa con el fin de lograr una S/M de 2,75 en el momento de inoculación mientras se mantiene un contenido de azúcar total de aproximadamente el 17-18 % p/p.

El medio estéril final contenía:

10 l #2	Total, kg:
Agua	8,740
Sacarosa	1,333
Maltosa-H ₂ O	0,536
MnSO ₄ -H ₂ O	0,000
MgSO ₄	0,001
FeSO ₄ -7H ₂ O	0,000
KH ₂ PO ₄	0,026
NaCl	0,000
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,001
Extracto de levadura	0,049
NaOH, 50 %	0,000
Total:	10,685
ST, %:	16,99
Brix, %:	17,70
S/M:	2,751

20 La fermentación se comportó con normalidad para *L. citreum* NRRL B-742 cultivada en este medio y con pH controlado a 5,5 usando NaOH al 50 %. Las cantidades de materia prima (sacarosa y maltosa), producto (MIMO), producto intermedio (fructosa), y subproductos (ácidos orgánicos totales y manitol) a lo largo del tiempo, tal como se detecta mediante HPLC-RID y HPAEC-PAD, se proporcionan en la figura 21. Obsérvese que las actividades metabólicas y el rendimiento de MIMO son esencialmente iguales a los mostrados en el ejemplo #3 (compárese la figura 21 con la figura 20), pero la evolución del peso molecular promedio en masa del MIMO, mostrado en la figura 22, es bastante diferente y refleja la razón sacarosa:maltosa aumentada.

Finalmente, la fermentación a una razón sacarosa:maltosa de aproximadamente 2,75 (2,72-2,75) en el momento de inoculación produjo un 53,32 %/brix de MIMO (57,44 %/azúcares totales) con una MWD promedio en masa de 760,73 Da. Esto es compatible con los resultados mostrados en el ejemplo #2 donde la razón sacarosa/maltosa antes de la inoculación había aumentado desde 2,00 hasta 2,73 durante la esterilización *in situ* (SIP).

El siguiente diagrama muestra la composición del caldo de fermentación así obtenido en la parte izquierda, con la distribución de MIMO en la parte derecha.

Componente	%/brix:		%/brix	
Glucosa	0,11	/	MIMO-DP3	7,66
Fructosa	0,08			
Sacarosa	0,73			
Maltosa	0,67			
MIMO	52,19		MIMO-DP5	17,17
Manitol	27,11	/	MIMO-DP6	7,20
Lactato	11,66		MIMO-DP7	2,02
Glicerol	0,20		MIMO-DP8	0,89
Formiato	0,03		MIMO-DP9	0,00
Acetato	5,10			
TOTAL:	97,89			
Pureza, %:	53,32			
Mw, Da:	760,73			

EJEMPLO 5

Los subproductos coloreados permanecieron en el producto final (impartiendo un color marrón y un aroma similar al caramelo) cuando se usaron los procedimientos descritos anteriormente en los ejemplos 1, 2, y 3. Si bien no es indeseable (a nivel organoléptico), es un parámetro difícil de controlar, y fue preferible evitar la destrucción de la maltosa desde una perspectiva del coste (es costosa). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se diseñaron experimentos de aumento de escala para someter a prueba la SIP de minerales y agua a granel, y la esterilización por filtración de los componentes de hidrato de carbono. Tal como se ilustra en este ejemplo, un procedimiento de este tipo evitó la formación de color y facilitó un control más preciso de la S/M (fijada a 2,75).

Composición mejorada para aumento de escala

A un fermentador de 2 l (Celligen 512 de New Brunswick) se le añadió:

Lote:	kg:	g:
51815		
Agua	1,752	
MnSO ₄ -H ₂ O	0,00002	0,02093
MgSO ₄	0,00020	0,20312
FeSO ₄ -7H ₂ O	0,00002	0,02160
KH ₂ PO ₄	0,00557	5,56501
NaCl	0,00002	0,02068
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,00011	0,11113
Extracto de levadura	0,01043	10,42705
NaOH, 50 %	0,00096	0,95946
Total:	1,769	

Se selló esta mezcla en el fermentador y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Mientras el contenido del fermentador todavía estaba caliente (80-90 °C), se transfirieron 0,270 kg de sacarosa y 0,108 kg de maltosa monohidratada al fermentador y se disolvieron mediante agitación fuerte a 400 RPM. Una vez enfriada hasta 27 °C, se tomaron muestras de toda la mezcla para su análisis mediante HPLC-RID, confirmando que la razón sacarosa:maltosa era de 2,72.

Se le inocularon al fermentador 20 ml de *L. citreum* NRRL B-742 en fase logarítmica tardía, realizado tal como se describió previamente, y se controló el pH tal como se mencionó previamente. Se dejó avanzar la fermentación durante 62 h con muestreo diaria. Durante este tiempo, la fermentación consumió aproximadamente 43 g de NaOH al 40 %.

ES 3 016 735 T3

A las 62 h, se recogió todo el lote y se eliminaron las células, tal como se describió previamente, para proporcionar un caldo de 17,8 brix con una conductividad de 19,1 mS/cm. El caldo tenía un color mucho más reducido, por ejemplo, de 1039,5 UI con respecto a 11.799 UI para el mismo procesamiento de medio (completo) y SIP. Debido al color reducido, se redujo la necesidad de carbono activado en polvo en un factor de cuatro, y todavía tenía margen dentro de un factor de dos.

Se concentró el caldo hasta 45,0 brix mediante evaporación, y se decoloró con CAP CA-50S al 0,1333 % (con respecto a la masa inicial del medio) (29,2 g), tal como se describió previamente.

Se eliminaron los minerales/sales y los ácidos orgánicos a partir de 1,075 kg de licor decolorado con 39 brix tal como se describió previamente. Se ajustó el licor al que se le han retirado las cenizas combinado a un pH de 6,16 (desde un pH de 10,80) con HCl al 37 % (8,73809 g) y se concentró todo el licor al que se le han retirado las cenizas mediante evaporación hasta 57,04 brix.

Se transfirió en caliente el concentrado al que se le han retirado las cenizas a un recipiente de cristalización de 1 l y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente (19-22 °C) y cristalizar durante la noche.

Se homogeneizó la mezcla resultante para producir una suspensión de cristales que puede verterse. Se separaron los cristales de manitol mediante centrifuga de cesta (Robitel RA 20 VX con una bolsa de filtro de polipropileno de 10 µm). Se lavó la torta de cristal (0,320 kg con el 95 % de sólidos, torta #1), en porciones pequeñas, con 500 ml de agua desionizada helada. Se conservaron 0,697 kg de lavado de torta (lavado #1) con 20,5 brix para su recirculación. Se refrigeraron 2,626 kg de licor (licor #1) con 51,70 brix hasta 3 °C y se dejaron cristalizar durante la noche.

Se eliminaron los cristales (torta #2, 0,109 kg at 95 % de sólidos), tal como antes. Se combinó el lavado de torta #2 con el lavado #1 para su recirculación. Se analizó el licor de producto #2 con 49,0 brix (HPAEC-PAD, HPLC-RID, brix, pH y conductividad).

Resultados

A continuación se proporcionan los resultados del material compuesto mediante HPAEC-PAD y HPLC-RID.

h:	15	39	63
brix:	18,2	17,8	17,8
manitol	25,88	26,50	26,49
glucosa	0,02	0,13	0,67
fructosa	1,73	0,06	0,01
sacarosa	0,22	0,13	0,23
maltosa	2,35	2,49	3,01
DP3	10,71	7,41	7,39
DP4	20,26	16,83	13,98
DP5	17,49	16,90	15,68
DP6	6,29	7,56	7,87
DP7	1,58	2,16	2,49
DP8	0,79	0,91	1,21
DP9	0,00	0,00	0,00
lactato	9,55	13,01	13,17
glicerol	0,00	0,00	0,00
formiato	0,00	0,00	0,00
acetato	4,52	4,77	4,85
TOTAL:	102,02	100,51	98,77
MIMO, %:	57,13	51,76	48,62
Pureza, %:	56,00	51,50	49,22
MWD:	727,43	754,80	761,03
Rendimiento, %:	57,78	51,97	49,68

EJEMPLO 6

Se integraron las encarnaciones de procedimiento descritas en los ejemplos previos (1-5) y se aumentaron de escala hasta 3000 l con un rendimiento de procedimiento global teórico de 240 kg de MIMO (DS)/azúcares totales alimentados. Estos ejemplos detallan el procedimiento escalado, y la composición obtenida mediante el mismo.

Producción a escala comercial de MIMO

Fermentación/biosíntesis de MIMO

A 3,7 kg de agua sometida a OI (ósmosis inversa) se le añadieron sacarosa (blanca refinada, a partir de caña), 0,5302 kg; maltosa monohidratada (Sunmalt-S[N]), 0,2935 kg; extracto de levadura (calidad bacteriológica Marcor), 0,0221 kg; fosfato de potasio monobásico, 0,0118 kg; sulfato de magnesio (anhidro), 0,00043 kg; sulfato ferroso heptahidratado, 0,000045 kg; sulfato de manganeso monohidratado, 0,000045 kg; cloruro de sodio, 0,000045 kg; y cloruro de calcio dihidratado (USP), 0,00024 kg.

Se ajustó el pH del medio a 7,0 con NaOH al 50 % (FCC), 0,0057 kg.

Se dispensaron 700 ml de medio a cada uno de seis matraces Fernbach sin deflectores. Se sellaron los matraces usando tapones de espuma y se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

A cada uno de cinco de los seis matraces se le inoculó 1 ml de reserva de viales (*Leuconostoc citreum* NRRL B-742; 0,5 ml de cultivo en fase logarítmica tardía + 0,5 ml de glicerol, 40 %, certificado como Kosher-Pareve). El sexto matraz era un control no inoculado.

Se incubaron los matraces a 27 °C durante 16 h ($DO_{600} = 1,476 \pm 0,03$) con agitación a 150 RPM. Se inspeccionó el inóculo mediante microscopía para determinar que el cultivo estaba limpio antes de su uso.

Se añadió lo siguiente a un tanque de lote: agua purificada mediante ósmosis inversa (agua sometida a OI), 1440 kg; sacarosa, 498,96 kg; maltosa monohidratada, 200 kg; cloruro de sodio, 0,037 kg; y cloruro de calcio dihidratado, 0,204 kg.

Mientras tanto, se limpió *in situ* un fermentador de siembra de 1200 galones. Al fermentador de siembra se le añadieron agua sometida a OI, 238 kg; extracto de levadura, 2,76 kg; fosfato de potasio monobásico, 1,48 kg; sulfato de magnesio (anhidro), 0,054 kg; sulfato ferroso heptahidratado, 0,0057 kg; y sulfato de manganeso monohidratado, 0,0057 kg.

Se mezcló a fondo el contenido del fermentador, se dejó reposar a 37 °C durante dos horas, y luego se esterilizó *in situ* a 121 °C durante 60 minutos.

Una vez enfriado, 309,2 kg de la disolución de azúcares y sales se transfirieron desde el tanque de carga hasta el fermentador de siembra a través de una cápsula de filtro de 0,2 µm esterilizante con un prefiltro de 1,0 µm (filtro de cartucho 20" Cuno). Se lavaron a fondo el filtro y las líneas con 10 kg de agua sometida a OI. El medio mixto tenía un pH de 5,47.

Se le inocularon al fermentador de siembra 3,8 kg de cultivo de matraz en fase logarítmica tardía. Se dejó avanzar la fermentación bajo 1-3 psig de aire (en el espacio de cabeza para mantener una presión positiva), a 27 °C, con agitación a 42 RPM durante 16 horas ($DO_{600} = 2,74$).

Mientras tanto, a un fermentador de producción *in situ* limpio se le añadió agua sometida a OI, 1332 kg; extracto de levadura, 15,01 kg; fosfato de potasio monobásico, 8,01 kg; sulfato de magnesio (anhidro), 0,2922 kg; sulfato ferroso heptahidratado, 0,030 kg; y sulfato de manganeso monohidratado, 0,030 kg. Se esterilizó *in situ* esta mezcla a 121 °C durante 60 min. A esta mezcla se le bombearon 1141 kg de la disolución de azúcares y sales (desde el tanque de carga) a través de una cápsula de filtro de 0,2 µm esterilizante con un prefiltro de 1,0 µm (filtro de cartucho 20" Cuno).

Se usaron 31 kg de cultivo de siembra en fase logarítmica tardía (*L. citreum* NRRL B-742) para inocular el fermentador de producción. Se ajustó el pH a 6,52 con NaOH al 50 %, y se dejó avanzar la fermentación durante 55 horas a 27 °C, 1-3 psig de aire, y con agitación a 31 RPM. Se mantuvo el pH a 5,5 con NaOH al 50 % (aproximadamente 120 kg).

La figura 23 ilustra gráficamente el pH (3,32 final) y la DO_{600} (2,74 final) en el tanque de siembra, mientras que las figuras 24-26 demuestran el pH (5,58 final), la DO_{600} (8,78 final) en el fermentador de producción, la composición del caldo preparado en el mismo, y el peso molecular de MIMO a lo largo del tiempo durante la fermentación.

Procesamiento posterior/tratamiento final:

- Se eliminó la biomasa (células, etc.) a partir del caldo de fermentación mediante su pase a través de un microfiltro de 0,2 μm (chasis (*skid*)). Se recuperó cualquier MIMO restante que permanecía en el retenido mediante seis etapas de diafiltración. Se combinaron el permeado y el diafiltrado y se evaporaron hasta aproximadamente 40 brix mediante evaporador de película agitada (WFE). Se descargó en caliente el concentrado resultante y se trató con 12,5 kg de carbono activado en polvo (CAP, Carbochem CA-50S) y 21 kg de adyuvante de filtro de diatomita Celite 545. Se agitó toda la mezcla durante 20 minutos antes de la filtración a través de un filtro prensa con una precapa de 20 kg de Celite 545. Se usó un filtro de cartucho de 1 μm para pulir los finos a partir del filtrado. Se usó agua sometida a OI, 700 kg, para lavar la torta de CAP.
- Se combinaron el filtrado y el lavado de CAP para proporcionar 1277 kg de concentrado decolorado con 29,3 brix.
- Se le retiraron las cenizas al concentrado decolorado mediante su pase (5 x 300 kg slugs) a través de resinas de intercambio iónico, una catiónica de ácido fuerte (SAC, Purolite C-150S, forma H^+ , 14,0 pies cúbicos) y una aniónica de base débil (WBA, Purolite A-133, forma de base libre, 13,5 pies cúbicos).
- Se filtró el producto de intercambio iónico (IEX) combinado (5,6 brix) a través de un filtro de cápsula de 0,2 mm a un tanque de contención *in situ* limpio donde se ajustó a pH <4,2 (2,8, real) con ácido clorhídrico al 31 %.
- Se concentró el producto de IEX acidificado hasta 54,21 brix mediante evaporación (WFE), se descargó en caliente a 2 contenedores de acero inoxidable de 1 m^3 . Se permitió que se enfriaran lentamente, con agitación lenta (mezclador neumático) hasta temperatura ambiente (25 °C).
- Se eliminaron los cristales a partir del licor madre mediante su pase a través de un filtro Nutsch Hastelloy (disco de filtro de 10 mm y precapa de Celite 545) para producir 273 kg de licor #1.
- Se lavó la torta de cristal (153 kg) con agua sometida a OI fría, 285 kg, para producir 342 kg de lavado de torta #1 y 60 kg de torta #1.
- Se congeló el lavado de torta #1 para su recirculación a un lote futuro y se evaporó el licor #1 hasta 65,60 brix mediante evaporación (alambique). Se descargó en caliente el licor resultante a un contenedor de acero inoxidable de 1 m^3 y se permitió que se enfriara lentamente, con agitación lenta (mezclador neumático) hasta temperatura ambiente (25-30 °C). Luego, se llevó el contenedor a una nevera donde se continuó la cristalización con enfriamiento lento hasta 5 °C.
- Se eliminaron los cristales a partir del licor madre mediante su pase a través de un filtro Nutsch Hastelloy (disco de filtro de 10 mm y precapa de Celite 545) para producir 127,1 kg de licor #2 con 64,04 °brix. Se lavó la torta de cristal con agua sometida a OI fría para producir 184 kg de lavado de torta #2 y 39,4 kg de torta #2.
- Se congeló el lavado de torta #2 para su almacenamiento y recirculación al siguiente lote.
- Se pasteurizó el licor #2 a 70 °C durante 30 minutos en el alambique, se enfrió y se envasó en tambores de polietileno de alta densidad desinfectados de 55 galones.
- Se enviaron las muestras para pruebas microbiológicas y análisis para la emisión del COA del lote.
- La composición preparada de ese modo era la siguiente (tal como se detecta mediante HPAEC-PAD/HPLC-RID):

Componente %/brix:			%/brix
Glucosa	0,46		
Fructosa	0,05		
Sacarosa	1,75		
Maltosa	4,39		
MIMO	95,51		
Manitol	8,35		
Lactato	0,00		
Glicerol	0,51		
Formiato	0,00		
Acetato	0,00		
TOTAL:	111,03		
Pureza, %:	86,02		
Mw, Da:	789,46		
		MIMO-DP3	11,89
		MIMO-DP4	28,06
		MIMO-DP5	28,67
		MIMO-DP6	16,77
		MIMO-DP7	6,58
		MIMO-DP8	2,80
		MIMO-DP9	0,73

La figura 27 muestra un cromatograma de HPAEC-PAD del lote de producto #150622 en la que los componentes se identifican como A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: sacarosa; F: maltosa; y donde G-M corresponden a MIMO-DP3 a MIMO-DP9.

La figura 28 muestra cromatogramas de HPAEC-PAD durante la eliminación de manitol a partir del licor madre 1, y 2, 3 correspondientes a las etapas de cristalización de compuesto, 1 y 2, respectivamente. Los componentes se identifican como A: D-manitol; B: L-arabinosa (patrón interno); C: D-glucosa; D: D-fructosa; E: sacarosa; F: maltosa; y G-M correspondientes a MIMO-DP3 a MIMO-DP9. Obsérvese que se reduce el manitol y que, de ese modo, se aumenta la pureza de MIMO.

La figura 29 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones anoméricas de 1 y 2, productos NC y lote #150622, respectivamente y, 3, D-panosa (referencia de δ) en las que la señal A corresponde a los protones anoméricos α -(1,4); la señal B corresponde a los protones anoméricos α -(1,6); las señales C y D corresponden a los protones anoméricos α y β reductores, respectivamente, en el extremo reductor; y las señales E y F corresponden a las regiones correspondientes a los protones anoméricos α -(1,3) y α -(1,2), respectivamente. Obsérvese el segundo doblete mínimo o ausente en el lote #150622; este se debe probablemente a la etapa de acidificación que evita la posible epimerización catalizada por álcali de C2.

La figura 30 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones no anoméricas de los productos 1, NC, y 2, lote #150622.

La figura 31 muestra una superposición de espectros de ^1H -RMN 1D de 300 MHz (agua suprimida en D_2O) de las regiones alquílicas de los productos (1) lote #150622; y (2) A2. La señal A se desconoce; la señal B corresponde a los protones de acetilo (la diferencia se debe al pH, $A_2 = 4,81$, lote #150622 = 6,08); la señal C corresponde a los protones de metilo C3 de lactato; y la señal D no está asignada. Obsérvese que la cantidad de acetato/lactato tanto en 1 y como en 2 (A2) era inferior al límite de detección mínimo (MDL) de HPLC-RID.

EJEMPLO 7

Se modificaron la composición y el procedimiento descritos en el ejemplo 6 para aumentar la recuperación de producto (minimizando las pérdidas y los materiales conservados para la recirculación al lote). A continuación se detalla la modificación del procedimiento y la composición así producida.

Modificación del procedimiento y la composición así preparada – estado de la técnica

Fermentación/biosíntesis de MIMO

A 3,7 kg de agua sometida a OI (ósmosis inversa) se le añadieron sacarosa (blanca refinada, a partir de caña), 0,5302 kg; maltosa monohidratada (Sunmalt-S[N]), 0,2935 kg; extracto de levadura (calidad bacteriológica Marcor), 0,0221 kg; fosfato de potasio monobásico, 0,0118 kg; sulfato de magnesio (anhidro), 0,00043 kg; sulfato ferroso heptahidratado, 0,000045 kg; sulfato de manganeso monohidratado, 0,000045 kg; cloruro de sodio, 0,000045 kg; y cloruro de calcio dihidratado (USP), 0,00024 kg.

Se ajustó el pH del medio a 7,0 con NaOH al 50 % (FCC), 0,0057 kg.

ES 3 016 735 T3

Se dispensaron 700 ml de medio a cada uno de seis matraces Fernbach sin deflectores. Se sellaron los matraces usando tapones de espuma y se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

5 A cada uno de cinco de los seis matraces se le inoculó 1 ml de reserva de viales (*Leuconostoc citreum* NRRL B-742; 0,5 ml de cultivo en fase logarítmica tardía + 0,5 ml de glicerol, 40 %, certificado como Kosher-Pareve). El sexto matraz era un control no inoculado.

10 Se incubaron los matraces a 27 °C durante 16 h ($DO_{600} = 1,476 \pm 0,03$) con agitación a 150 RPM. Se inspeccionó el inóculo mediante microscopía para determinar que el cultivo estaba limpio antes de su uso. Se tomó una muestra y se congeló a -75 °C en glicerol al 20 % p/p para su análisis posterior mediante secuenciación de ARNr 16S para determinar y verificar la pureza del cultivo.

Mientras tanto, se limpió *in situ* un fermentador de siembra de 1200 galones.

15 Se cargó un tanque de lote con agua sometida a OI, 1510 kg; sacarosa, 522,04 kg; maltosa monohidratada, 210 kg; cloruro de sodio, 0,039 kg; y cloruro de calcio dihidratado, 0,214 kg.

20 Al fermentador de siembra se le añadieron agua sometida a OI, 238 kg; extracto de levadura, 2,80 kg; fosfato de potasio monobásico, 1,50 kg; sulfato de magnesio (anhidro) 0,055 kg; sulfato ferroso heptahidratado, 0,0057 kg; y sulfato de manganeso monohidratado, 0,0059 kg.

Se mezcló a fondo el contenido del fermentador, se dejó reposar a 37 °C durante dos horas, y luego se esterilizó *in situ* a 121 °C durante 60 minutos.

25 Una vez enfriado, se transfirieron 310 kg de la disolución de azúcares y sales desde el tanque de carga hasta el fermentador de siembra a través de una cápsula de filtro de 0,2 µm esterilizante con un prefiltro de 1,0 µm (filtro de cartucho 20' Cuno). Se lavaron a fondo el filtro y las líneas con 10 kg de agua sometida a OI. El medio mixto tenía un pH de 5,54.

30 Se inocularon al fermentador de siembra 3,8 kg de cultivo de matraz en fase logarítmica tardía. Se dejó avanzar la fermentación bajo 1-3 psig de aire (en el espacio de cabeza para mantener una presión positiva) a 27 °C, con agitación a 42 RPM durante 16 horas ($DO_{600} = 2,805$, pH de 3,45).

35 Mientras tanto, se añadió lo siguiente a un fermentador de producción *in situ* limpio: agua sometida a OI, 1332 kg; extracto de levadura; 5,6 kg; fosfato de potasio monobásico, 8,05 kg; sulfato de magnesio (anhidro), 0,2922 kg; sulfato ferroso heptahidratado, 0,030 kg; y sulfato de manganeso monohidratado, 0,030 kg. Se esterilizó *in situ* el contenido de fermentación a 121 °C durante 60 min. Se bombeó lo siguiente al fermentador de producción: 1680 kg de disolución de azúcares y sales (desde el tanque de carga) a través de una cápsula de filtro de 0,2 µm esterilizante con un prefiltro de 1,0 µm (filtro de cartucho 20' Cuno). Se lavaron a fondo el filtro y las líneas con 10 kg de agua sometida a OI.

45 Se usaron 31 kg de cultivo de siembra en fase logarítmica tardía para inocular el fermentador de producción. Se ajustó el pH a 6,54 con NaOH al 50 % (aproximadamente 1 kg), y se dejó avanzar la fermentación durante 55 horas a 27 °C, con 1-3 psig de aire, y con agitación a 31 RPM. Se mantuvo el pH a 5,5 con NaOH al 50 % (aproximadamente 120 kg). Se tomó una muestra y se congeló a -75 °C en glicerol al 20 % p/p para su análisis posterior mediante secuenciación de ARNr 16S para determinar y verificar la pureza del cultivo.

50 La figura 32 muestra las cantidades de especies químicas tal como se detecta mediante HPAEC-PAD y HPLC-RID durante todo el transcurso de una fermentación de 3000 l (S/M = 2,75, lote #151105) usando *L. citreum* NRRL B-742.

55 La figura 33 ilustra la evolución de la distribución de peso molecular de los MIMO durante todo el transcurso de una fermentación de 3000 l (S/M = 2,75, lote #151105) con *L. citreum* NRRL B-742. Obsérvese que la MWD continúa aumentando (hasta aproximadamente 15 horas) después del agotamiento de la sacarosa (a las 10 horas aproximadamente). La velocidad de crecimiento de cadena tiene lugar entonces a una velocidad inferior, pero constante, hasta el final de la fermentación (55 horas) cuando se logró el peso molecular de aproximadamente 776,5 Da.

Procesamiento posterior/tratamiento final:

60 Se eliminó la biomasa (células, etc.) a partir del caldo de fermentación mediante su pase a través de un microfiltro de 0,2 µm (chasis). Se recuperó el MIMO restante que permanecía en el retenido mediante seis etapas de diafiltración. Se combinaron el permeado y el diafiltrado (6745 kg con 8,6 °brix) y se evaporaron hasta 48,31 brix usando un evaporador de película agitada (WFE). Se lavó WFE con agua sometida a OI y se conservaron los lavados para su uso posterior (lavado de WFE #1).

ES 3 016 735 T3

- Se descargó en caliente el concentrado resultante y se trató con 12,5 kg de carbono activado en polvo (CAP, Carbochem CA-50S) y 21 kg de adyuvante de filtro de diatomita Celite 545. Se agitó la mezcla durante 20 minutos antes de la filtración a través de un filtro prensa con una precapa de 20 kg de Celite 545. Se usó un filtro de cartucho de 1 µm para pulir los finos a partir del filtrado. Se usó agua de lavado (11,13 brix a la salida) procedente del evaporador de película agitada (lavado de WFE #1, 700 kg), seguido de un empuje de agua sometida a OI (1,7 brix a la salida), para lavar la torta de CAP.
- Se combinaron el filtrado y el lavado de CAP para proporcionar 1873 kg de concentrado decolorado con 25,7 brix. Se le retiraron las cenizas al concentrado decolorado mediante su pase (5 x 325 kg slugs) a través de resinas de intercambio iónico, una catiónica de ácido fuerte (SAC, Purolite C-150S, forma H⁺, 14 pies cúbicos) y una aniónica de base débil (WBA, Purolite A-133, forma de base libre, 13,5 pies cúbicos).
- Se filtró el producto de intercambio iónico combinado (5,6 brix) a través de un filtro de cápsula de 0,2 µm (PRMXE 30") a un tanque de contención *in situ* limpio donde se ajustó a pH <4,2 (2,8, real) con ácido fosfórico al 85 %.
- Se concentró el producto de intercambio iónico acidificado hasta 52,64 brix mediante evaporación usando un evaporador de película agitada, y luego se descargó en caliente a 2 contenedores de acero inoxidable de 1 m³. Se permitió que se enfriaran lentamente, con agitación lenta (mezclador neumático) hasta temperatura ambiente (25 °C). Se enjuagó el evaporador de película agitada con agua sometida a OI y se conservó para su uso posterior adicional en el procedimiento (1,7 brix, Lavado de WFE #2).
- Se eliminaron los cristales a partir del licor madre mediante su pase a través de un filtro Nutsch Hastelloy (disco de filtro de 10 mm y precapa de Celite 545) para producir 571 kg de licor #1 con 49,7 °brix.
- Se lavó la torta de cristal, 118 kg, con agua de enjuague de evaporador de película agitada fría (lavado de WFE #2) para producir 218 kg de lavado de torta #1 con 24,3 brix y 54,4 kg de torta #1.
- Se combinaron el licor #1, el lavado de torta #1, y cualquier lavado de WFE #2 restante y se evaporaron hasta 67,7 brix mediante evaporación (alambique). Se enfrió el licor resultante hasta 30 °C y se descargó a un contenedor de acero inoxidable de 1 m³. Luego, se llevó el contenedor a una nevera donde se continuó la cristalización con enfriamiento lento hasta 5 °C. Se enjuagó el alambique con 200 kg de agua sometida a OI para producir 196 kg de lavado con 1,2 °brix (lavado de alambique) que se refrigeró para su uso posterior.
- Se eliminaron los cristales a partir del licor madre mediante su pase a través de un filtro Nutsch Hastelloy (disco de filtro de 10 mm y precapa de Celite 545) para producir 315 kg de licor #2 con 63,5 °brix.
- Se lavó la torta de cristal, 165,25 kg, con el lavado de alambique frío para producir 248 kg de lavado de torta #2 con 27 °brix y 77,65 kg de torta #2.
- Se congelaron el lavado de torta #2 y cualquier enjuague de alambique restante para su almacenamiento y recirculación al siguiente lote.
- Se pasteurizaron 315 kg de licor #2 a 70 °C durante 30 minutos en un alambique, se enfriaron y se envasaron en bolsas Scholle de 55 galones (bolsa en caja) con accesorios desinfectados. El rendimiento fue de 314,3 kg de producto pasteurizado que contenía 170,3 kg de MIMO con 63,01 brix.
- Se enviaron las muestras para pruebas microbiológicas y análisis para la emisión del certificado de análisis del lote. En la figura 34 se superponen y proporcionan cromatogramas que comparan el lote #150622 con este lote #151105.
- El rendimiento de fermentación fue del 51,23 % con respecto a los azúcares totales alimentados. La recuperación del procedimiento fue, en general, del 62,40 % con un 77,52 % potencialmente recuperable o un rendimiento del 31,97 % con respecto a los azúcares totales alimentados. El balance global de masas para DSP fue (los puntos significativos en negrita):

Muestra:	kg:	Brix:	DS, kg:	Pureza, %:	ISOT, kg:
Caldo final	3081	18,10	557,63	48,94	272,92
permeado inicial	2175	18,00	391,50	46,82	183,30
retenido inicial	2250	18,00	405,00	49,28	199,58
Etapas de perm. 1	825	10,1	83,33	46,82	39,01
Etapas de perm. 2	750	6,1	45,75	46,82	21,42
Etapas de perm. 3	750	3,3	24,75	46,82	11,59
Etapas de perm. 4	750	2,0	15,00	46,82	7,02

ES 3 016 735 T3

Etapa de perm. 5	750	1,3	9,75	46,82	4,57
Etapa de perm. 6	750	0,7	5,25	46,82	2,46
Permeado agrupado	6745	8,6	580,07	46,82	271,59
Etapa de ret. 1	750	10,3	77,25	49,28	38,07
Etapa de ret. 2	750	6,1	45,75	49,28	22,54
Etapa de ret. 3	750	3,5	26,25	49,28	12,94
Etapa de ret. 4	750	2,0	15,00	49,28	7,39
Etapa de ret. 5	750	1,3	9,75	49,28	4,80
Etapa de ret. 6	750	0,9	6,75	49,28	3,33
Contenedor de concentrado de WFE #1	781	47,9	374,10	48,88	182,87
Contenedor de concentrado de WFE #2	329	49,3	162,20	48,88	79,29
Concentrado de WFE agrupado	1110	48,31	536,30	51,41	262,16
Destilado de WFE	5544	0,2	11,09	51,41	5,70
Lavado de WFE #1	700	1,8	12,60	51,41	6,48
Contenedor de filtrado de producto #1	756	32	241,92	48,88	118,26
Contenedor de filtrado de producto #2	243	40	97,20	48,88	47,51
Lavado de filtro prensa	634	11,3	71,64	50,36	36,08
Lavado de OI	2400	1,7	5,10	53,82	2,74
Filtrado de producto agrupado	1873	25,70	481,36	50,86	244,83
Goteo de la bandeja	198	15,20	30,10	50,47	15,19
Pulso de IEX #1	1317	5,0	66,18	57,65	38,16
Pulso de IEX #2	1370	5,4	73,98	57,65	42,65
Pulso de IEX #3	1619	5,1	82,57	57,65	47,60
Pulso de IEX #4	1749	4,9	85,70	57,65	49,41
Pulso de IEX #5	1855	4,7	87,19	57,65	50,27
Pulso de IEX #6	1629	1,8	29,45	57,65	16,98
Efluente de IEX agrupado	9426	4,51	425,06	57,65	245,07
Filtración de 0,2 mm	RT	n/a			
Acidificación	0,5	n/a			
Concentrado de WFE-IEX	695	58,68	407,83	57,65	235,13
Destilado de WFE-IEX	6835	0,2	13,67	57,65	7,9
Lavado de WFE-IEX #1	250	1,7	4,25	57,65	2,5
Lavado de WFE-IEX #2	250	0,1	0,25	57,65	0,1
Licor de etapa 1	571	49,7	283,79	71,62	203,2
Cristales de etapa 1	153,7	78,18	120,16	23,62	28,4
Lavado de cristales de etapa 1	218	24,3	52,97	44,19	23,4
Cristales lavados de etapa 1	54,4	78,38	42,64	4,62	2,0
Al alambique	789	42,68	336,76	64,04	215,7
2ª alimentación de cristales	444,3	67,70	300,79	66,81	201,0
Lavado de alambique	196	1,2	2,35	50,01	1,2
Licor de etapa 2	315	63,5	200,03	85,57	171,2
Cristales de etapa 2	165,25	82,19	135,82	37,30	50,7
Lavado de cristales de etapa 2	248	27	66,96	60,37	40,4
Cristales lavados de etapa 2	77,65	77,52	60,19	9,33	5,6
Producto pasteurizado	314,3	63,01	198,05	86,00	170,3

ES 3 016 735 T3

A continuación se proporciona la composición del producto (producto pasteurizado) así preparado:

lote # 151105		%brix:				
Brix	63,01					
manitol	6,23					
glucosa	0,85					
fructosa	0,16					
sacarosa	1,86					
maltosa	4,29					
MIMO	84,77					
Lactato	0,00					
Glicerol	0,41					
Formiato	0,00					
Acetato	0,00					
TOTAL, %:	98,58					
Pureza, %:	86,00					
MWD, Da:	776,47					

- 5 La composición descrita en el presente documento es discreta, y puede diferenciarse mediante cromatografía, a partir de los principales productos de IMO comerciales que están disponibles actualmente. En la figura 35 se proporciona una comparación de la composición ISOThrive™, que es el canon hasta la fecha, con las composiciones basadas en IMO prebióticas comerciales.
- 10 En la figura 36 se muestra un resumen del procedimiento ilustrado en el ejemplo 7.

EJEMPLO 8

- 15 Se produjeron cuatro lotes adicionales en lotes de 3000 l usando los métodos descritos en los ejemplos anteriores. Estos cuatro lotes tenían los números de lote 150622, 151105, 160120, y 161202, y tenían las siguientes composiciones.

Lote	150622	151105	160120	161202
brix	67,35	69,33	69,69	64,57
glicerol	0,55	0,39	0,46	0,34
eritritol	0,27	0,15	0,18	0,16
manitol	8,01	6,23	5,97	5,96
glucosa	0,42	0,92	1,10	0,92
fructosa	0,05	0,15	0,16	0,13
leucrosa	2,13	2,03	1,79	1,81
sacarosa	0,62	0,69	0,65	0,79
maltosa	2,98	3,85	3,73	4,34
1,6-DP2	0,21	0,14	0,13	0,27
1,4-DP3	1,65	1,82	1,84	1,93
1,6-DP3	0,28	0,43	0,44	0,47
1,6-DP4	0,32	0,53	0,56	0,54
MIMO-DP3	9,94	11,04	10,44	12,27
MIMO-DP4	22,76	24,13	23,49	25,53
MIMO-DP5	26,27	26,47	26,56	26,32
MIMO-DP6	15,74	14,54	15,32	13,16
MIMO-DP7	5,09	4,34	4,72	3,53
MIMO-DP8	2,06	1,60	1,89	1,20

MIMO-DP9	0,65	0,54	0,56	0,32
ácido láctico	0,00	0,00	0,01	0,02
ácido acético	0,00	0,00	0,00	0,00
Pureza, %	83,11	83,63	83,98	83,34
Mw, Da	782,7	763,9	773,6	745,5

EJEMPLO 9

Este ejemplo muestra que el medio de crecimiento de *Lactobacillus gasseri* o *Lactococcus lactis* puede afectar a la morfología y al crecimiento de células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC).

Métodos

Se trataron células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) cultivadas durante la noche (células HSC-3 y 14A; confluencia del 70-80 %) con diferentes concentraciones (25, 50, 100, 150, 200 y 300 mg/ml; ensayo de proteína BCA) de caldo obtenido a partir de bacterias *Lactobacillus gasseri* ATCC 4962 o *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* NRRL B-1821 durante 2 horas. Después de 2 horas, se retiró el medio y se reemplazó por medio regular y luego se cultivaron las células de carcinoma durante 12 horas adicionales. No se observó contaminación bacteriana ni precipitación del medio de células cancerosas durante la incubación.

Resultados

Se indujeron inhibición del crecimiento celular y cambios morfológicos mediante *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* en células HSC-3 de manera dependiente de la dosis. También se observó una ligera inducción de cambios morfológicos en las células de carcinoma de células escamosas (HNSCC; 14A). Estos resultados preliminares indican que el caldo a partir de *Lactobacillus gasseri* puede ser un inhibidor más eficaz del crecimiento de células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello que el caldo a partir de *Lactococcus lactis*.

Estos resultados también muestran que las células cancerosas pueden tratarse con medio acondicionado de manera continua durante 12-18 horas (durante la noche).

EJEMPLO 10

Este ejemplo ilustra que el medio de cultivo obtenido después del crecimiento de *Lactobacillus gasseri* ATCC 4962 o *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* NRRL B-1821 puede inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon.

Ensayo de proliferación celular

Se examinó el crecimiento de células de cáncer colorrectal HCT-15 y DLD-1 durante la exposición al medio obtenido después del crecimiento de *Lactobacillus gasseri* ATCC 4962 o *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* NRRL B-1821. Las células HCT-15 son células de cáncer colorrectal en estadio C de Dukes adherentes epiteliales colónicas humanas. Las células DLD-1 son células de cáncer colorrectal en estadio C de Dukes adherentes epiteliales colónicas humanas diferenciadas de las HCT-15 y que se originan a partir de diferentes aberraciones cromosómicas (pero las mutaciones están dentro de la línea celular parental HCT-15).

Se incubaron las células de cáncer colorrectal HCT-15 y DLD-1 durante 24 horas con medio de control o caldo libre de células a partir de cultivos de *Lactobacillus gasseri* ATCC 4962 o *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* NRRL B-1821 (100, 200, 400 u 800 µg/ml).

Para determinar el efecto del caldo a partir de cultivos de *Lactobacillus gasseri* ATCC 4962 o *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* NRRL B-1821 sobre la proliferación de células cancerosas, se usó un kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT NF según las instrucciones del fabricante (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY).

Resultados

Tal como se ilustra en las figuras 37A-37B, el caldo a partir de cultivos de *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* redujo la proliferación de células de cáncer de colon de manera dependiente de la dosis con respecto a medios de cultivo de control. Estos datos indican que *Lactobacillus gasseri* y *Lactococcus lactis* secretan una sustancia que inhibe el crecimiento de células cancerosas.

EJEMPLO 11

Este ejemplo ilustra que el crecimiento de *Weissella viridescens* se inhibe mediante las nisinas A y Z. Las bacterias

asignadas al género *Weissella* son células Gram-positivas no formadoras de endosporas negativas para catalasa con morfología en forma de bacilo o cocoide. *Weissella viridescens* puede ser un patógeno oportunista implicado en infecciones humanas.

5 Materiales y métodos

Las nisinas A y Z purificadas están disponibles comercialmente y se adquirieron de Handary S.A. (Bruselas, Bélgica). Los certificados de análisis para cada lote indicaban purezas del 95,2 y del 99,6 % para nisina A y Z, respectivamente.

Se prepararon 100 g de medio De-Man, Rogosa y Sharpe (MRS) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía el 5,5 % de sólidos en agua desionizada (18,2 MΩ, Hydro Service and Supplies, Gaithersburg, MD). Se esterilizó en autoclave el medio (121 °C, 15 min), se enfrió, y se le inoculó 1 ml (0,5 ml de cultivo + 0,5 ml de glicerol, 40 %; congelado a -78 °C) de *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (cepa de prueba). Se incubó el cultivo a 31 °C durante la noche (15 h).

Al día siguiente, se prepararon disoluciones de reserva de nisina A o Z en agua desionizada que contenía 31,3 y 33,7 µg/g de cada péptido.

Se prepararon 100 g de medio MRS que contenía el 5,5 % de sólidos. Se prepararon dos conjuntos (un conjunto para nisina A y un conjunto para nisina Z) de ocho tubos de tipo Hach (Kimble Chase 45066-16100). Dentro de cada conjunto, se añadieron en orden 5,00, 4,95, 4,90, 4,75, 4,50, 4,00, 3,50 y 3,00 g de medio MRS. Se sellaron los tubos y se esterilizaron en autoclave.

A cada tubo se le añadieron 0,00, 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, y 2,00 g de la reserva de nisina apropiada. A cada tubo se le inocularon 0,25 g de cultivo en fase logarítmica tardía de *W. viridescens* NRRL B-1951. Se sellaron los tubos y se midió rápidamente la absorbancia a 600 nm (Hach DR900). Se segregaron los tubos por conjunto y se incubaron a 31 °C durante la noche (15 h).

Se tomaron muestras de cada tubo (tubos de centrifuga cónicos de polipropileno de 1,5 ml) y se centrifugaron a 10 kRPM durante 10 minutos para eliminar las células suspendidas. Se filtraron los sobrenadantes resultantes (0,2 µm, nylon), se diluyeron hasta el 0,5 % de sólidos, y se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, Agilent 1100, detector de índice de refracción y columna BioRad Ainex HPX-87H) para determinar el consumo de glucosa y la producción de ácidos orgánicos. La siguiente tabla ilustra la concentración de azúcares tales como la glucosa y la producción de ácidos orgánicos durante la incubación.

Concentración de azúcares y ácidos orgánicos en el medio de fermentación

%/brix	A1	A2	A4	A5	A6	A7	A8
maltotriosa	0,401	0,312	0,298	0,276	0,288	0,419	0,305
maltosa	1,078	0,581	0,815	0,598	0,941	0,775	0,739
glucosa	8,883	23,122	24,138	24,698	25,304	25,444	25,537
fructosa	1,122	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ácido láctico	18,404	6,884	5,496	4,672	2,707	1,521	1,579
glicerol	0,386	0,292	0,319	0,350	0,328	0,299	0,301
ácido fórmico	0,302	0,263	0,282	0,407	0,280	0,234	0,233
ácido acético	10,267	7,967	8,219	8,296	8,143	7,899	8,091
etanol	3,979	0,068	0,062	0,094	0,057	0,055	0,071
%/brix	Z1	Z2	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8
maltotriosa	0,406	0,282	0,265	0,311	0,247	0,291	0,318
maltosa	0,810	0,722	1,007	0,750	0,726	0,895	0,876
glucosa	10,064	22,988	24,153	24,698	25,353	25,501	25,740
fructosa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ácido láctico	17,820	6,742	5,081	2,995	1,351	1,431	1,652
glicerol	0,404	0,343	0,337	0,321	0,320	0,335	0,346
ácido fórmico	0,331	0,303	0,309	0,281	0,267	0,263	0,299
ácido acético	10,399	8,273	8,247	8,026	7,969	8,026	8,261
etanol	3,783	0,057	0,083	0,067	0,059	0,065	0,148

Obsérvese que el medio MRS contenía originalmente el 7 % de acetato; por tanto debe restarse el 7 % de los valores para acetato en la tabla anterior para determinar la cantidad de acetato generado durante el ensayo.

Se mezcló a fondo cada tubo para suspender las células sedimentadas y se midió de nuevo la absorbancia a 600 nm. Se corrigieron los valores finales de absorbancia para cada muestra con respecto a su fondo respectivo (tomado justo después de la inoculación, luz dispersada a partir de las células añadidas). Los valores de absorción corregidos eran una medida del crecimiento de *W. viridescens*. Se representaron gráficamente los valores corregidos frente a la concentración de nisina y se aproximó la concentración inhibidora mínima mediante regresión. Se proporcionan resultados de absorbancia ejemplificativos en la tabla a continuación.

Absorbancia del cultivo de *W. viridescens* (600 nm)

Tubo #:	MRS, g:	Med. de prueba, g:	Inoc., g:	g totales:	Nisina, µg/g:	91416 ABS 610i:	91516 ABS 610f:	Corregido ABS 610rs:
A1	5,05046	0,00000	0,24848	5,29894	0,00	0,465	2,333	1,868
A2	4,96543	0,05497	0,24044	5,26084	0,33	0,462	1,568	1,106
A3	4,88322	0,11358	0,25644	5,25324	0,68	0,468	1,531	1,063
A4	4,75224	0,23120	0,26348	5,24692	1,38	0,466	1,334	0,868
A5	4,52863	0,52264	0,2531	5,30437	3,08	0,438	0,911	0,473
A6	4,01513	1,00698	0,24562	5,26773	5,97	0,42	0,536	0,116
A7	3,50321	1,4864	0,24991	5,23952	8,86	0,402	0,403	0,001
A8	3,01078	1,99641	0,24476	5,25195	11,87	0,36	0,361	0,001
Z1	5,03594	0,00000	0,25228	5,28822	0,00	0,469	2,361	1,892
Z2	4,94155	0,05345	0,25405	5,24905	0,34	0,472	1,618	1,146
Z3	4,89029	0,12073	0,25478	5,26580	0,77	0,464	1,526	1,062
Z4	4,75115	0,24831	0,25259	5,25205	1,58	0,455	1,296	0,841
Z5	4,52267	0,50221	0,25131	5,27619	3,19	0,442	0,801	0,359
Z6	4,03195	0,99365	0,25415	5,27975	6,31	0,423	0,426	0,003
Z7	3,50064	1,49004	0,24365	5,23433	9,54	0,383	0,384	0,001
Z8	3,06159	2,00403	0,25834	5,32396	12,61	0,385	0,386	0,001

Los datos mostrados en la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 38, que ilustra gráficamente que la concentración inhibidora mínima de cada péptido era de entre 5 y 7 µg/g.

Estos datos indican que la nisina A y la nisina Z pueden inhibir eficazmente el crecimiento bacteriano (*Weissella viridescens* NRRL B-1951).

Referencias

1. Kuriki, T., Yanase, M., Takata, H., Takesada, Y., Imanaka, T. y Okada, S. (1993). A New Way of Producing Isomalto-Oligosaccharide Syrup by Using the Transglycosylation Reaction of Neopullulanase. Appl. Env. Microbiol. 59 (4), págs. 953-959.
2. Sakano, Y., Kogure, M., Kobayashi, T., Tamura, M. y Suekane, M. (1978). Carbohydrate Res. 61 (1), págs. 175-179.
3. Brooker, B.E. (1977). Ultrastructural Surface Changes Associated with Dextran Synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 131 (1), págs. 288-292.
4. Robyt, J.F., Yoon, S-H., y Mukerjee, R. (2008). Dextranucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. Carbohydr. Res. 343 (18), págs. 3039-3048.
5. Kothari, D. y Goyal, A. (2015). Enzyme-resistant isomalto-oligosaccharides produced from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextran hydrolysis for functional food application. Biotechnol. Appl. Biochem. Publicado en línea el 21 de septiembre de 2015. DOI: 10.1002/bab.1391.
6. Hu, Y., Ketabi, A., Buchko, A., y Ganzle, M.G. (2013). Metabolism of isomalto-oligosaccharides by *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacteria*. Lett. Appl. Microbiol. 57, págs. 108-114.

7. Moller, M.S., Fredslund, F., Majumder, A., Nakai, H., Poulsen, J-C., N., Leggio, L.L., Svensson, B., y Hachem, M.A. (2012). Enzymology and Structure of the GH13_31 Glucan 1,6- α -Glucosidase That Confers Isomaltooligosaccharide Utilization in the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *J. Bacteriol.* 194 (16), págs. 4249-4259.
 8. Dols, M., Chraïbi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N.D., y Monsan, P.F. (1997). Growth and Energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during Metabolism of Various Sugars and Their Consequences for Dextranucrase Production. *Appl. Env. Microbiol.* 63 (6), págs. 2159-2165.
 9. Dols, M., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Vignon, M. y Monsan, P. (1998). *Appl. Env. Microbiol.* 64 (4), págs. 1298-1302.
 10. Cho, S.K., Eom, H.J., Moon, J.S., Lim, S.B., Kim, Y.K., Lee, K.W. y Han, N.S. (2014). An improved process of isomaltooligosaccharide production in kimchi involving the addition of a *Leuconostoc* starter and sugars. *Int. J. Food Microbiol.* 170, págs. 61-64.
 11. Tiekink, M., Korakli, M., Ehrmann, M.A., Ganzle, M.G., y Vogel, R.F. (2003). *In situ* Production of Exopolysaccharides during Sourdough Fermentation by Cereal and Intestinal Isolates of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 69 (2), págs. 945-952.
 12. Corsetti, A. y Settanni, L. (2007). *Lactobacilli* in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* 40, págs. 539-558.
 13. Lee, M-E., Jang, J-Y., Lee, J-H., Park, H-W., Choi, H-J. y Kim, T-W. (2015). Starter Cultures for Kimchi Fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (5), págs. 559-568.
 14. Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E-M., Van der Meulen, R., Foulquie Moreno, M.R., Font de Valdez, G., y De Vuyst, L. (2006). Diversity of Heteropolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers. *Appl. Env. Microbiol.* 72 (6), págs. 4431-4435.
 15. Madsen II, L.R., Adams, K.L. y Gillevet, P. (2014). High-throughput PCR Sequencing of 16S rRNA in an Auto-inoculated, unfortified Sourdough starter From Red Wheat Flour. Trabajo de I+D interno no publicado.
 16. Madsen II, L.R. y Stanley, S. (2015). Fermentation using NRRL B-1299 to produce Maltosyl-isomaltooligosaccharides: analysis of 20L fermentation broth via HPAEC-PAD. Trabajo de I+D interno no publicado.
 17. Patel, S., Kothari, D. y Goyal, A. (2011). Purification and Characterization of an Extracellular Dextranucrase from *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Soil of North East India. *Food. Technol. Biotechnol.* 49 (3), págs. 297-303.
 18. Dols-Lafargue, M., Willemot, R-M., Monsan, P.F. y Remaud-Simeon, M. (2001). Factors Affecting α -1,2 Glucooligosaccharide Synthesis by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 Dextranucrase. *Biotechnol. Bioeng.* 74 (6), págs. 498-504.
 19. Chludzinski, A.M., Germaine, G.R. y Schachtele, C.F. (1974). Purification and Properties of Dextranucrase from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 118 (1), págs. 1-7.
 20. Miller, A.W., Eklund, S.H. y Robyt, J.F. (1986). Milligram to gram scale purification and characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* 147 (1), págs. 119-133.
 21. Goyal, A., Nigam, M., y Katiyar, S.S. (1995). Optimal conditions for production of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL (NRRL) B-512F and its properties. *J. Basic Microbiol.* 35 (6), págs. 375-384.
 22. Sarwat, F., Ul Qader, S-A., Aman, A. y Ahmed, N. (2008). Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.* 4 (6), págs. 379-386.
 23. Monchois, V., Reverte, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. y Willemot, R-M. (1998). Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F Dextranucrase Carboxy-Terminal Deletions on Dextran and Oligosaccharide Synthesis. *Appl. Env. Microbiol.* 64 (5), págs. 1644-1649.
- Todas las patentes y publicaciones a las que se hace referencia o mención en el presente documento son indicativas de los niveles de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende maltosil-isomaltooligosacáridos (MIMO) con una distribución de peso molecular promedio en masa de 730 a 900 Dalton, y en la que al menos el 40 % de los maltosil-isomaltooligosacáridos en la composición tienen un grado de polimerización (DP) de 5 o más.
5
2. Composición según la reivindicación 1, donde los MIMO tienen no más de 18 unidades de glucosa.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, donde los MIMO tienen una unidad de maltosa en el extremo reductor.
10
4. Composición según cualquier reivindicación anterior, con:
15
menos del 2 %/brix de isomaltosa;
menos del 5 %/brix de glucosa;
menos del 5 %/brix de sacarosa;
20
menos del 4 %/brix de fructosa;
menos del 8 %/brix de maltosa;
menos del 4 %/brix de glicerol.
25
5. Composición según cualquier reivindicación anterior, con más del 3 %/brix de manitol.
6. Composición según cualquier reivindicación anterior, con menos del 30 %/brix de maltosil-isomaltooligosacárido que tiene un grado de polimerización de 4 (MIMO-DP4).
30
7. Composición según la reivindicación 1, con:
35
más del 18 %/brix de MIMO-DP5;
más del 10 %/brix de MIMO-DP6;
más del 1 %/brix de MIMO-7; o
40
más del 0,5 %/brix de MIMO-DP8.
8. Composición según cualquier reivindicación anterior, con más del 0,1 %/brix de MIMO-DP9.
9. Composición según cualquier reivindicación anterior, como disolución concentrada.
- 45 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, secada como polvo.
11. Composición según cualquier reivindicación anterior, dividida en porciones individuales para consumo humano o animal.
- 50 12. Composición según cualquier reivindicación anterior, dividida en porciones individuales de 0,25 ml a 10 ml.

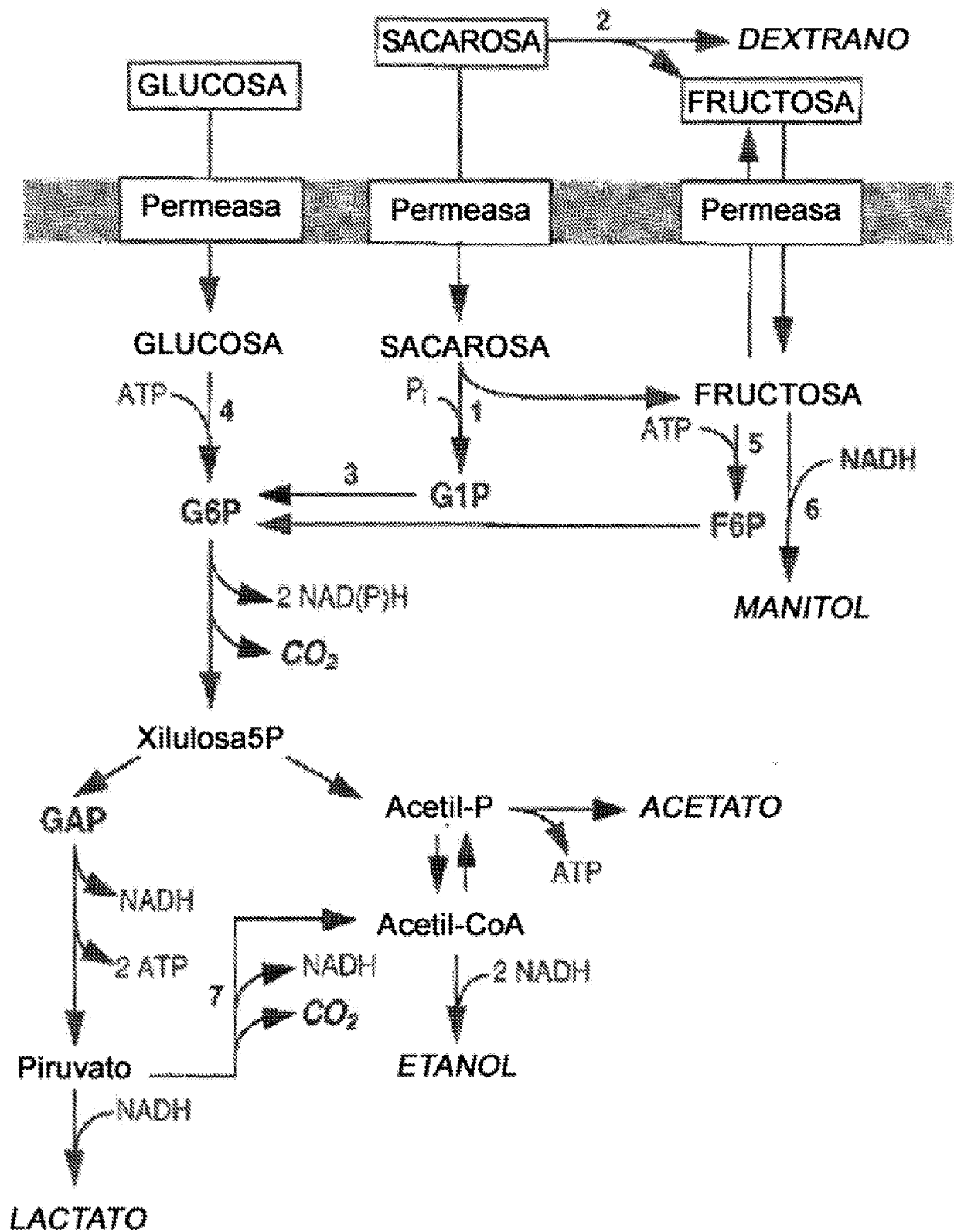


FIG. 1

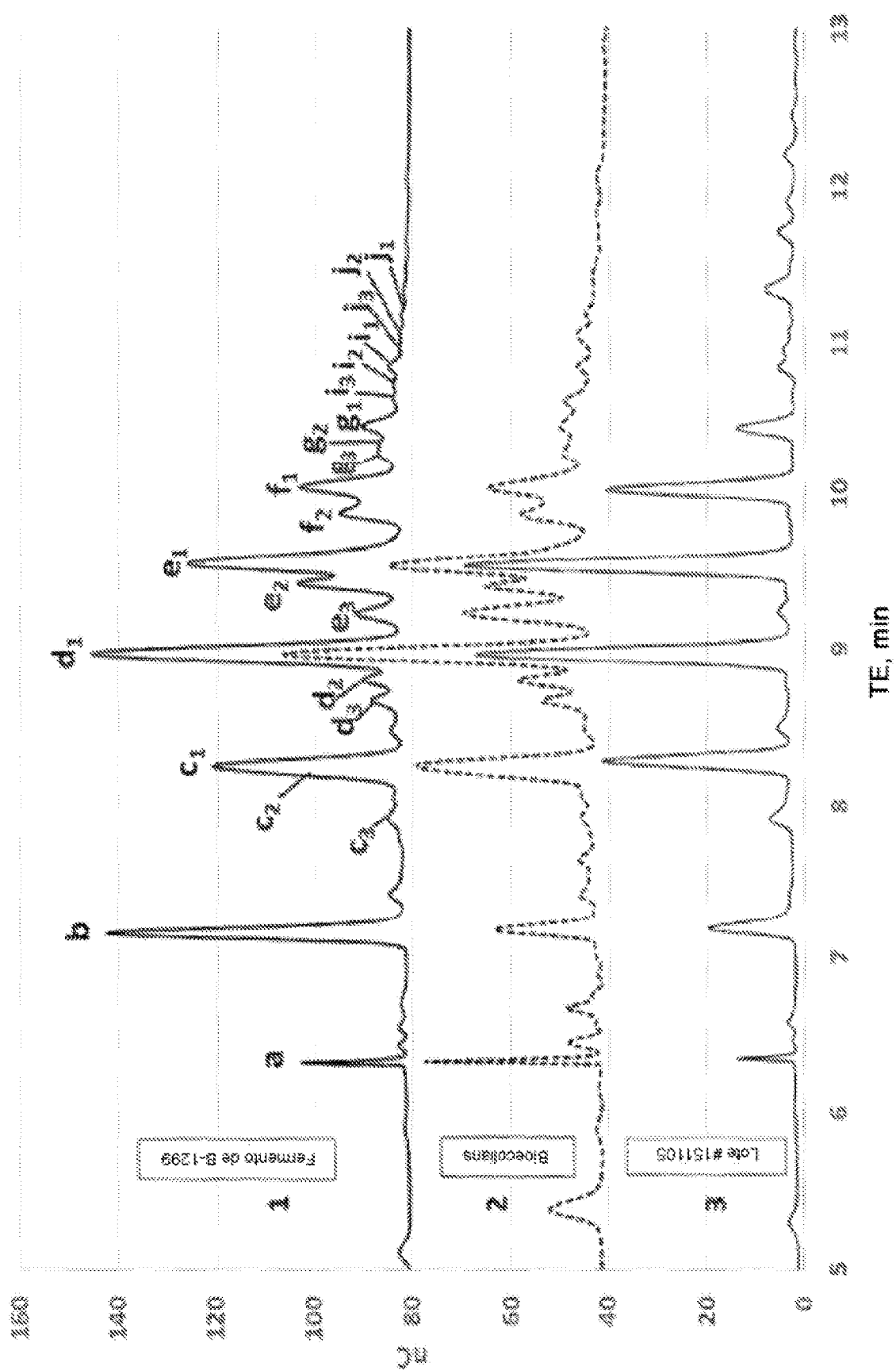


FIG. 2

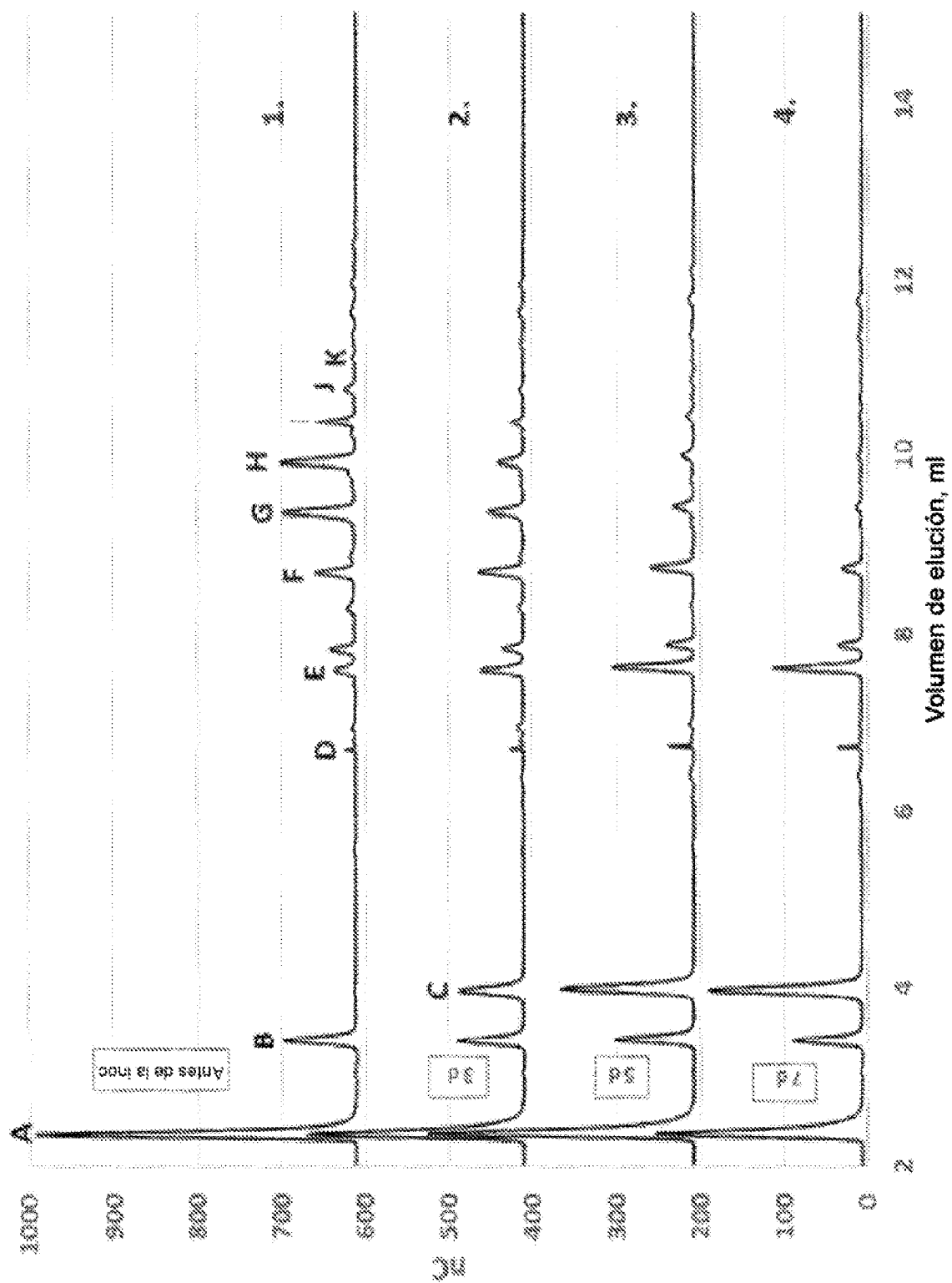


FIG. 3

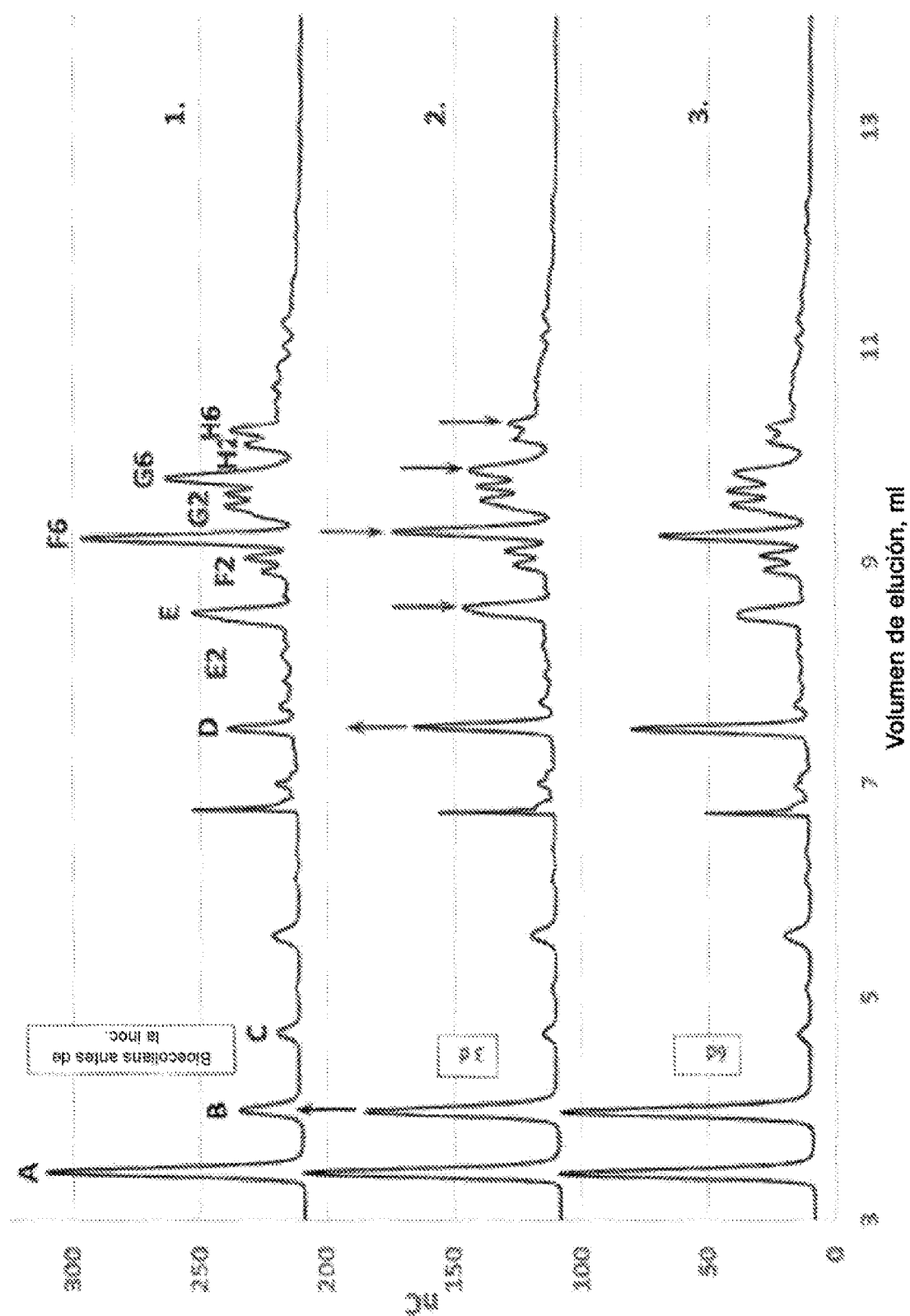


FIG. 4

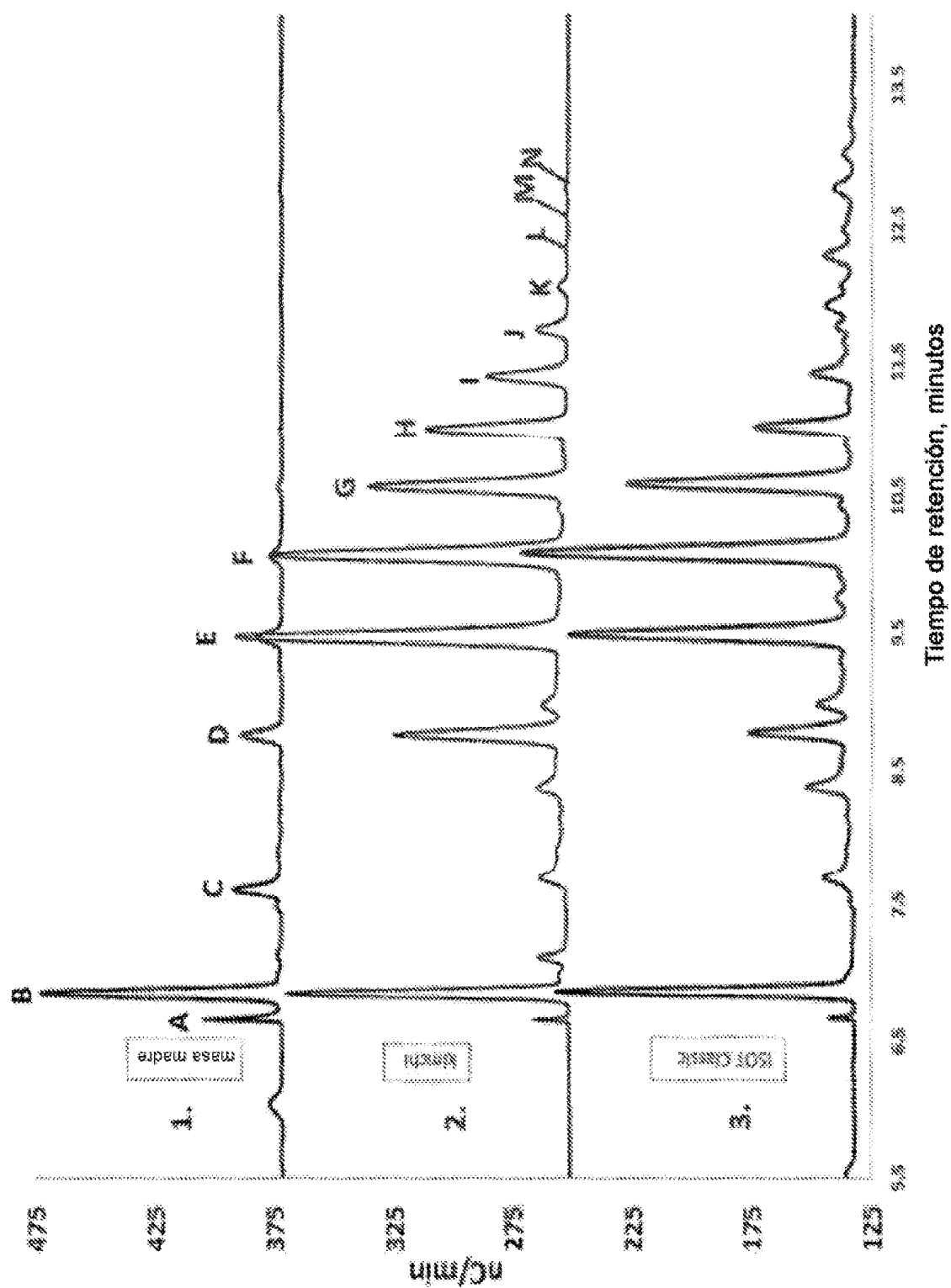


FIG. 5

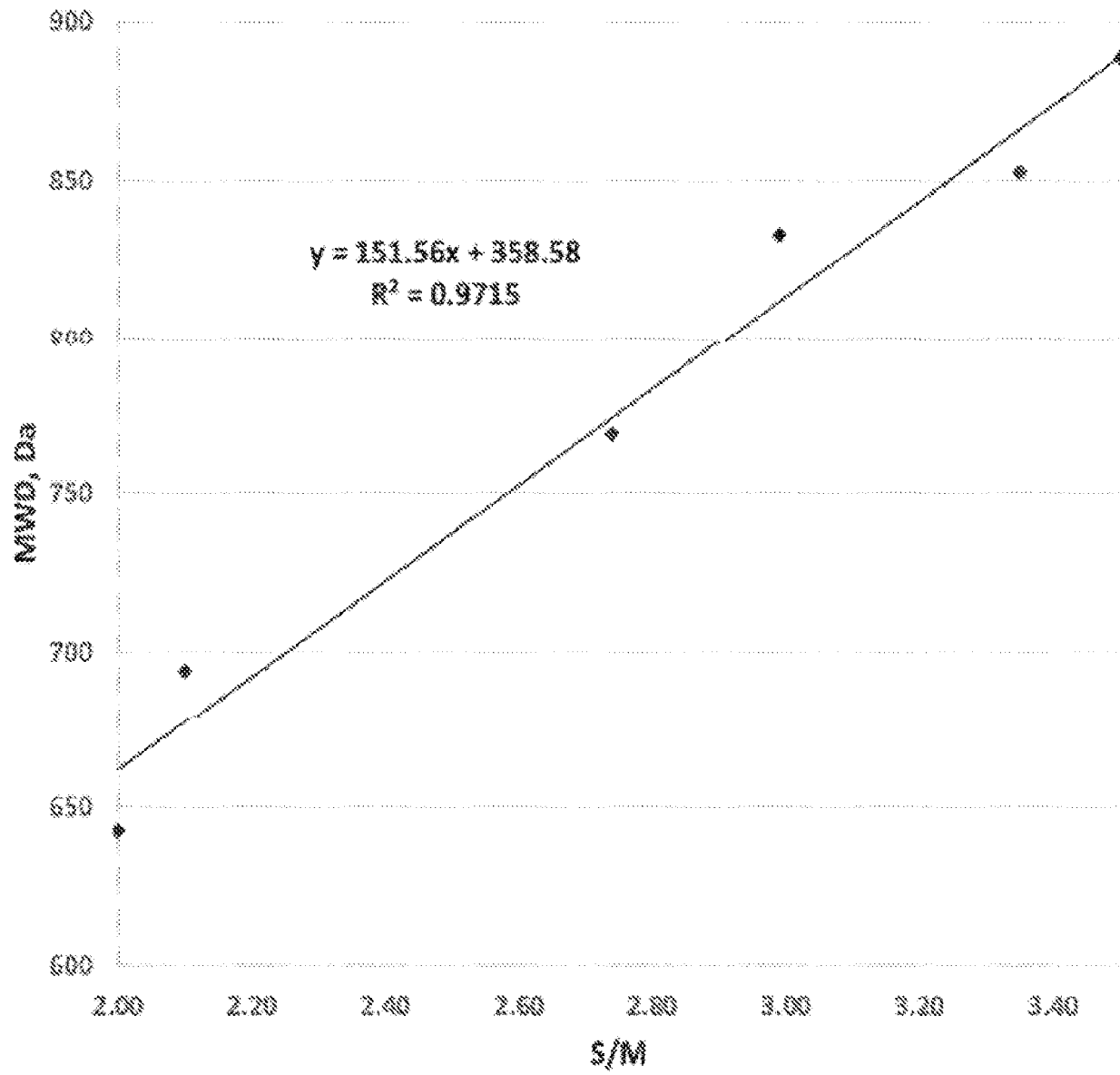
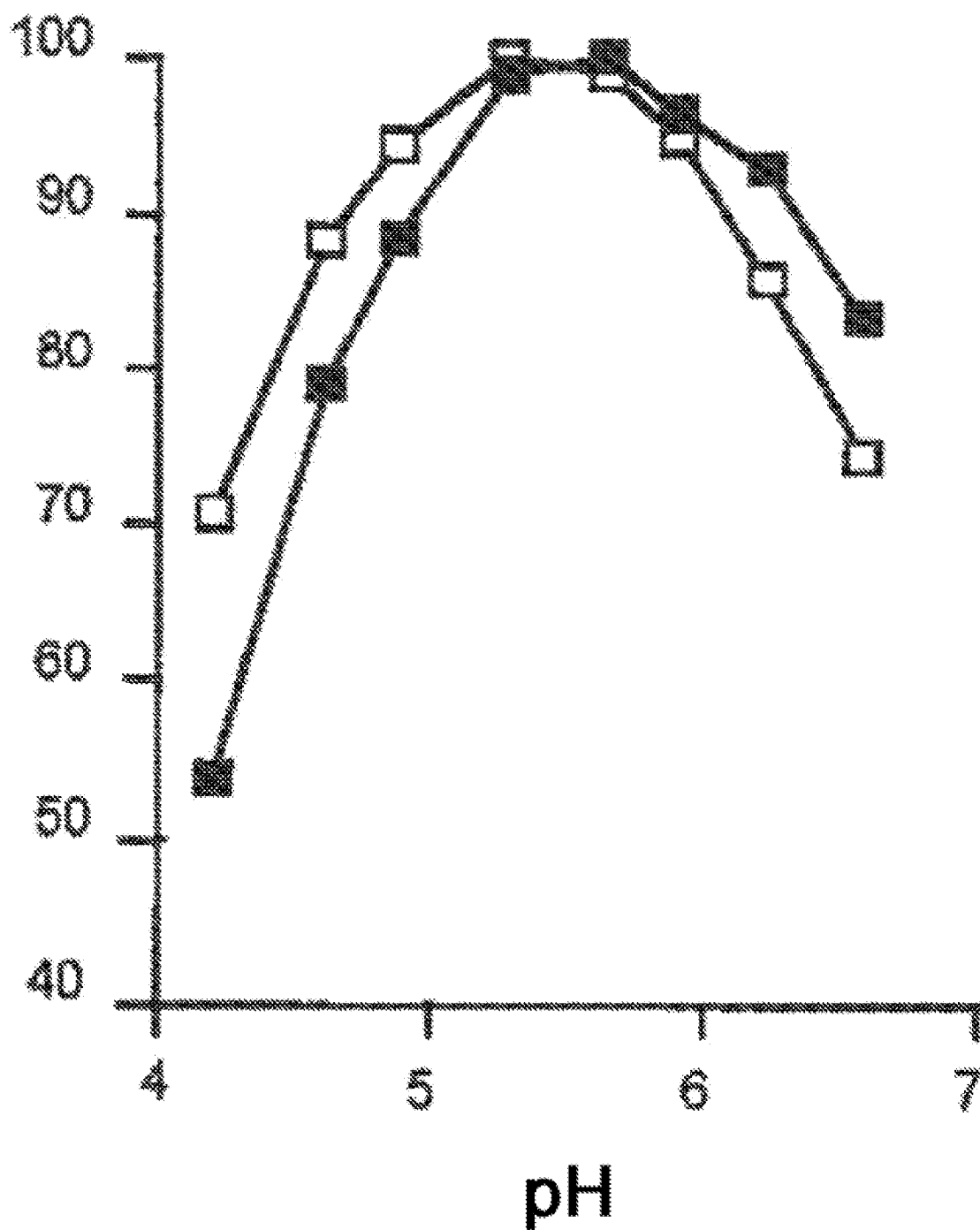
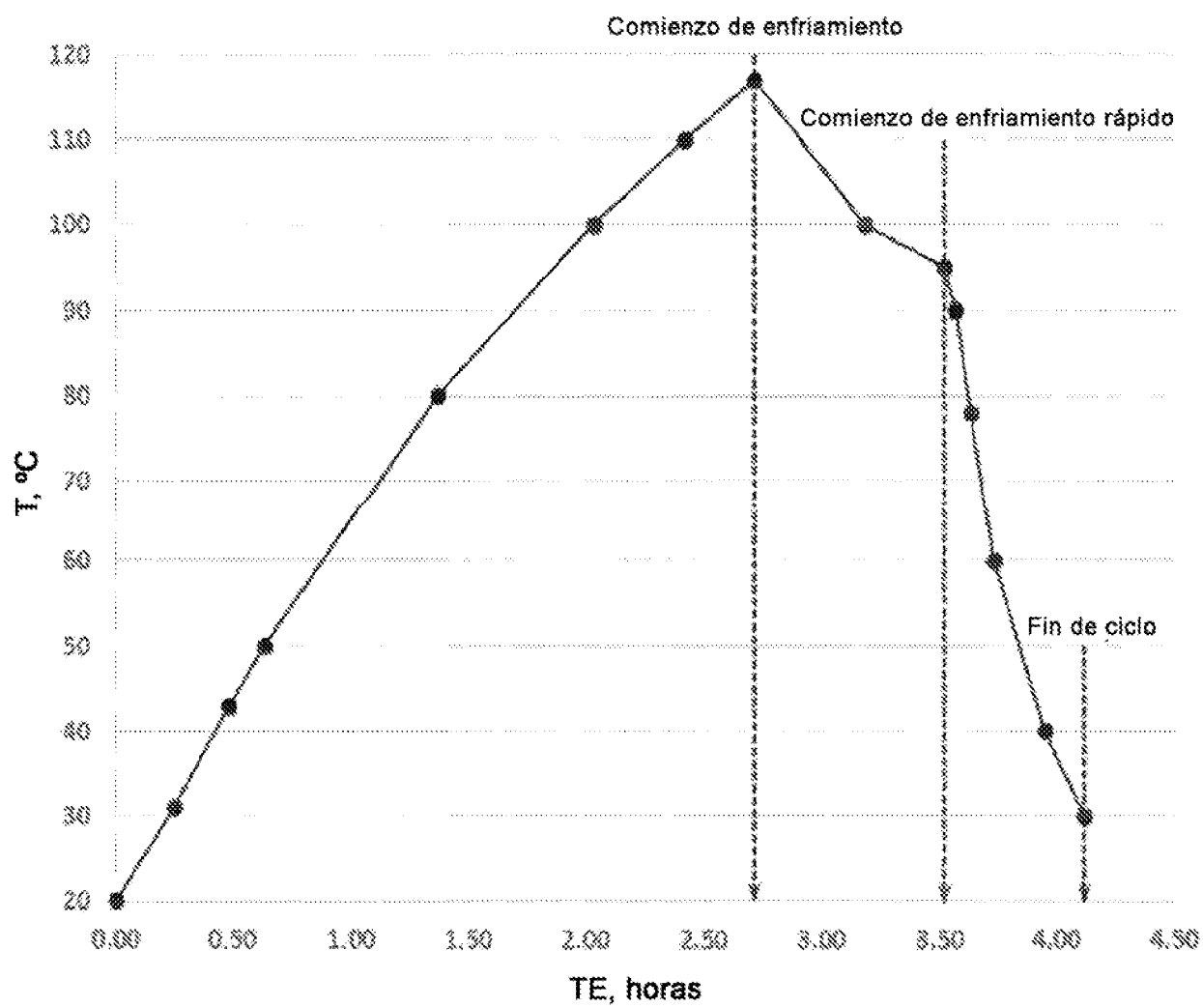


FIG. 6

Actividad (%)**FIG. 7**

**FIG. 8**

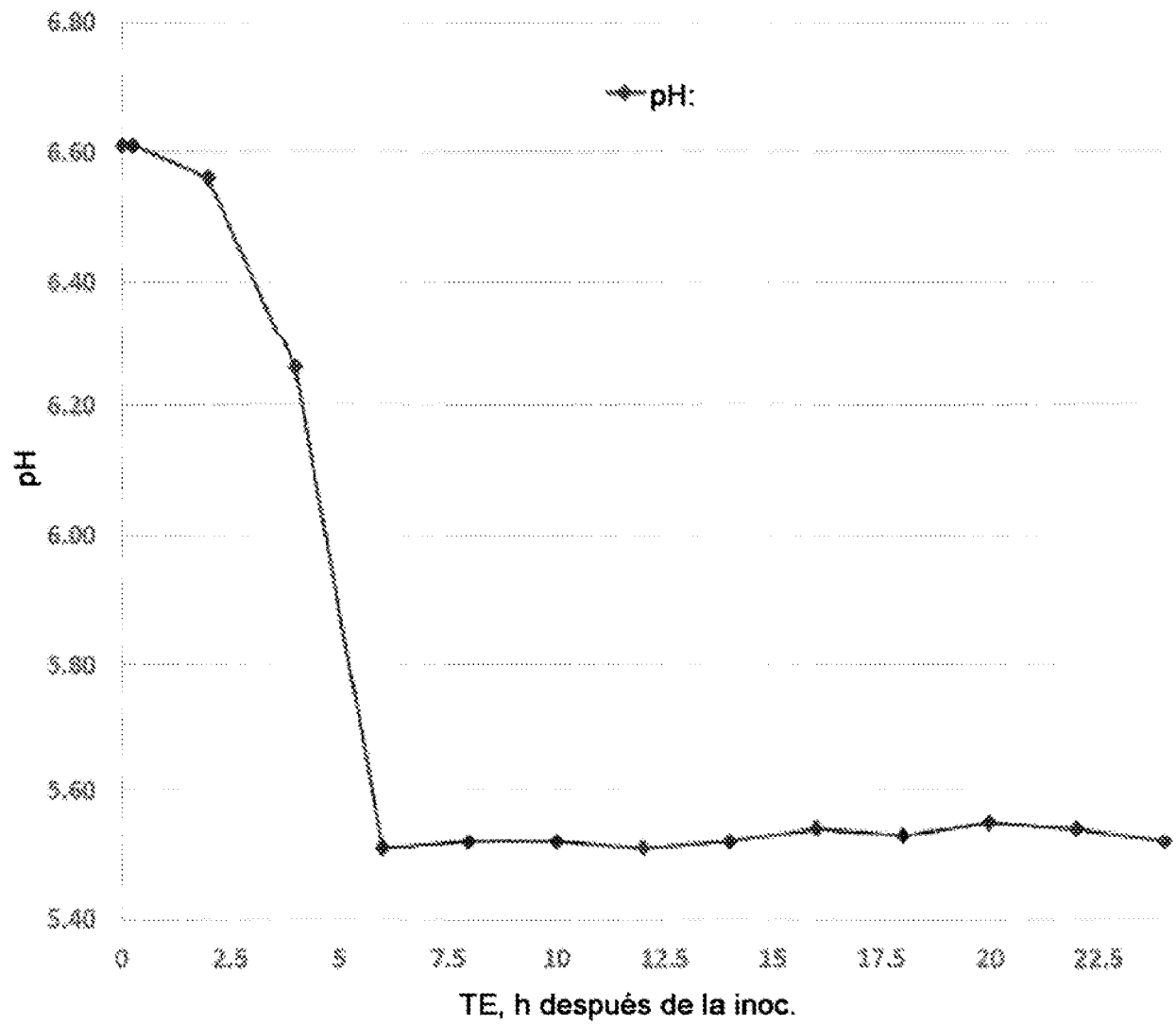


FIG. 9

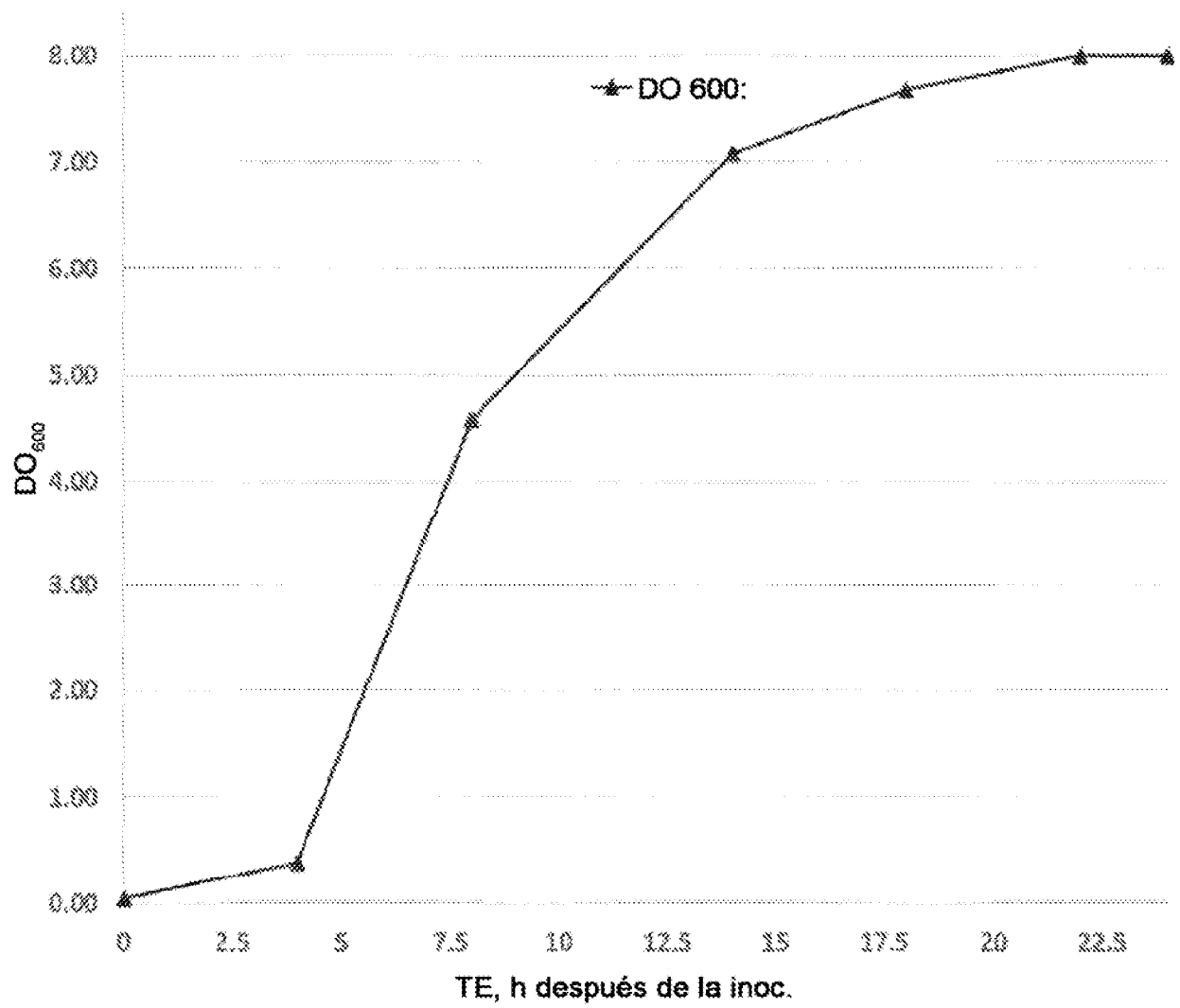


FIG. 10

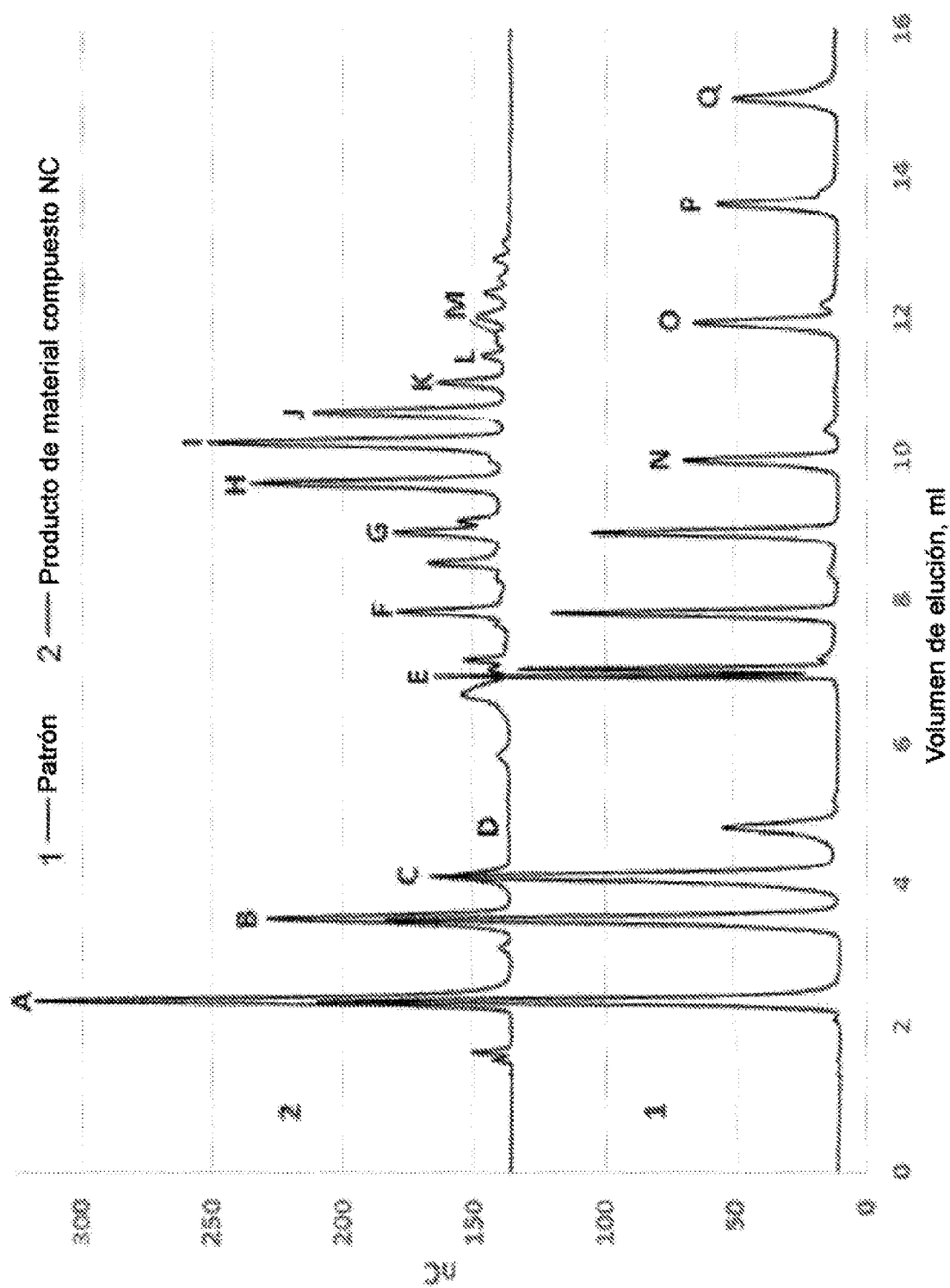


FIG. 11

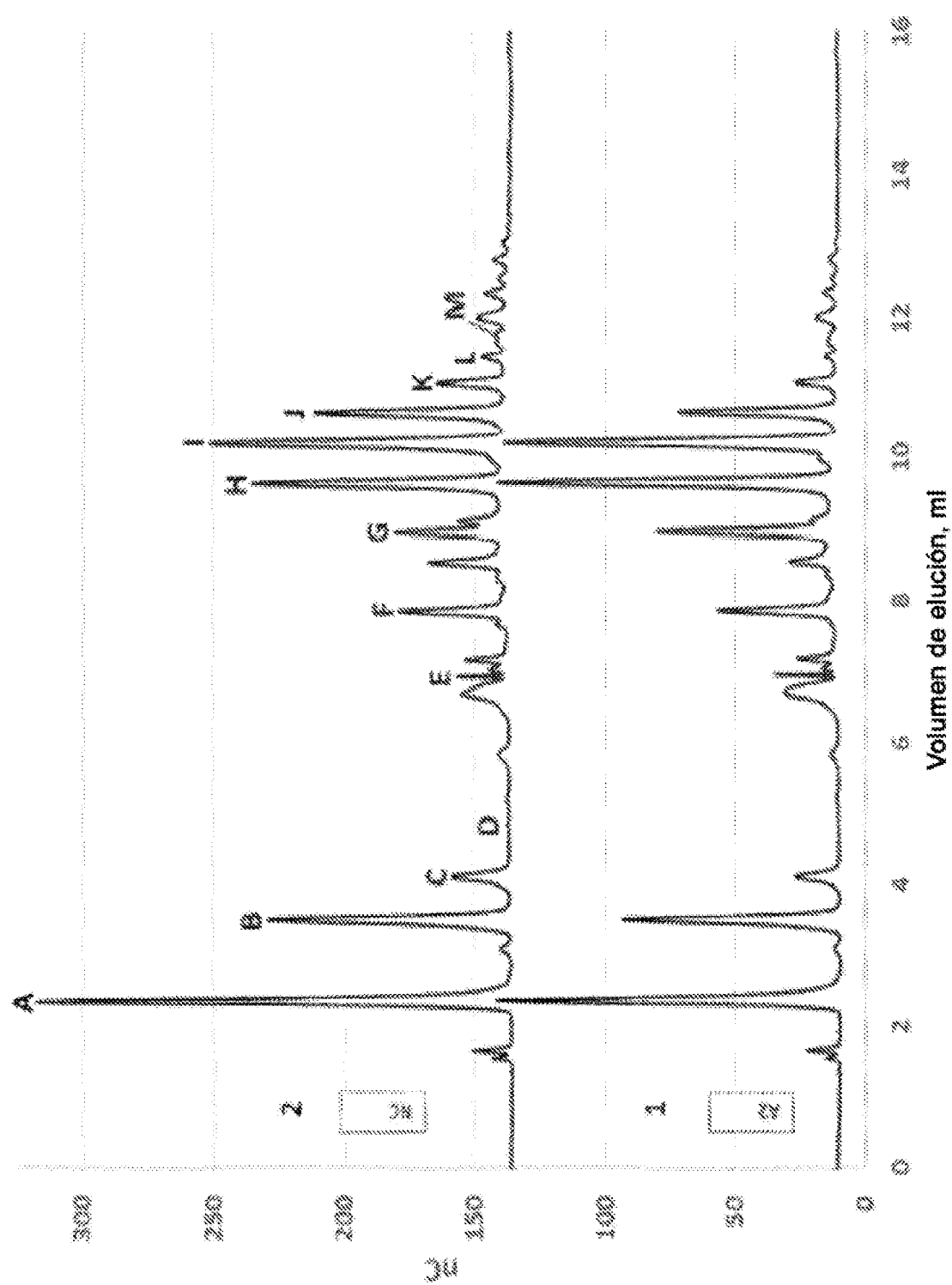


FIG. 12

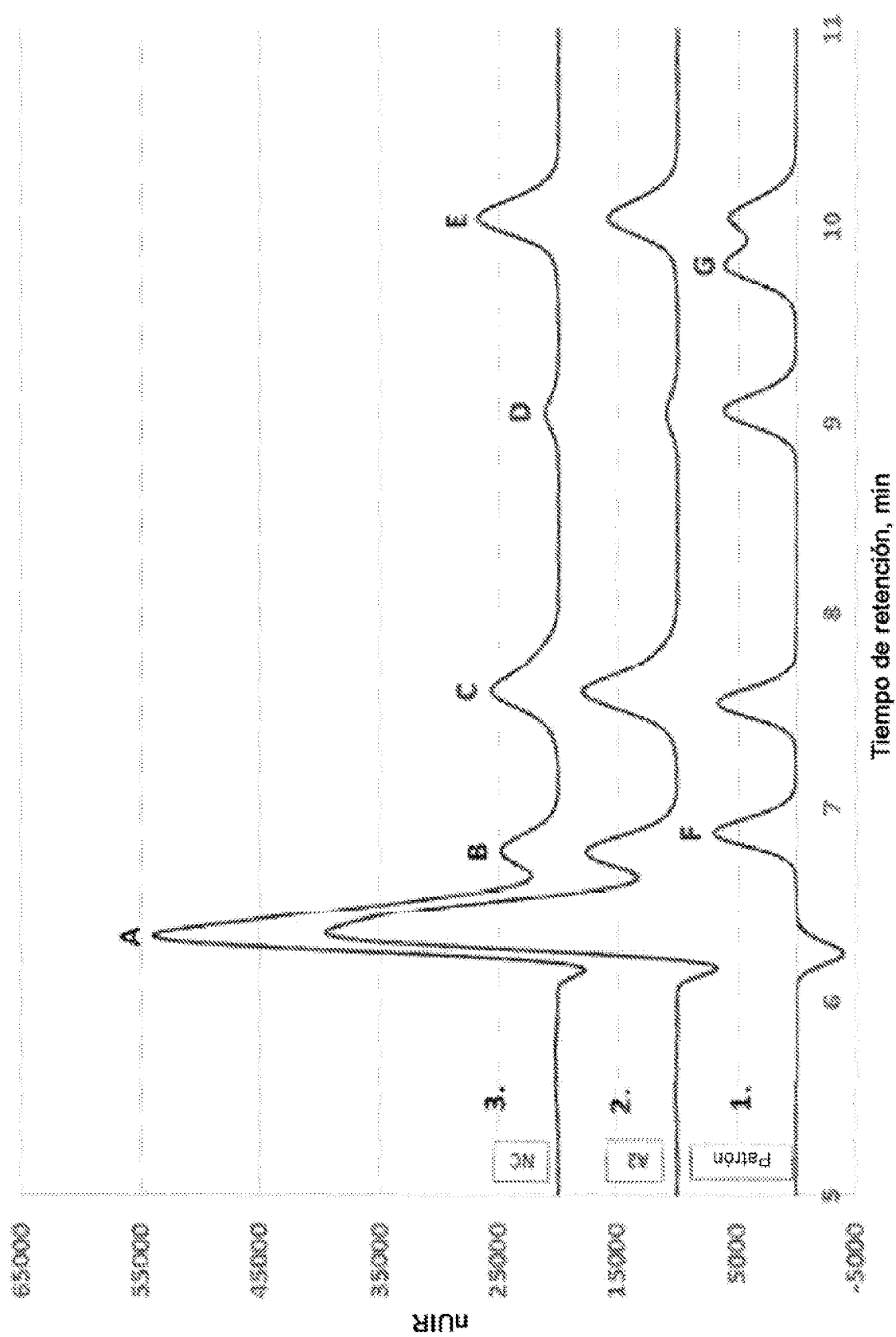


FIG. 13

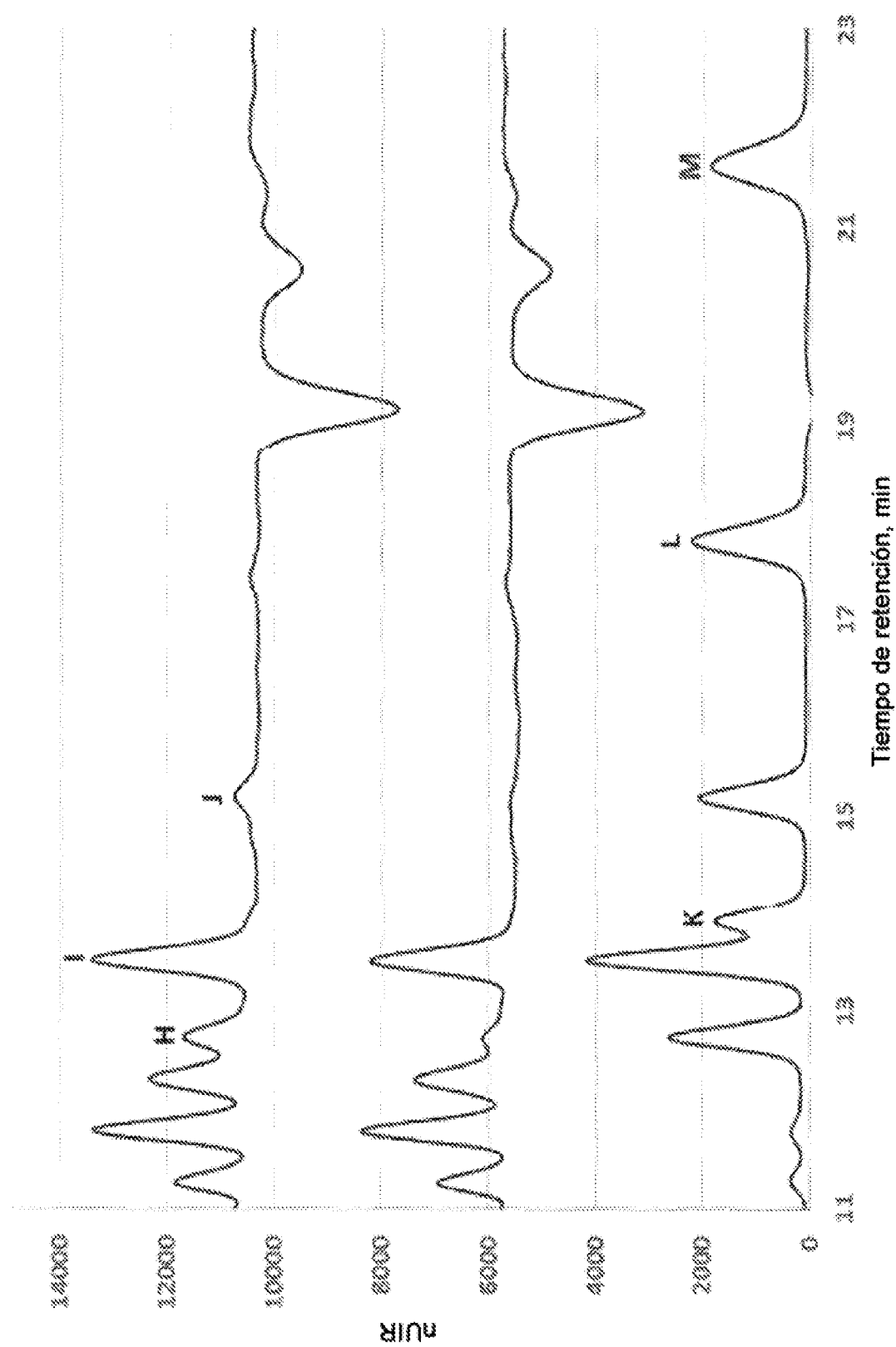


FIG. 14

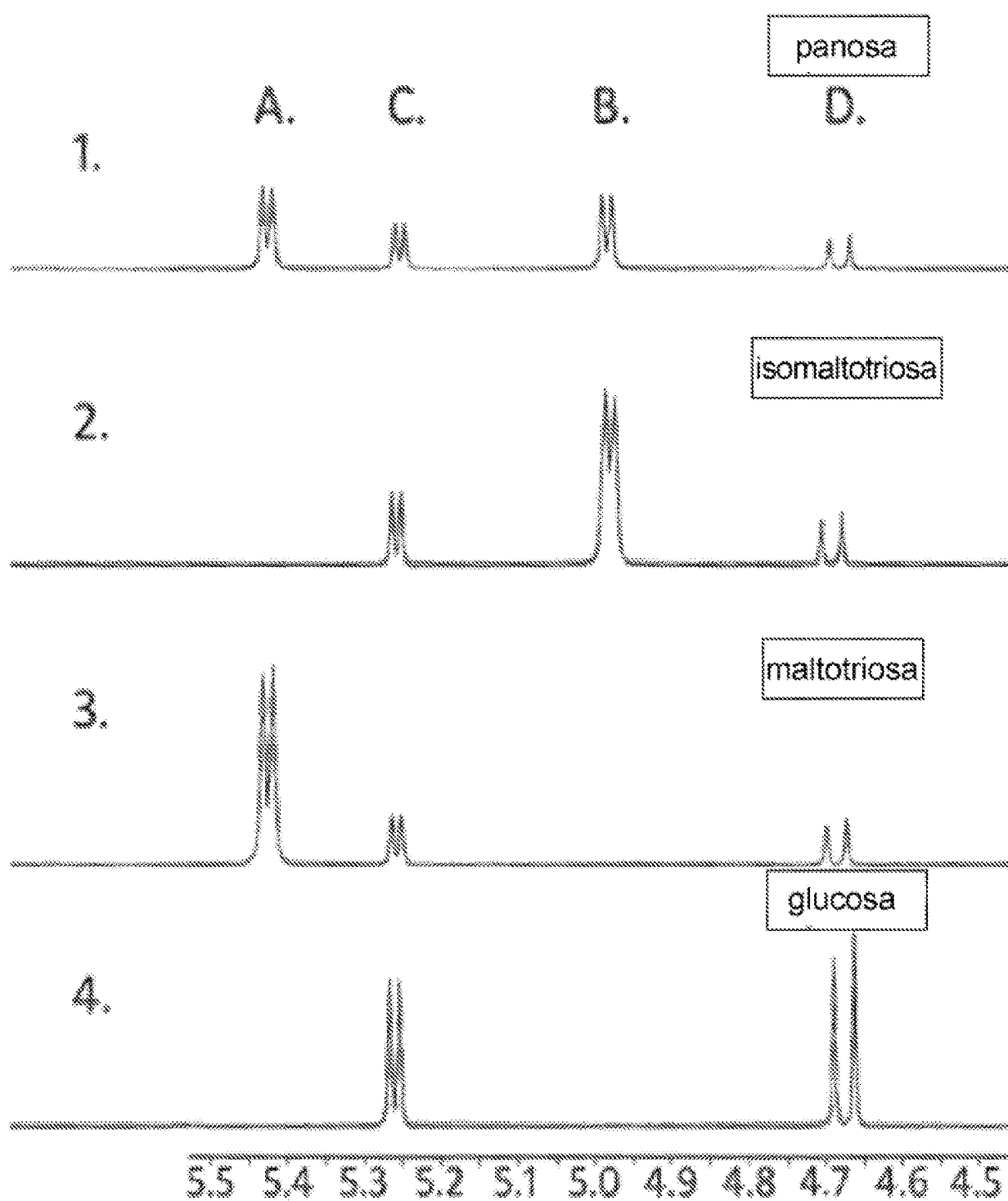


FIG. 15

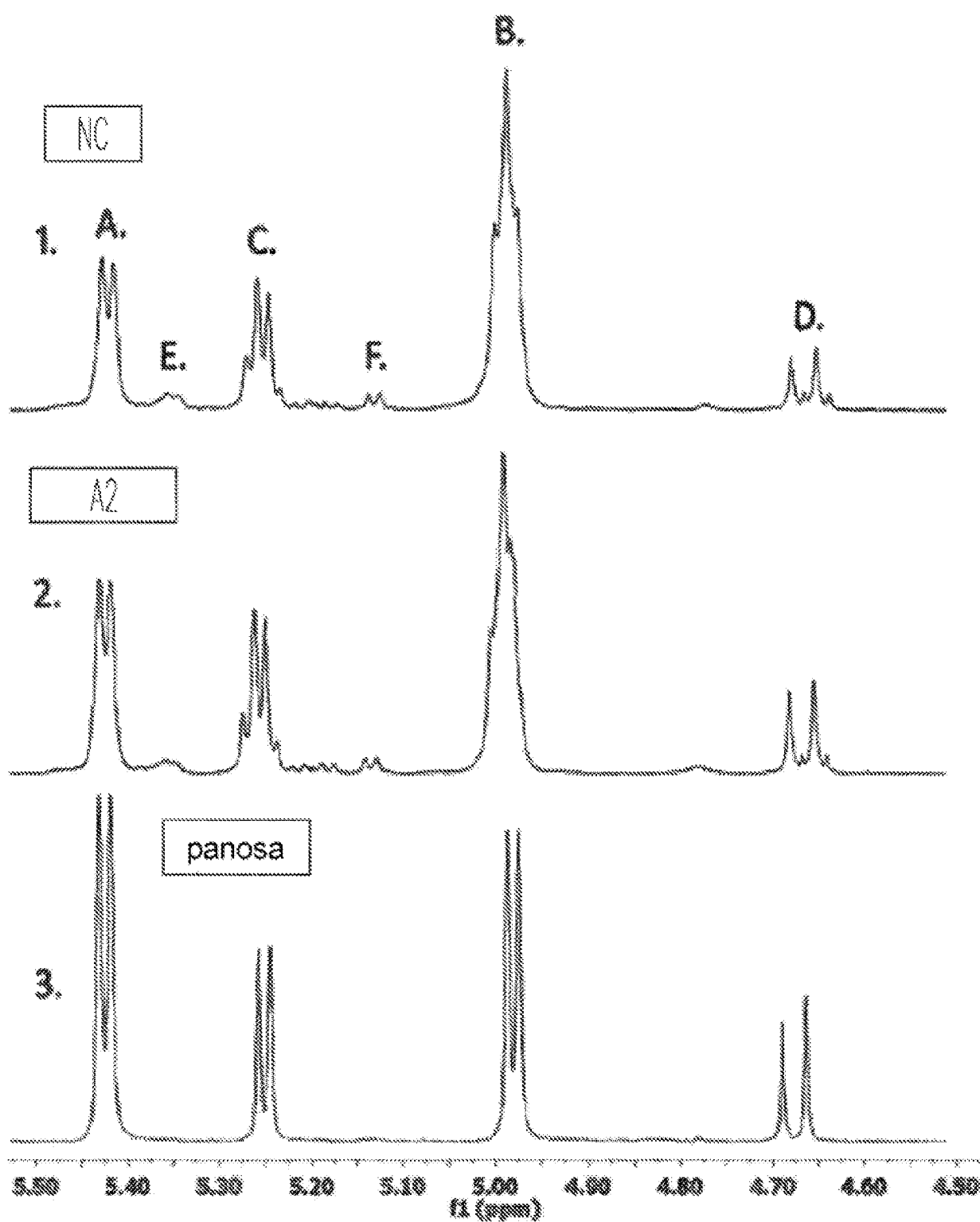


FIG. 16

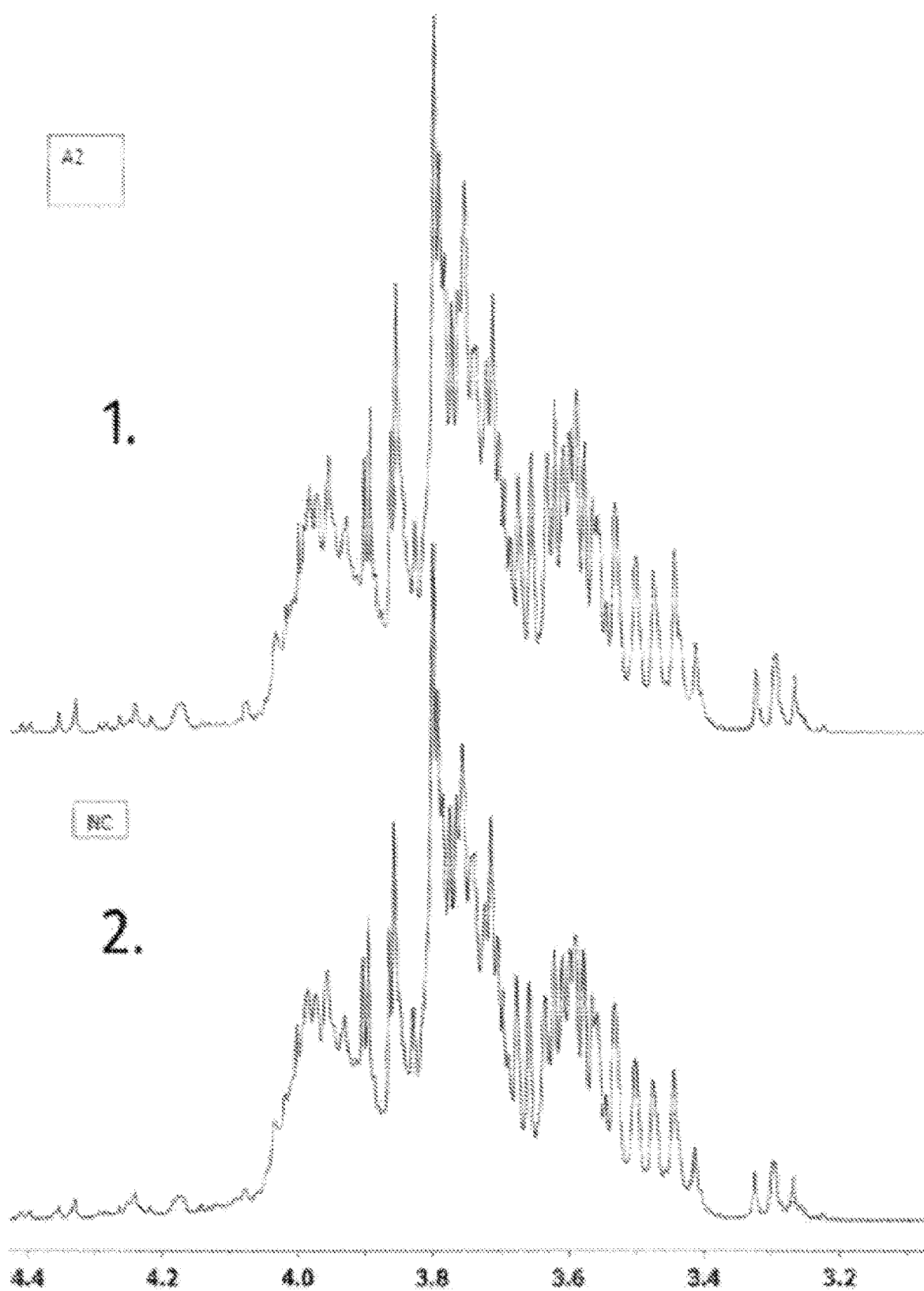


FIG. 17

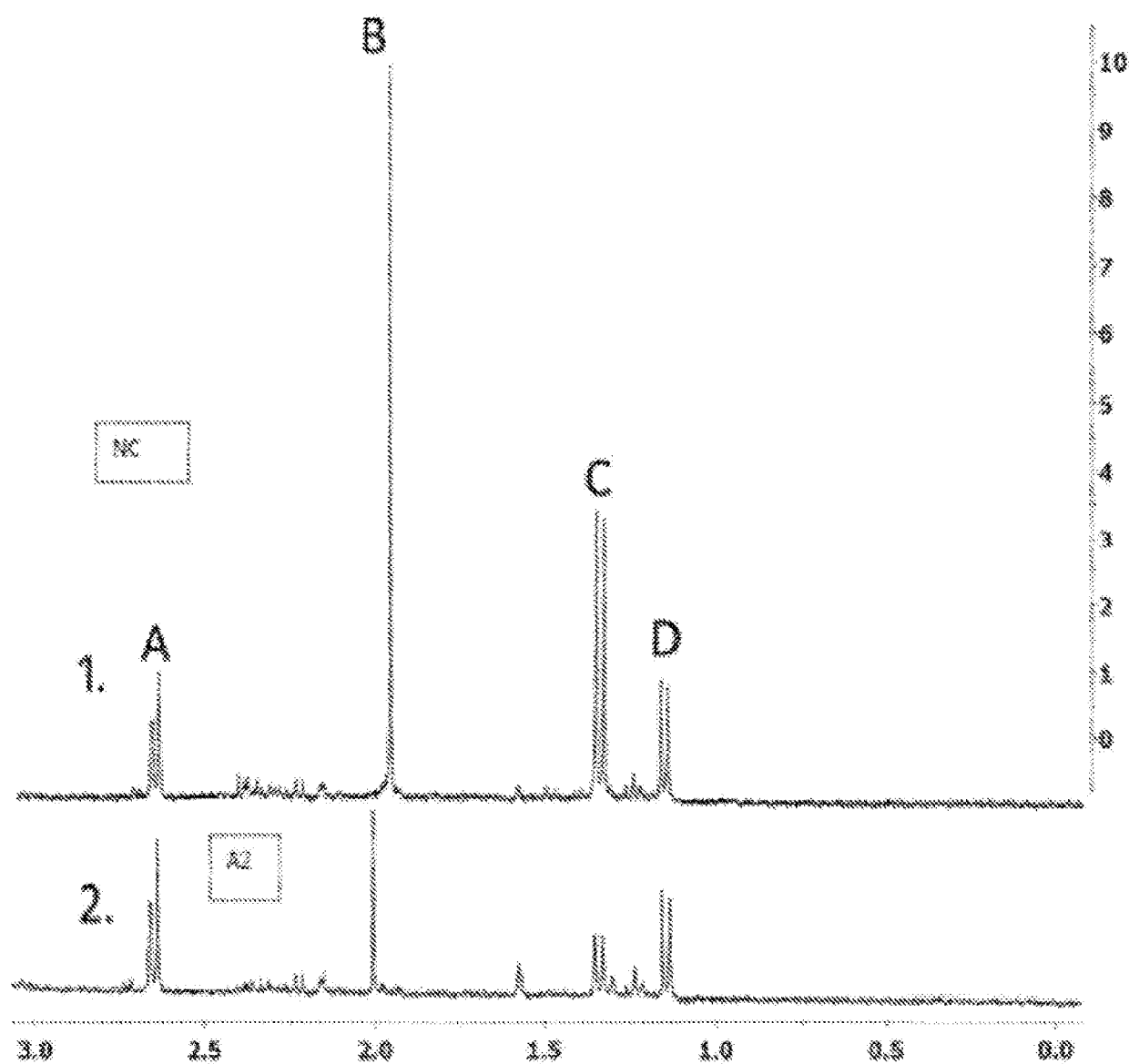


FIG. 18

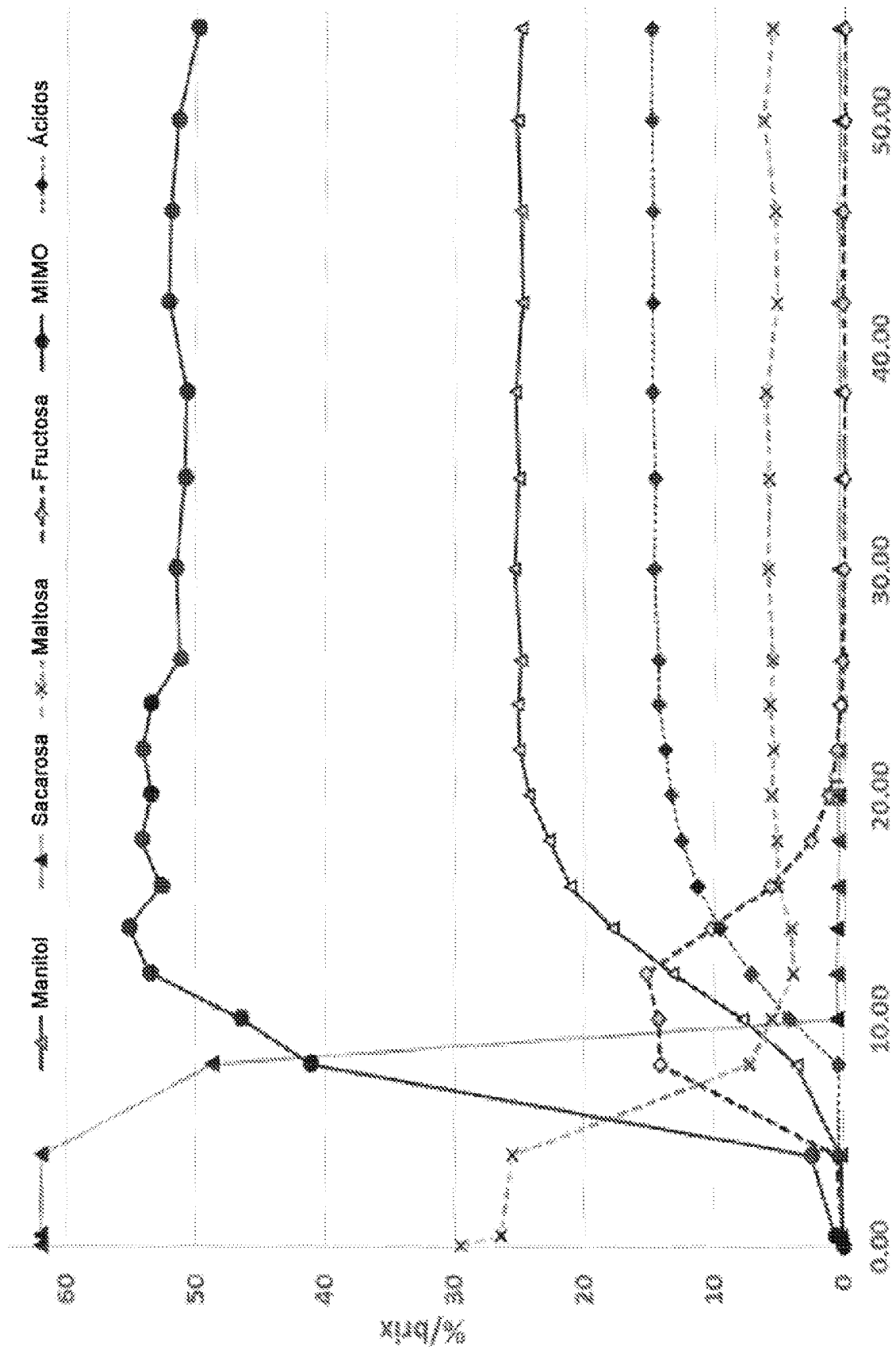


FIG. 19

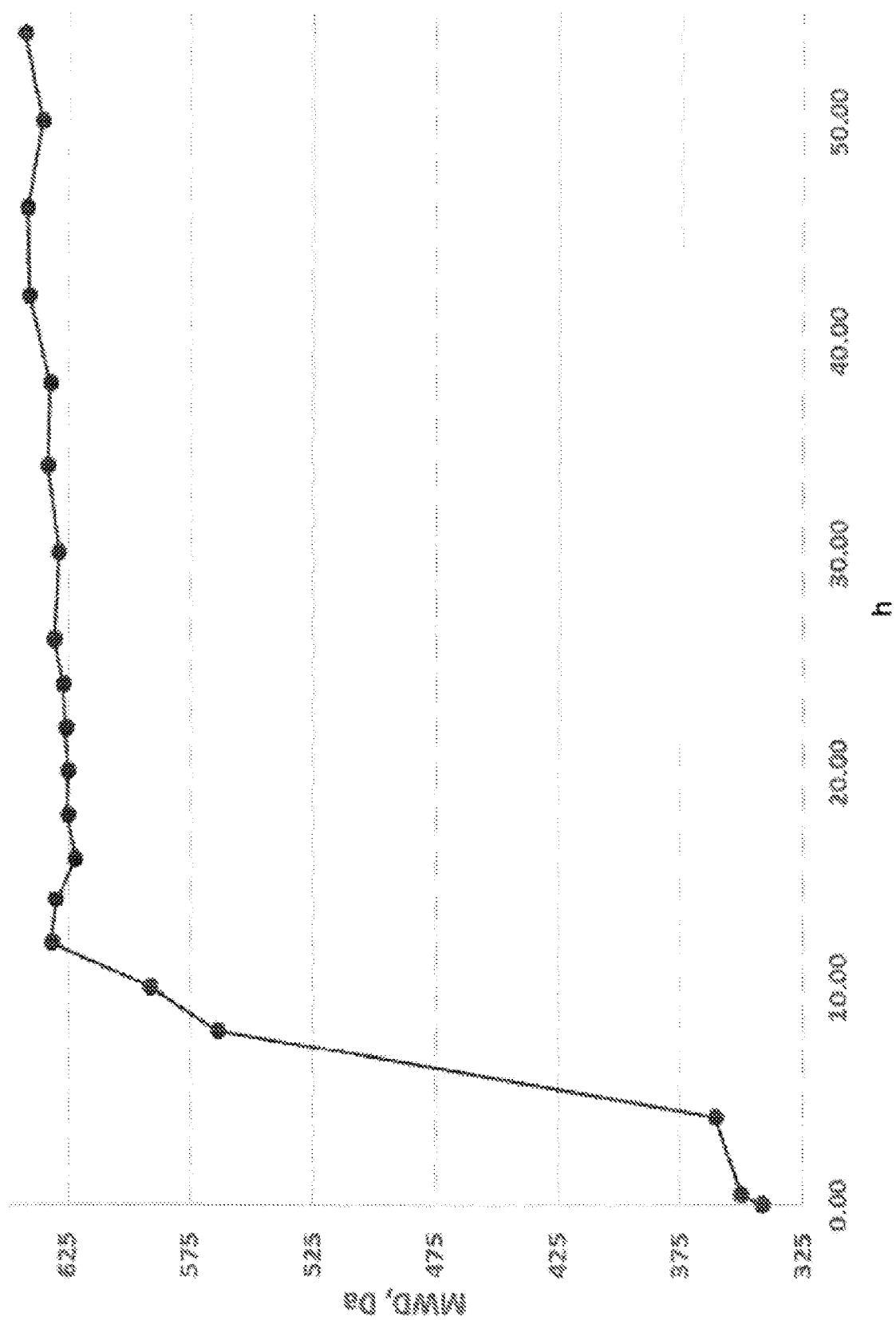


FIG. 20

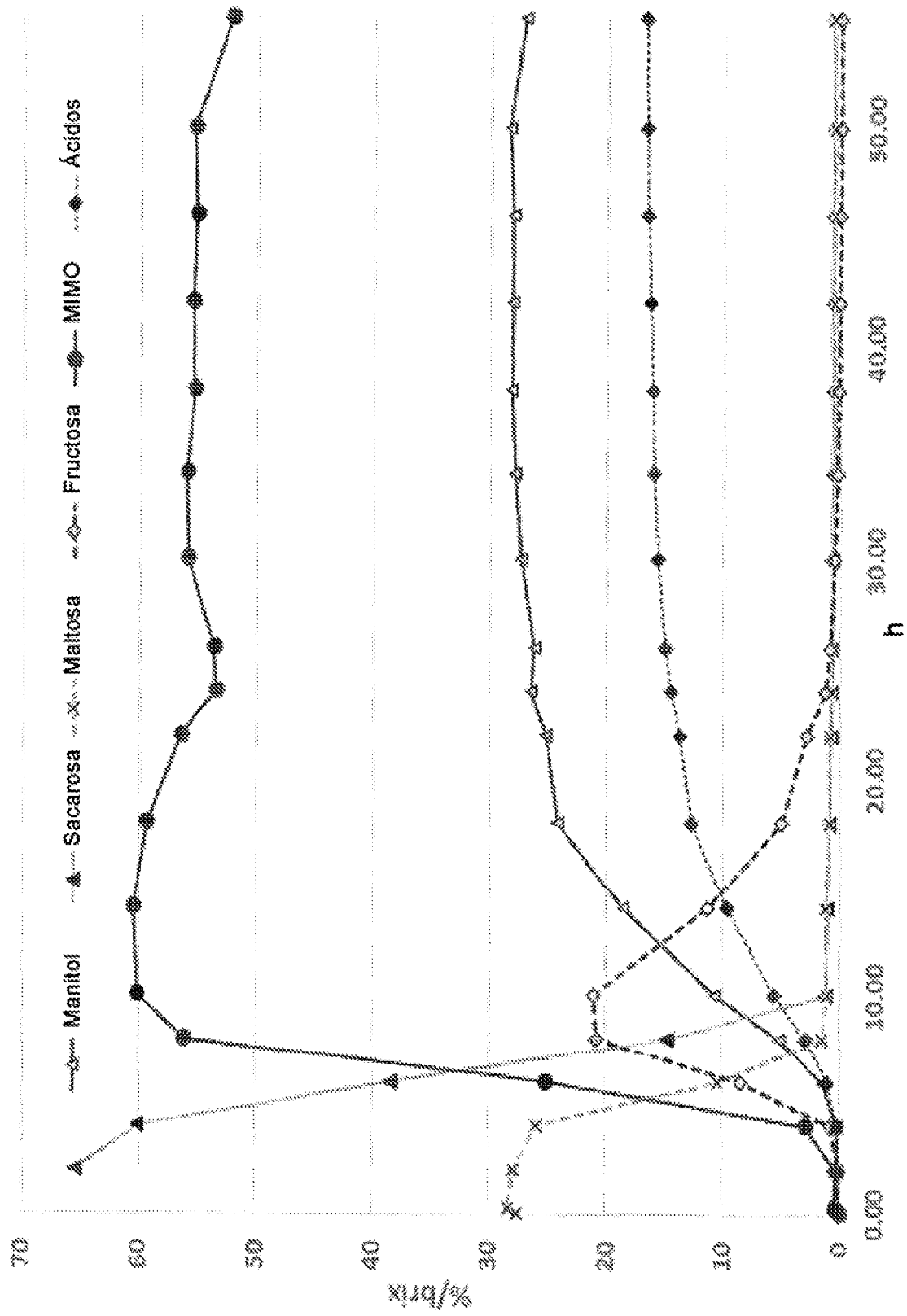


FIG. 21

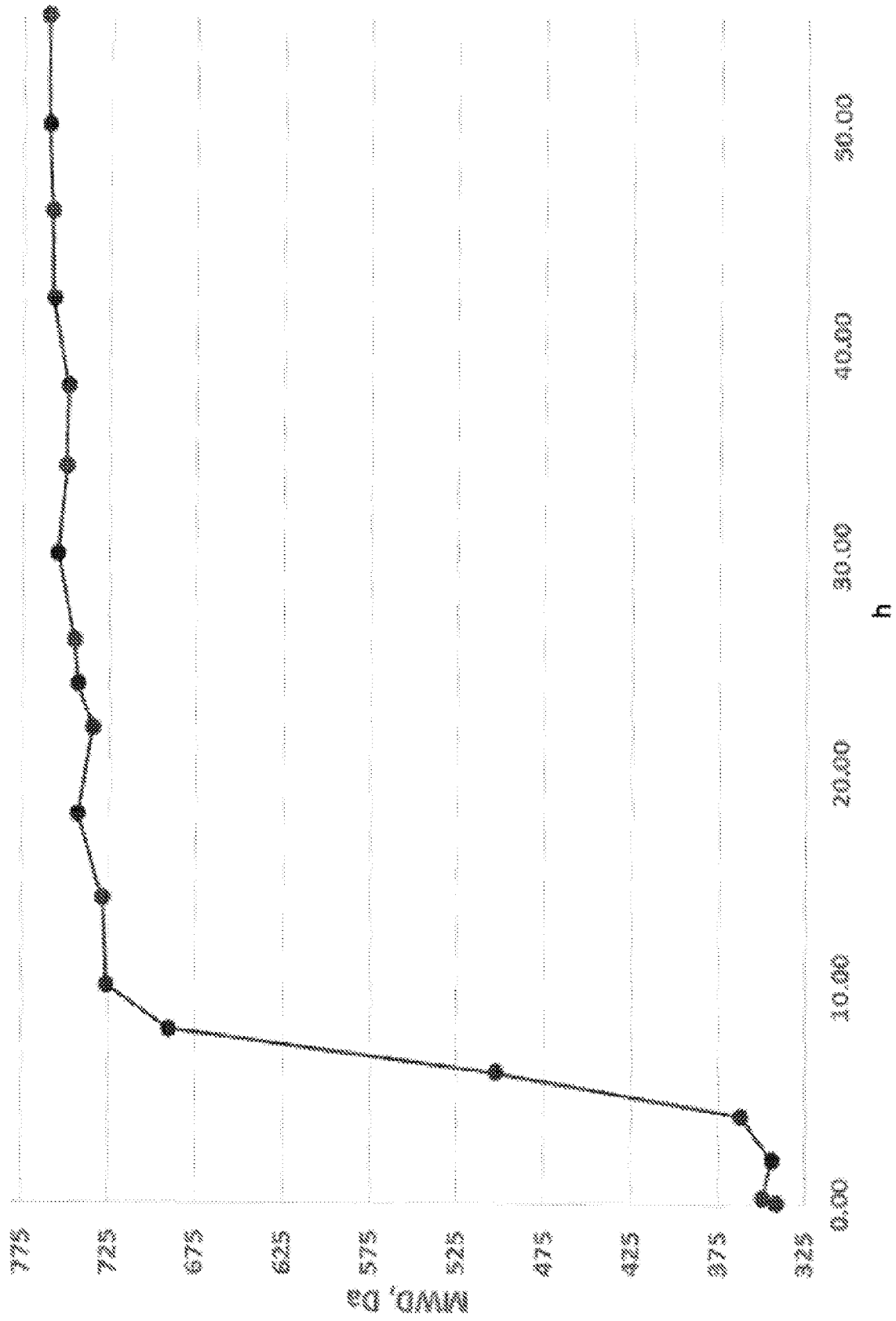


FIG. 22

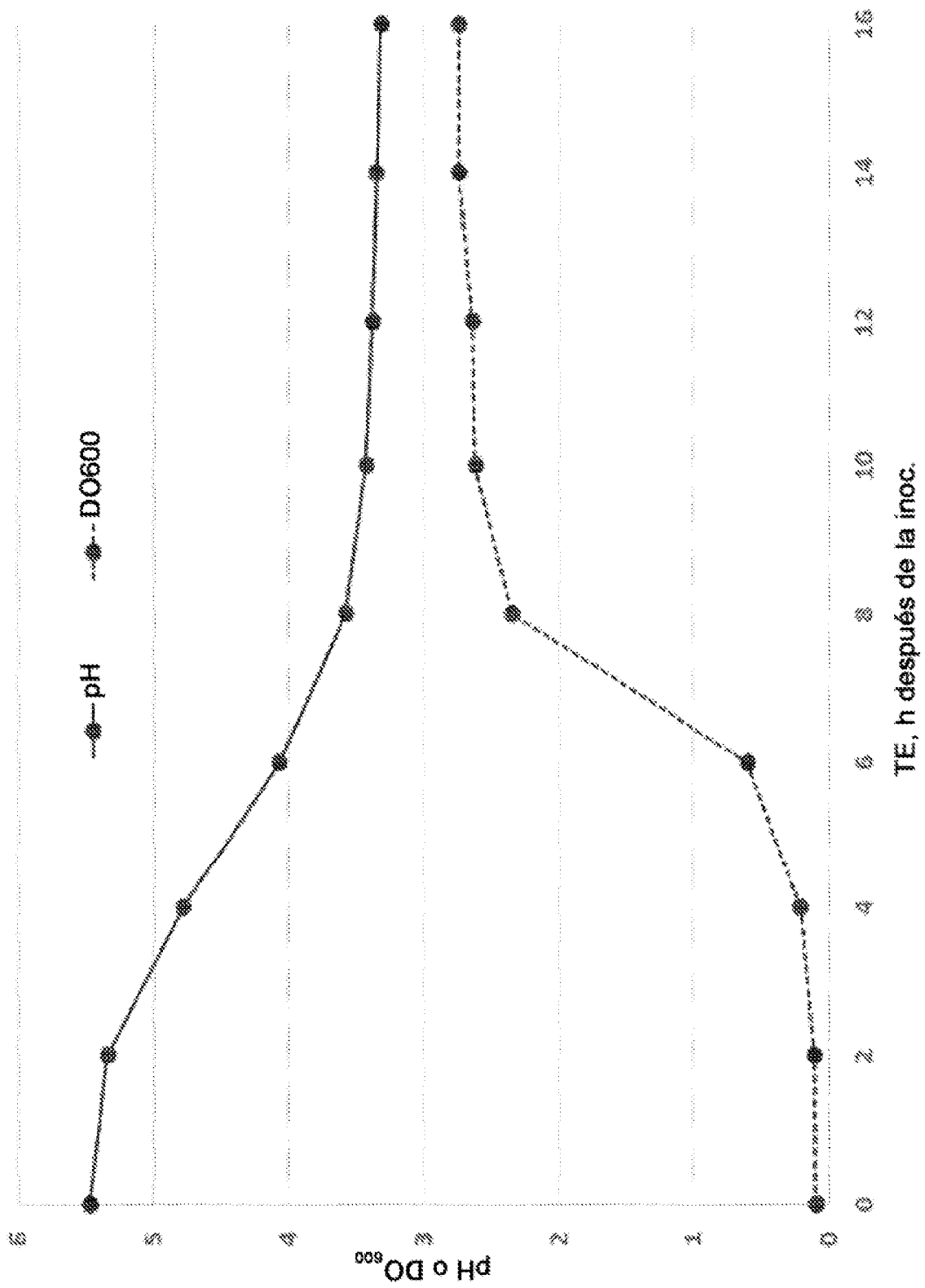
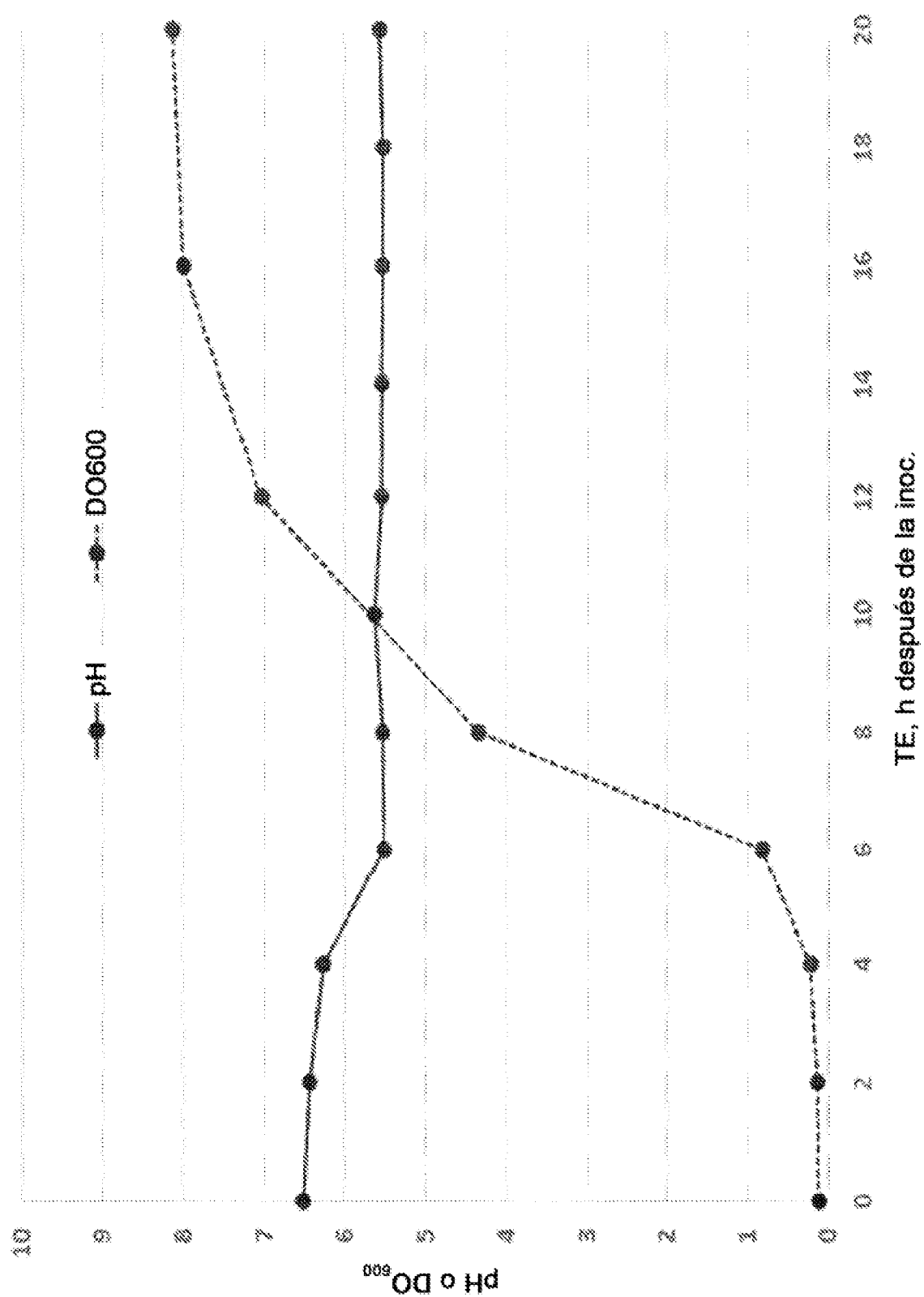


FIG. 23

**FIG. 24**

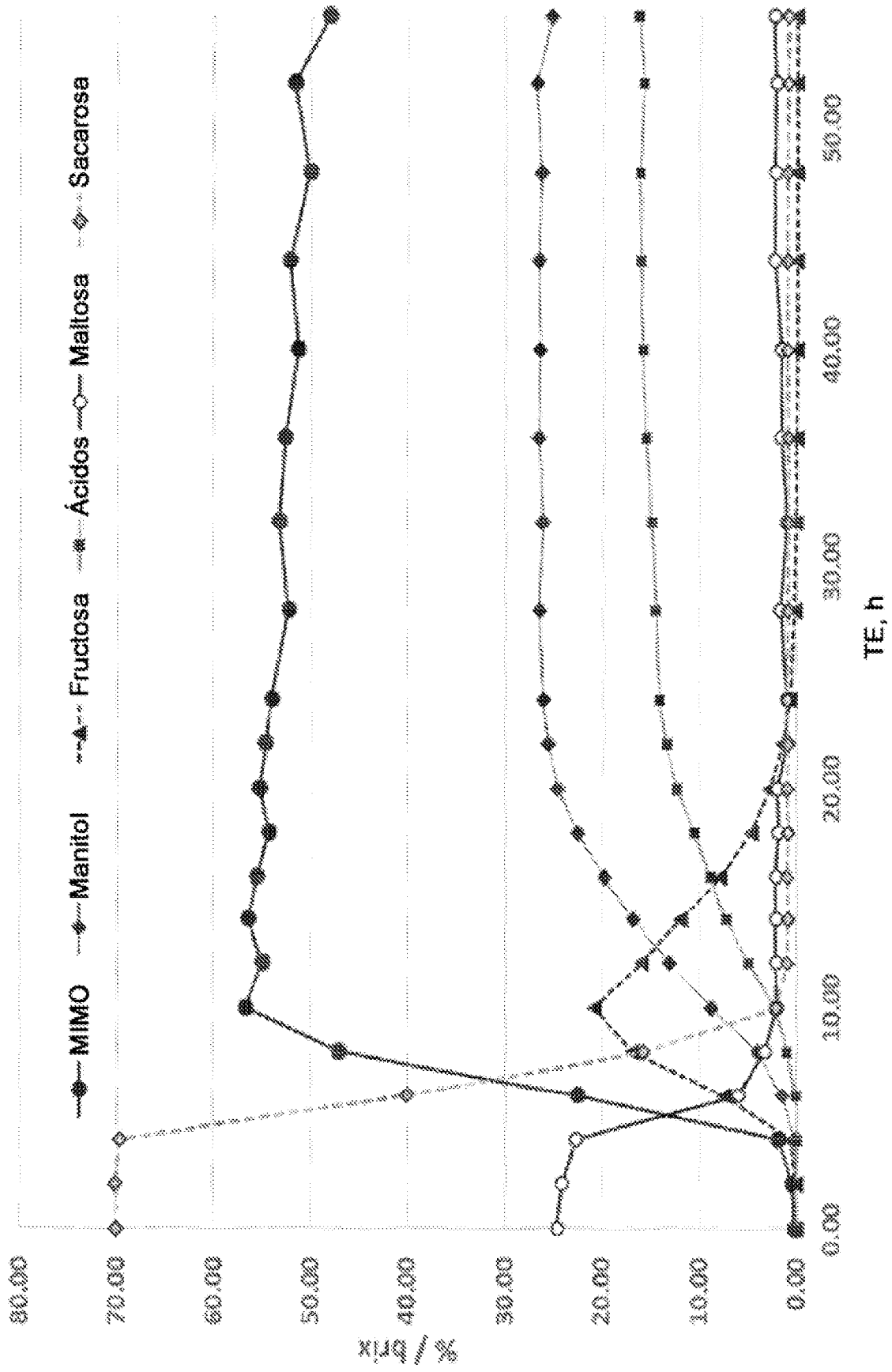


FIG. 25

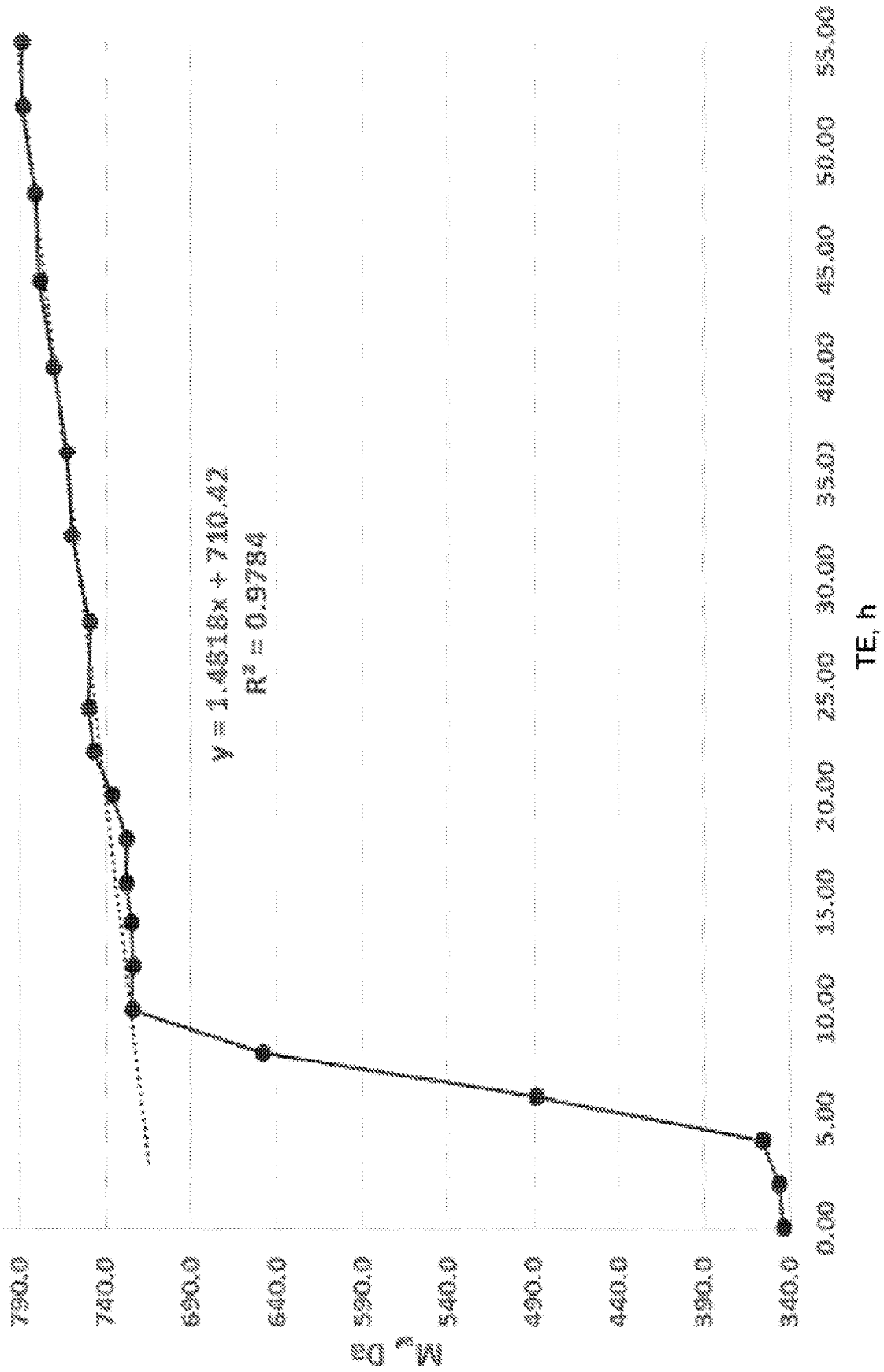


FIG. 26

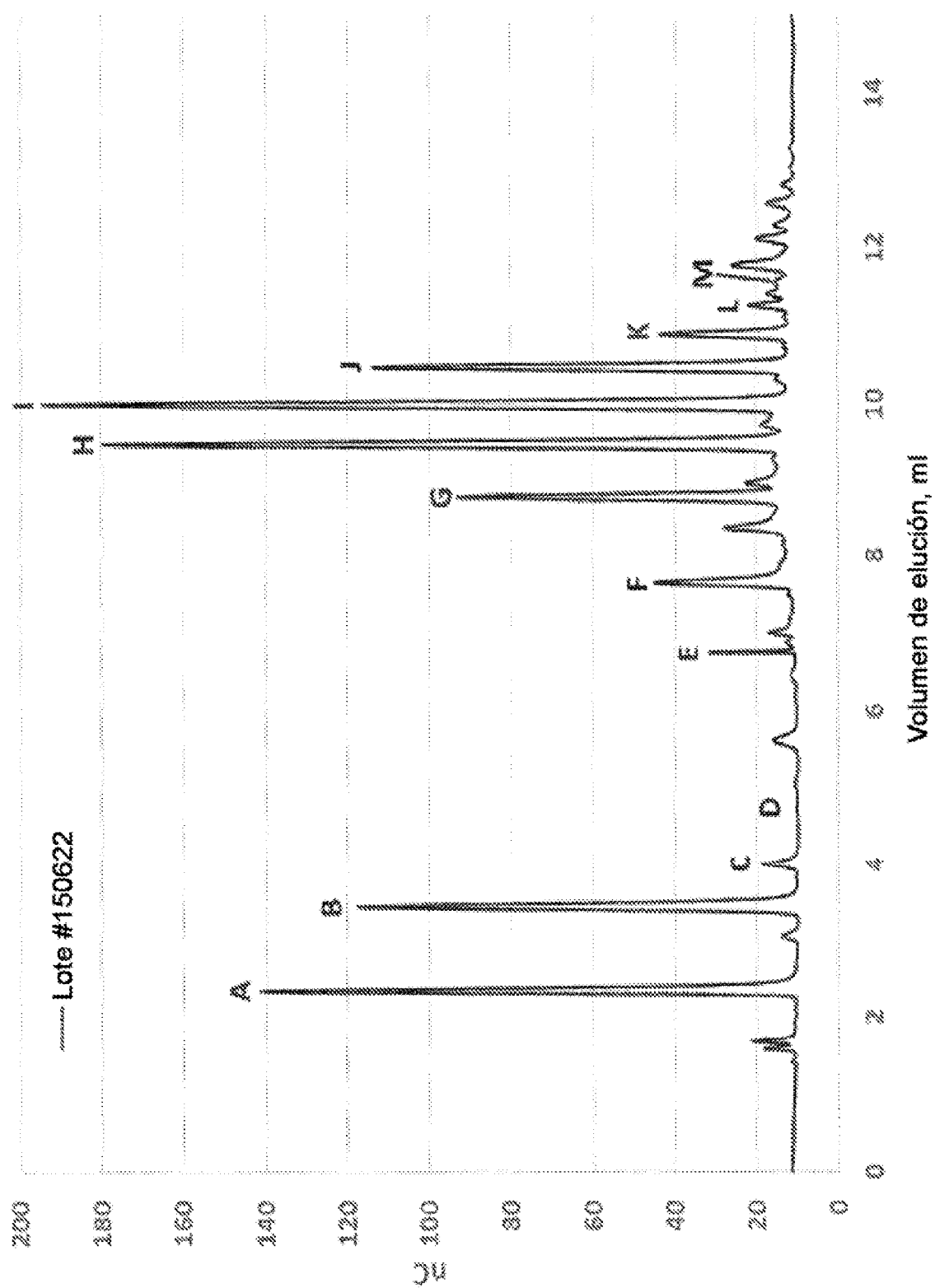


FIG. 27

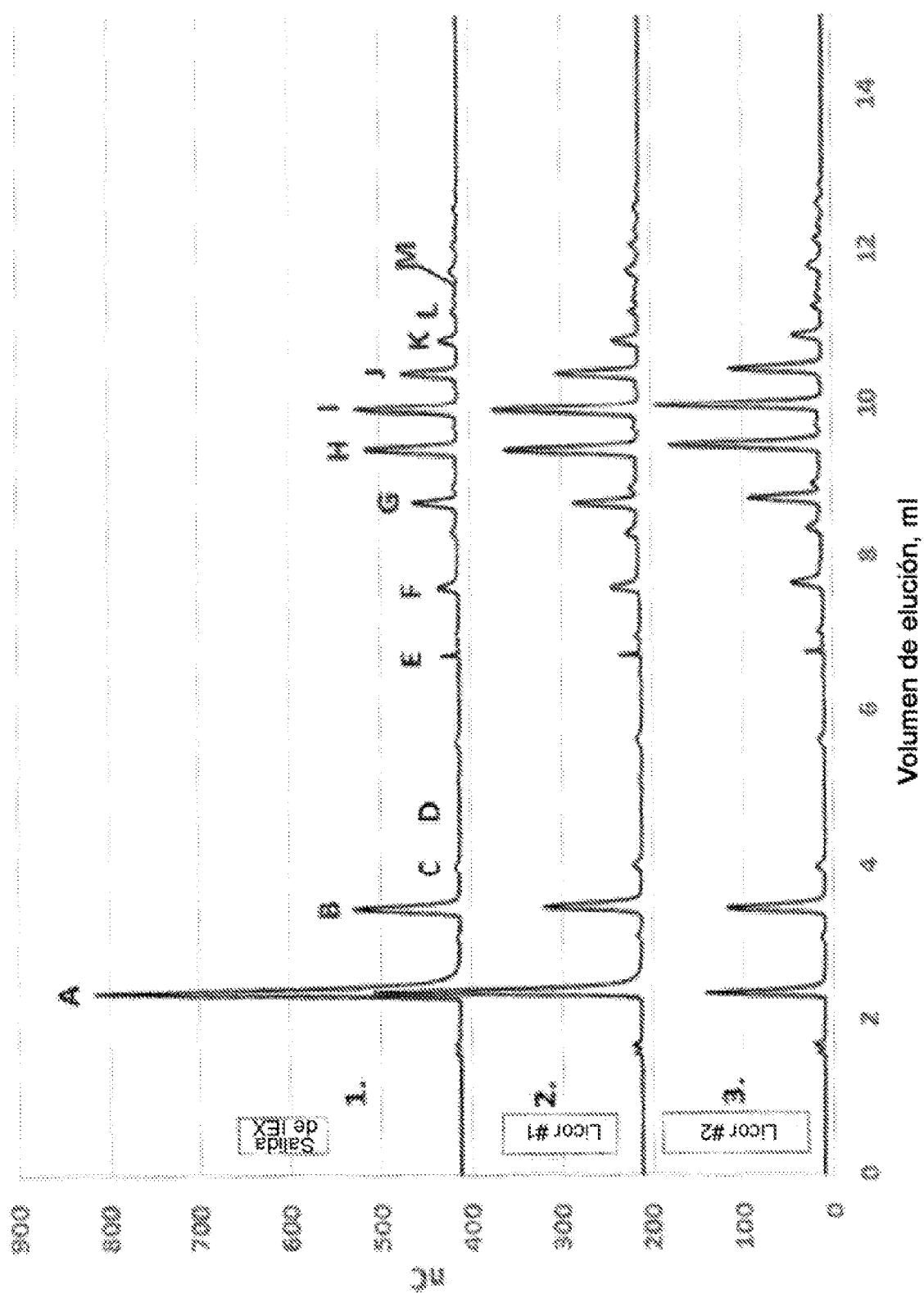


FIG. 28

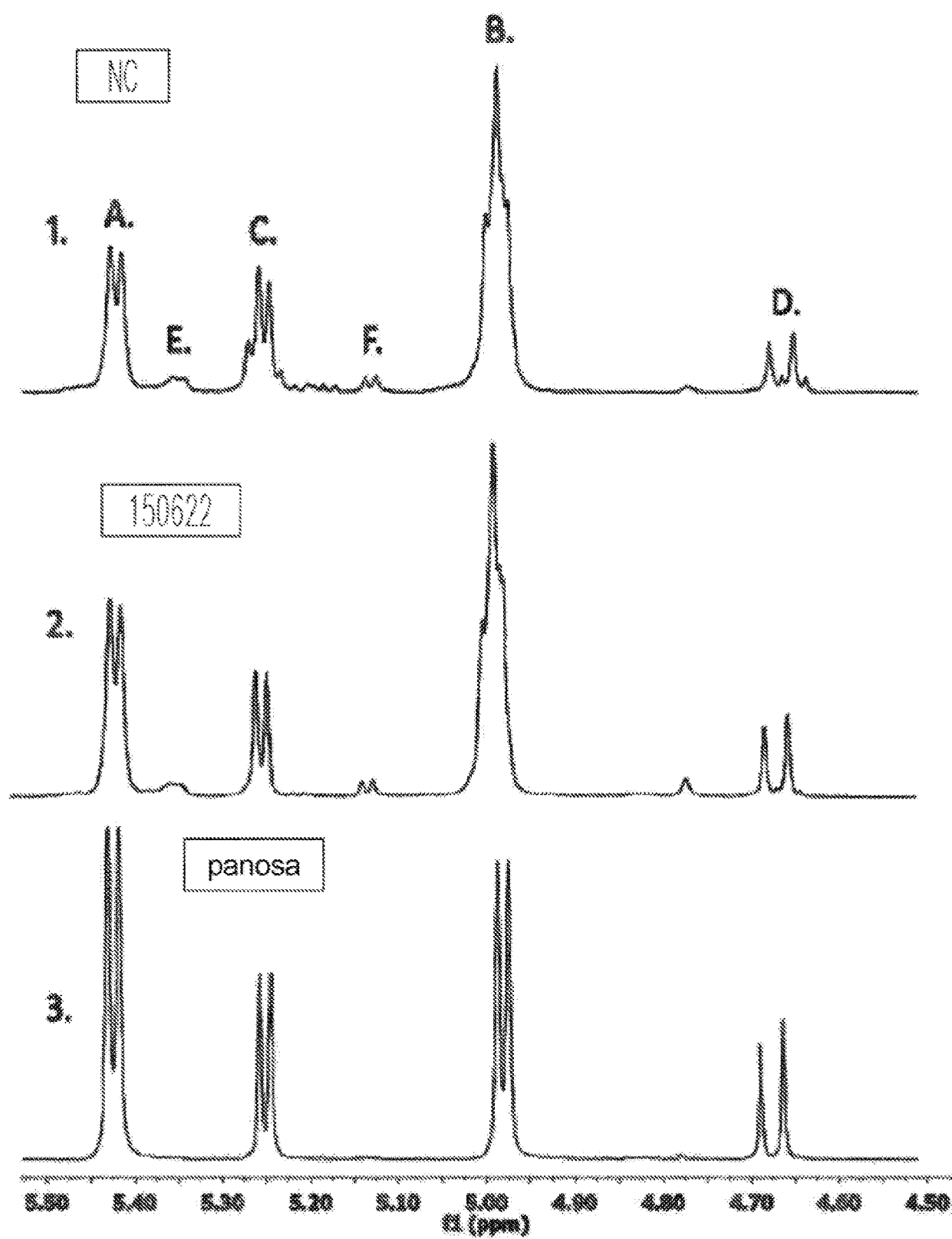


FIG. 29

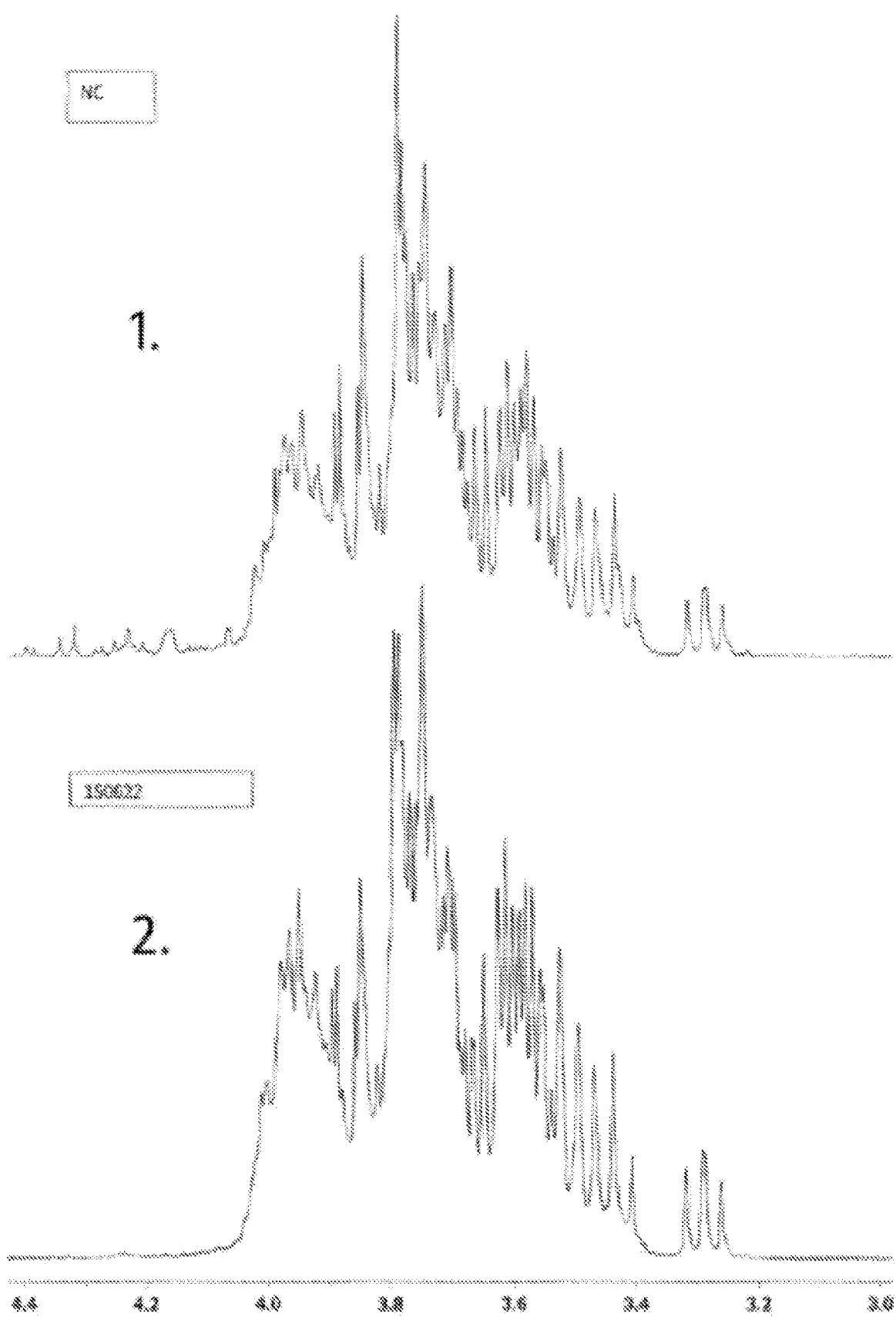


FIG. 30

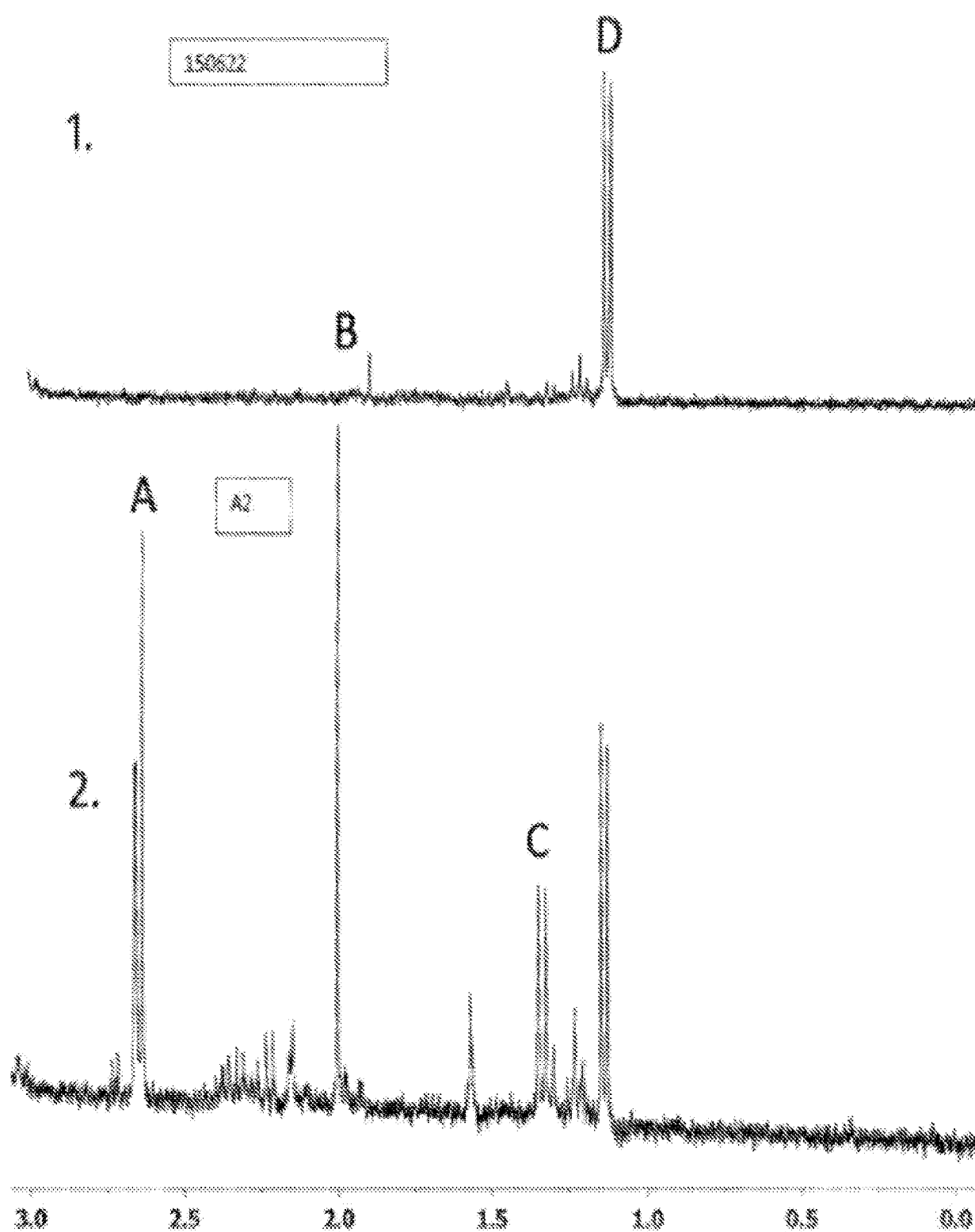


FIG. 31

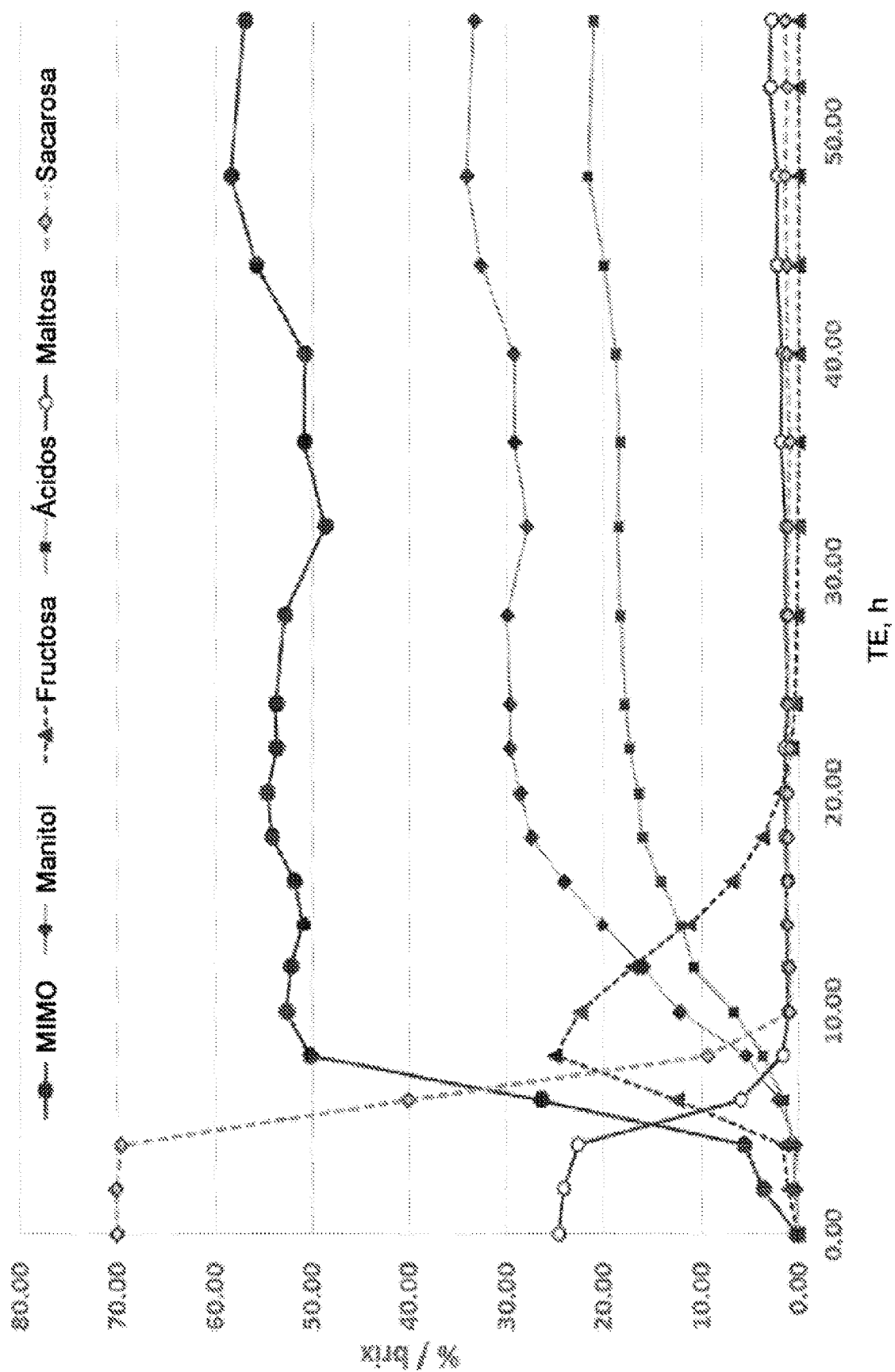


FIG. 32

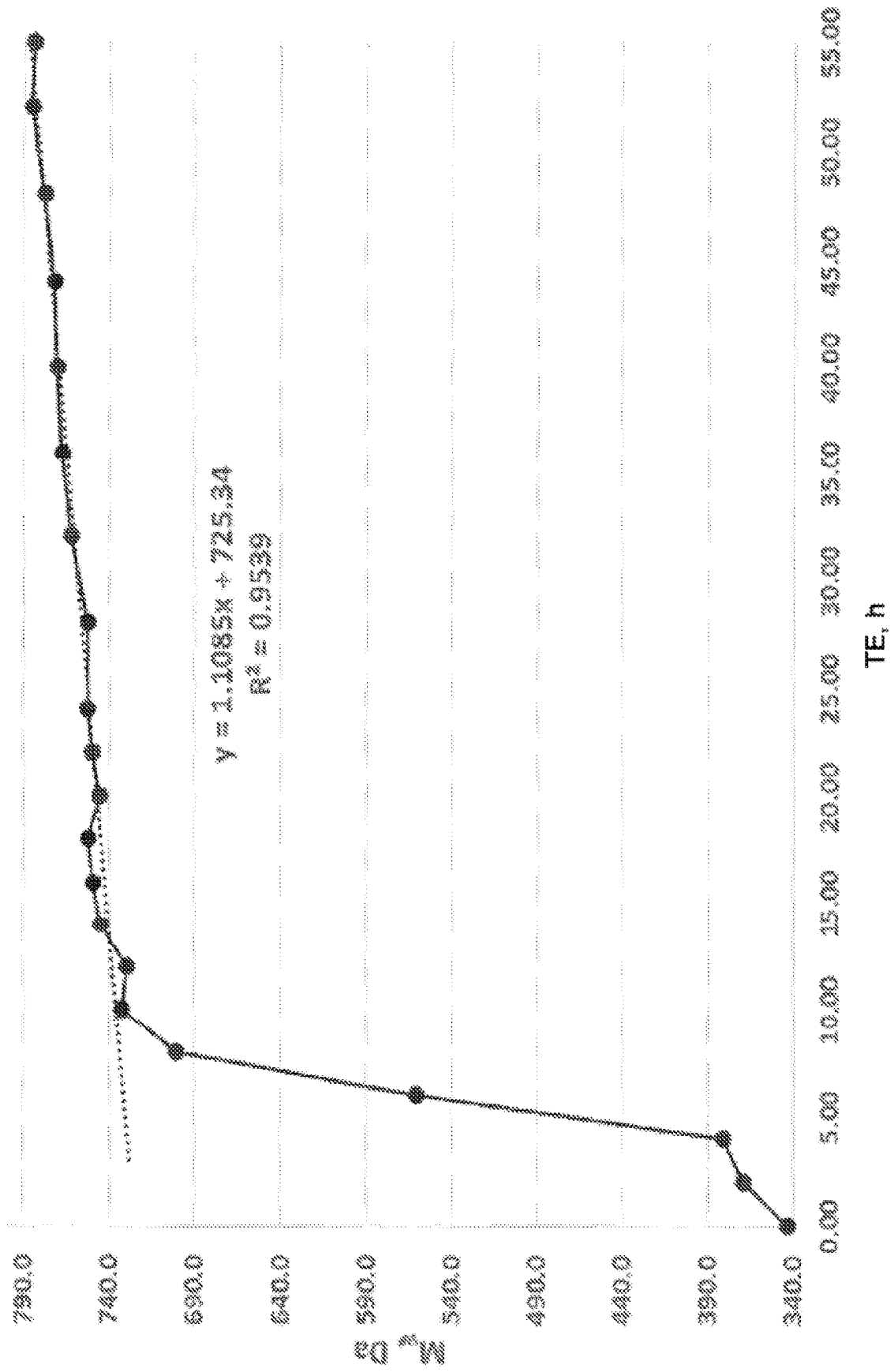


FIG. 33

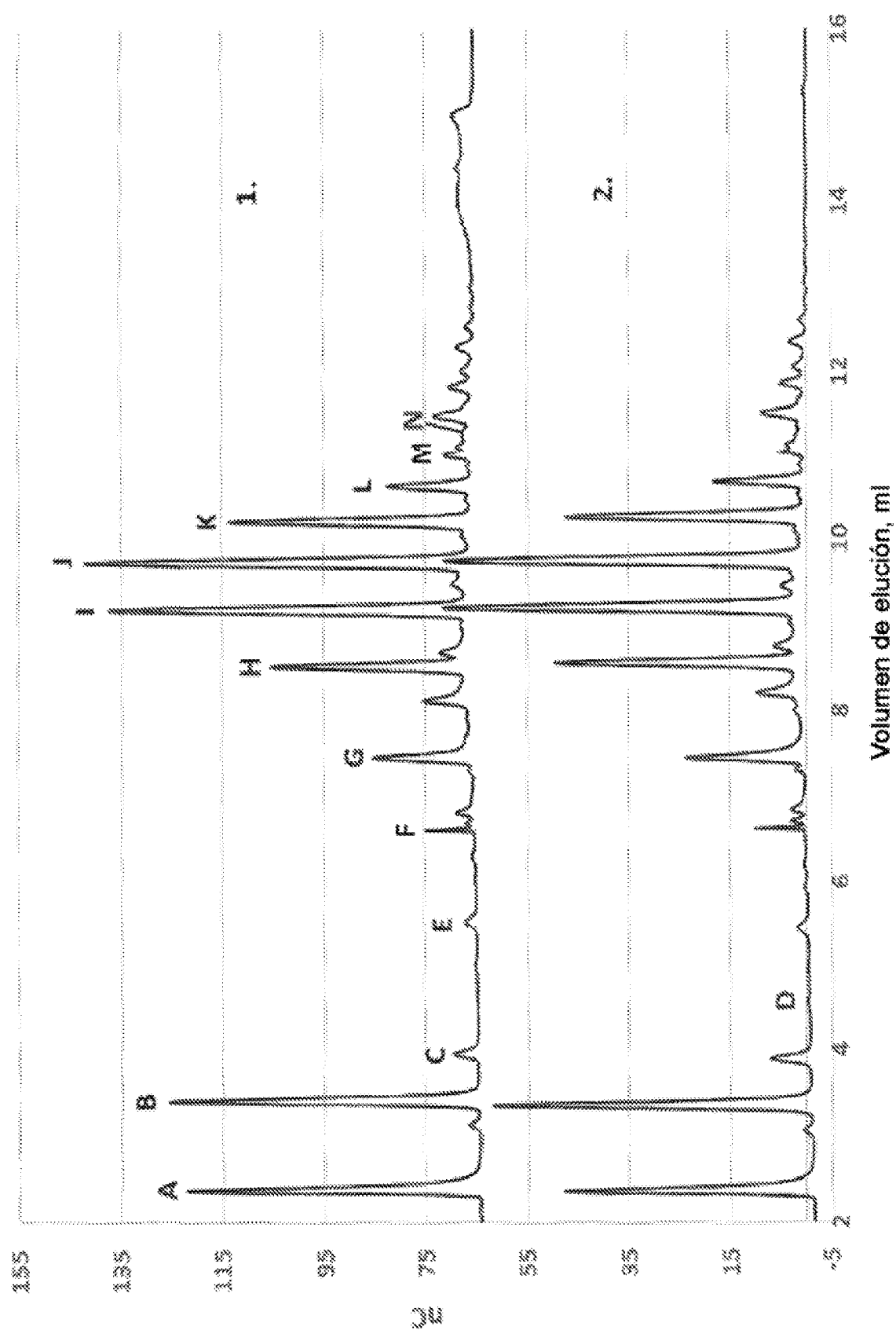


FIG. 34

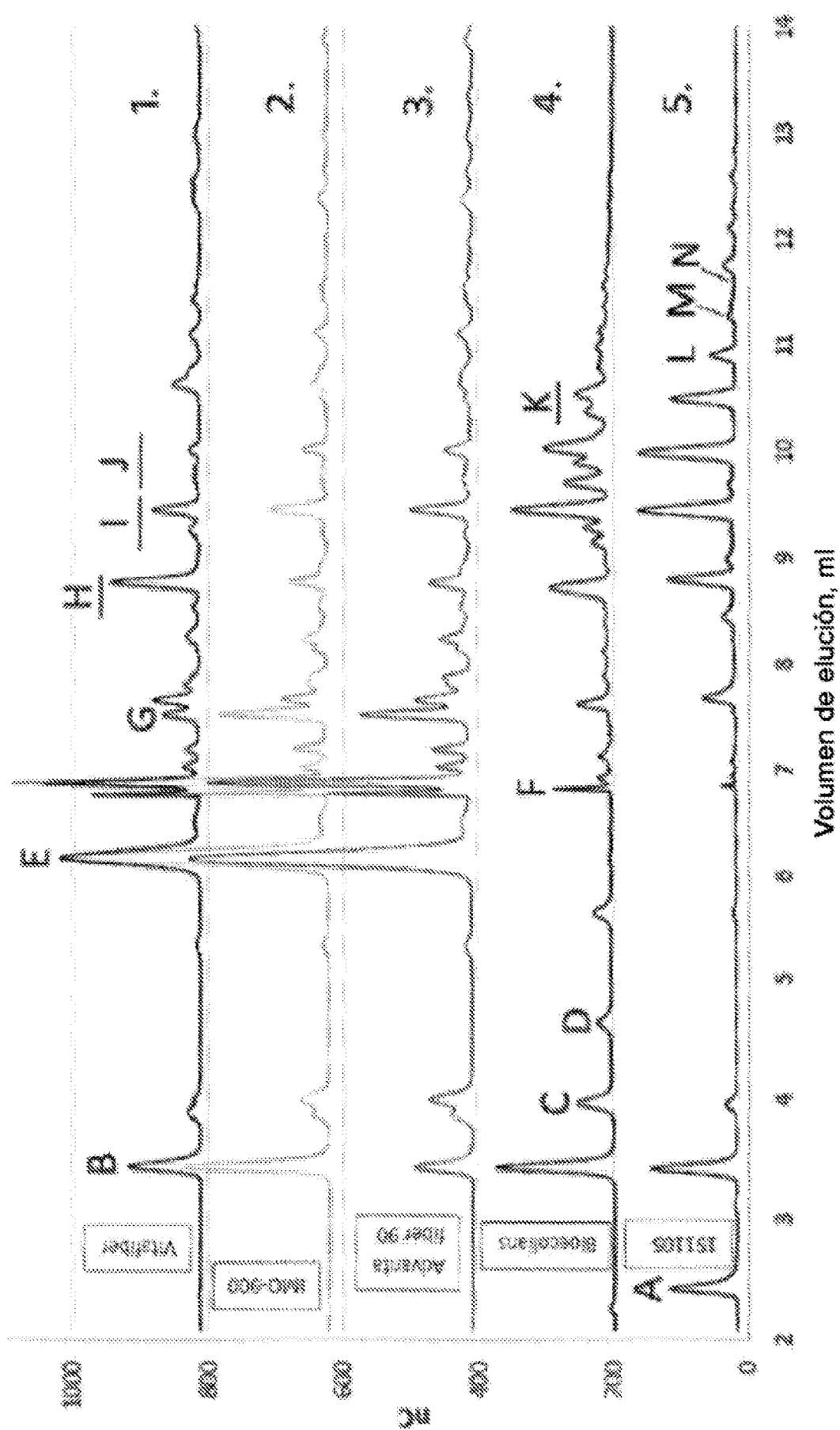


FIG. 35

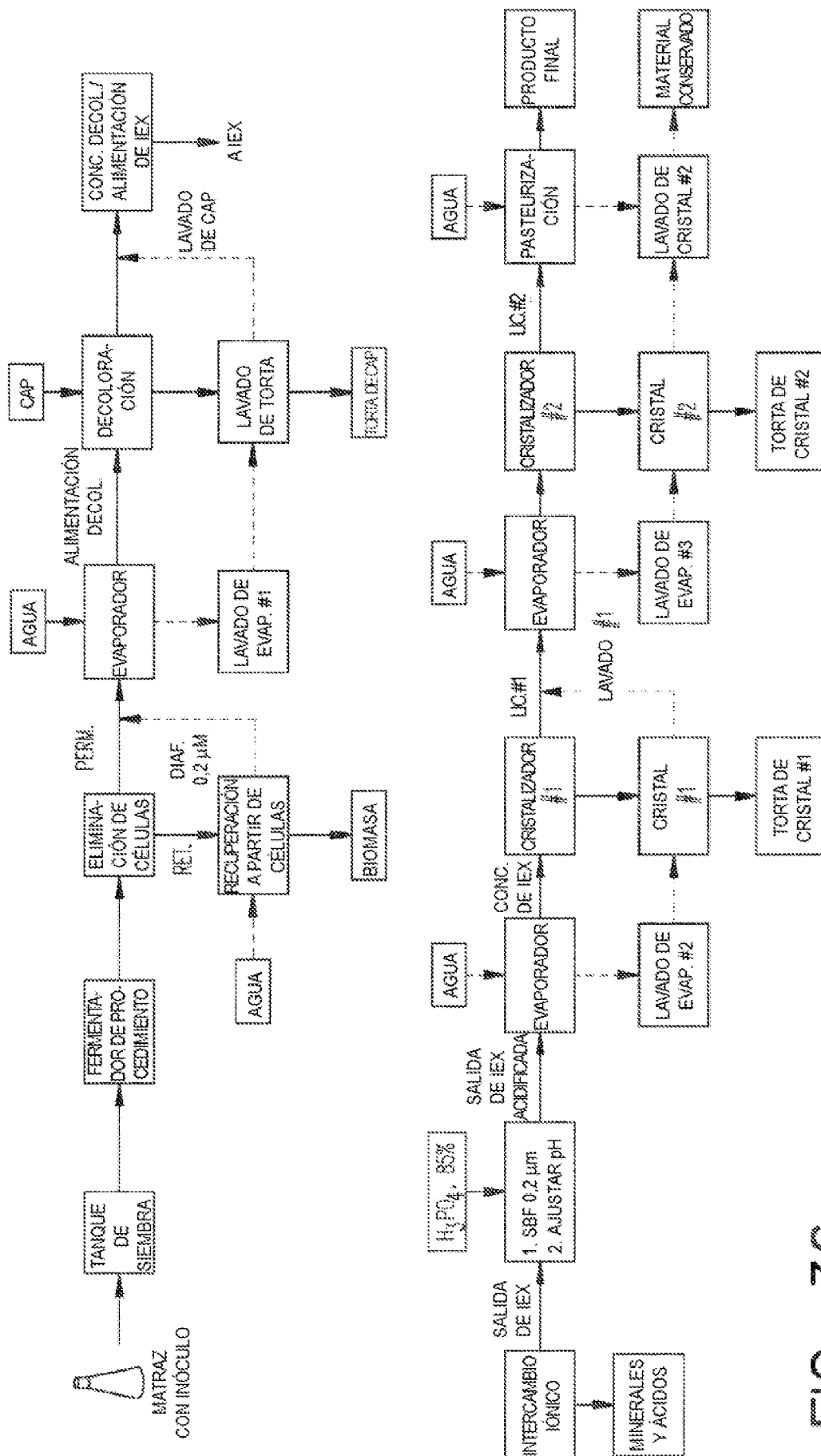


FIG. 36

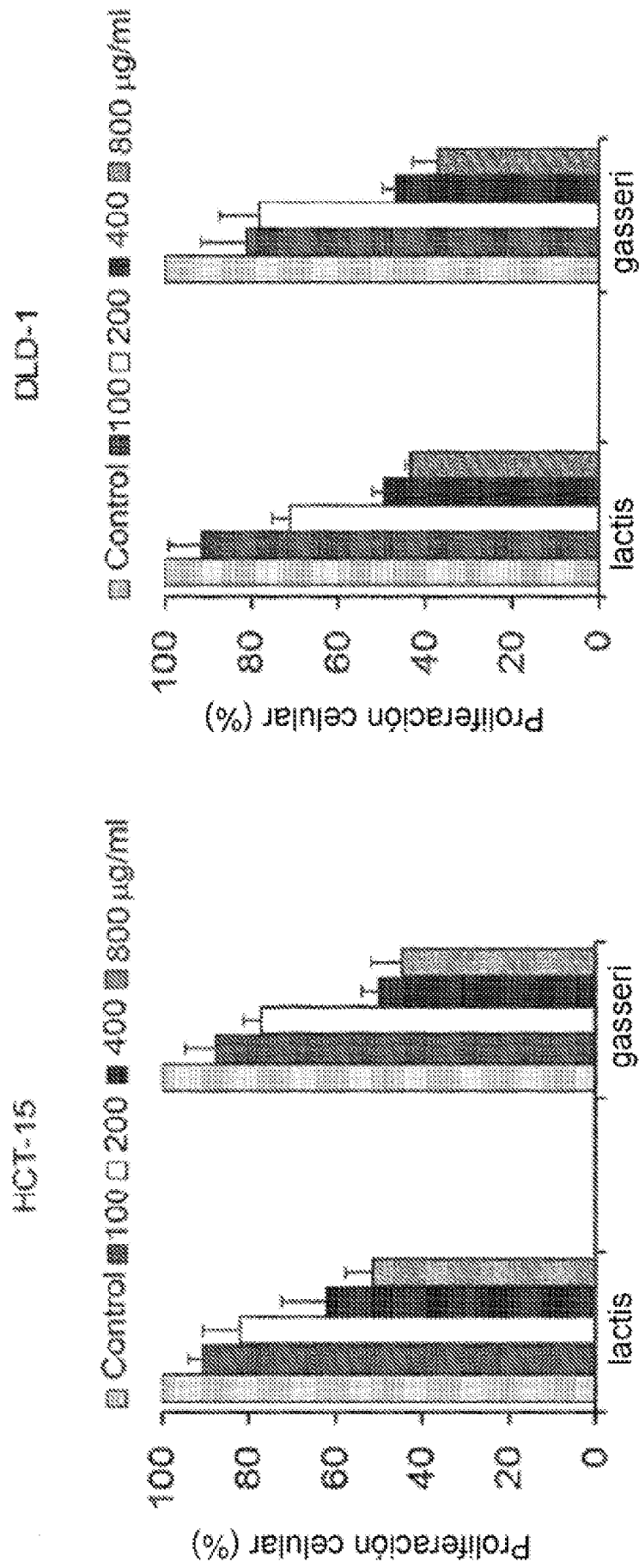


FIG. 37A

FIG. 37B

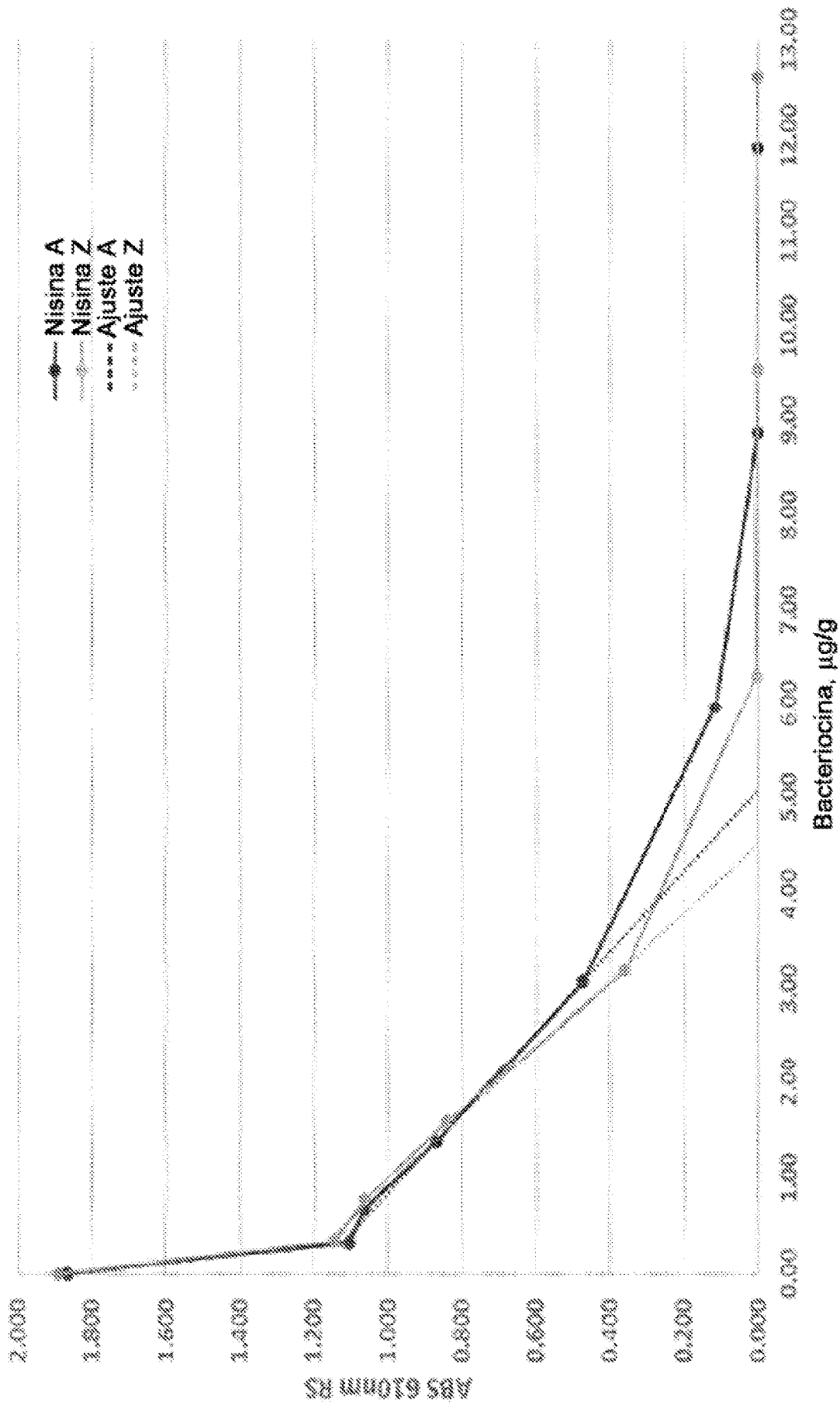


FIG. 38