

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 855**

51 Int. Cl.:

**A23F 3/14**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2008 PCT/US2008/011812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09051753**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08840240 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2217083**

54 Título: **Composiciones bebibles**

30 Prioridad:

**16.10.2007 US 999243 P**

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

**19.02.2019**

73 Titular/es:

**GANEDEN BIOTECH, INC. (100.0%)  
5800 Landerbrook Drive, Suite 300  
Mayfield Heights, OH 44124, US**

72 Inventor/es:

**FARMER, SEAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

**ES 2 700 855 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones bebibles

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones bebibles que comprenden bacterias productoras de ácido láctico.

**5 Antecedentes de la invención**

La microflora gastrointestinal desempeña una serie de funciones vitales en el mantenimiento de la función del tracto gastrointestinal y la salud fisiológica general. El crecimiento y el metabolismo de las muchas especies bacterianas individuales que habitan el tracto gastrointestinal dependen principalmente de los sustratos disponibles, la mayoría de los cuales se derivan de la dieta. (Véase, por ejemplo, Gibson G.R. et al., 1995. Gastroenterology 106: 975-982; Christl, S.U. et al, 1992. Gut 33: 1234-1238). Los organismos probióticos no son ni patógenos ni toxigénicos, conservan la viabilidad durante su almacenamiento y sobreviven al paso a través del estómago y el intestino delgado. Como los probióticos generalmente no colonizan permanentemente al huésped, deben ser ingeridos regularmente para que persistan las propiedades que promueven la salud. Estos hallazgos han llevado a intentos para modificar la composición y las actividades metabólicas de la comunidad bacteriana a través de la dieta, principalmente con probióticos, que son suplementos alimenticios microbianos vivos. El documento WO 2005/117926 describe un agente para la mejora floral bacteriana intestinal que comprende un extracto de corteza de árbol como ingrediente activo; y un alimento que comprende un extracto de corteza de árbol y al menos un miembro seleccionado de entre oligosacáridos, Bacillus bifidus y Lactobacillus. El documento describe además que el agente que mejora la flora bacteriana intestinal aumenta el número de bacterias útiles, tales como Bifidobacterium daeresense y Bacillus coagulans. El documento WO 2005/055934 describe métodos para el control dietético del síndrome del intestino irritable y la malabsorción de carbohidratos mediante la administración de una composición que contiene bacterias Bacillus coagulans.

**Sumario de la invención**

La invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que las bacterias productoras de ácido láctico, particularmente las especies de Bacillus, siguen siendo viables y conservan sus propiedades probióticas beneficiosas en composiciones bebibles, tales como las preparadas a altas temperaturas (por ejemplo, 80, 90, 100, 120 o 150°C) en agua hirviendo. La invención describe composiciones bebibles que contienen esporas. Específicamente, la invención proporciona una composición bebible para la preparación de té que comprende esporas viables de Bacillus coagulans, en donde la preparación de dicho té comprende combinar dicha composición con agua hirviendo, comprendiendo dicha composición esporas de Bacillus coagulans y materia vegetal deshidratada usada para elaborar té, en donde dicha materia vegetal deshidratada es obtenida a partir de Camellia sinensis, o del té de jengibre, té de hibisco, té de rooibos, té de menta o té de estevia y en donde:

- (a) la materia vegetativa se recubre o rocía con esporas aisladas de Bacillus coagulans;
- (b) la composición está contenida en una bolsa de té, y se incluyen esporas aisladas de Bacillus coagulans en forma de polvo secado por pulverización en la superficie de la bolsa de té; o
- (c) la composición está contenida en una bolsa de té, y las esporas aisladas de Bacillus coagulans en forma de polvo secado por pulverización están incluidas en la bolsa de té.

En un aspecto, la materia vegetativa deshidratada se procesa a partir de hojas, brotes, raíces y/o ramitas. Preferiblemente, la composición bebible es té verde, té negro, té oolong, té amarillo o té blanco. La invención proporciona composiciones de té instantáneo y bebidas de té elaborable. En un aspecto, la composición bebible es té descafeinado.

En una realización de la composición de la invención, la materia vegetativa se reviste o pulveriza con esporas de Bacillus coagulans aislada.

En una realización adicional, la composición de acuerdo con la invención está contenida en una bolsa de té.

En una realización adicional, la composición de acuerdo con la invención está contenida en una bolsa de té, y se incluyen esporas de Bacillus coagulans aisladas en forma de polvo secado por pulverización en la superficie de la bolsa de té.

En una realización adicional, la composición según la invención está contenida en una bolsa de té, y se incluyen esporas de Bacillus coagulans aisladas en forma de polvo secado por pulverización en la bolsa de té.

En una realización adicional, dicho polvo comprende polvo secado por pulverización.

Las especies bacterianas incluyen la cepa de Bacillus coagulans hammer N° de entrada ATCC 31284, o el derivado de la cepa de Bacillus coagulans hammer GBI-20, Número de designación ATCC PTA-6085; GBI-30, Número de

designación ATCC PTA-6086; o GBI-40, Número de designación ATCC PTA-6087; véase la Patente de Estados Unidos N° 6.849.256 de Farmer).

5 La invención proporciona además un método para preparar una composición bebible probiótica, que comprende combinar una composición bebible, como se define anteriormente en esta memoria, con agua hirviendo, en la que la composición bebible está contenida en una bolsa de té.

En una realización específica de la invención, el método comprende remojar el té durante 4 minutos.

En una realización específica adicional del método de la invención, dicha composición bebible comprende un té verde.

10 En otra realización específica más del método de la invención, al menos el 50% de las esporas de *Bacillus coagulans* en la composición bebible probiótica germinan después de la preparación de la composición bebible probiótica.

15 Las cepas de *Bacillus coagulans* Hammer de la invención no son patógenas y generalmente se consideran seguras para su uso en nutrición humana (es decir, clasificación GRAS) por la Administración Federal de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), y por los expertos en la materia. Además, las cepas Hammer de *Bacillus coagulans* de la invención germinan a la temperatura del cuerpo humano, o por debajo de ésta, lo que las hace útiles como probióticos. Muchas cepas de *Bacillus coagulans* fuera del grupo Hammer tienen en su mayoría aplicaciones industriales, poco o ningún beneficio nutricional y contaminantes ambientales que no se han evaluado para determinar su seguridad. Además, muchas otras cepas no Hammer de *Bacillus coagulans* crecen de manera óptima a temperaturas que exceden la temperatura del cuerpo humano y, por lo tanto, no germinan de manera eficiente en el cuerpo humano. Tales cepas son menos probióticas para el consumo humano o no adecuadas como tales.

#### Descripción detallada de los dibujos

La Figura 1A es un dibujo que demuestra que las hojas de té u otra materia vegetal deshidratada están recubiertas o pulverizadas con esporas o células vegetativas de *Bacillus coagulans* liofilizadas.

25 La Figura 1B es un dibujo que ilustra que la bacteria *Bacillus* se agrega a la composición bebible por separado o junto con la materia vegetal deshidratada o el ingrediente no bacteriano.

#### Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se dirige al descubrimiento de que las bacterias no patógenas productoras de ácido láctico (es decir, "bacterias del ácido láctico"), tales como los ejemplares de *Bacillus coagulans*, siguen siendo viables y conservan sus propiedades probióticas beneficiosas en composiciones bebibles, como las preparadas en agua hirviendo.

#### Bacterias probióticas que producen ácido láctico

35 Una bacteria probiótica que produce ácido láctico de la especie *Bacillus coagulans* adecuada para su uso en los métodos y composiciones de la invención, como se define para uso en la presente invención, produce ácido y no es patógena. Hay muchas bacterias de *Bacillus coagulans* adecuadas identificadas como se describen en el presente documento, aunque la invención no se limita a las especies bacterianas conocidas actualmente en la medida en que se describen los propósitos y objetivos de las bacterias. La propiedad de la producción de ácido es importante para la efectividad de las bacterias probióticas que producen ácido láctico de esta invención.

40 La invención proporciona el uso de una especie de *Bacillus* formadora de esporas, a saber *B. coagulans*. Preferiblemente, la especie de *Bacillus* de la invención formadora de esporas es *B. Coagulans* Hammer.

45 Los métodos y composiciones ejemplares se describen en el presente documento usando *Bacillus coagulans* como un probiótico. *Bacillus coagulans* purificado y/o aislado es particularmente útil como un probiótico en composiciones bebibles. El probiótico *B. coagulans* no es patógeno y generalmente se considera seguro (es decir, clasificación GRAS) por la Administración Federal de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), y por los expertos en la técnica.

50 *Bacillus coagulans* es una bacteria formadora de esporas grampositivas no patógenas que produce L (+) ácido láctico (dextro-rotatorio) en condiciones de fermentación. Se ha aislado de fuentes naturales, como muestras de suelo tratadas térmicamente inoculadas en medio nutriente (Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Vol. 2, Sneath, PHA, et al., Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1986). Las cepas de *B. coagulans* purificadas han servido como fuente de enzimas que incluyen endonucleasas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.200.336); amilasa (Patente de Estados Unidos N° 4.980.180); lactasa (Patente de Estados Unidos N° 4.323.651); y ciclo-malto-dextrina glucano-transferasa (Patente de Estados Unidos N° 5.102.800). Se han utilizado *B. coagulans* para producir ácido láctico (Patente de Estados Unidos N° 5.079.164). Una cepa de *B. coagulans* (denominadas L. sporogenes; Sakaguti & Nakayama (ATCC 31284)) se ha combinado con otras bacterias productoras de ácido

láctico y *B. natto* para producir un producto alimenticio fermentado a partir de habas de soja al vapor (Patente de Estados Unidos N° 4.110.477).

5 Las especies bacterianas incluyen *Bacillus coagulans*, por ejemplo, *Bacillus coagulans hammer*, preferentemente, cepa de *Bacillus coagulans hammer*, número de entrada ATCC 31284, o una o más cepas derivadas de *Bacillus coagulans hammer*, cepa número de entrada ATCC 31284 (por ejemplo, ATCC Nos.: GBI-20, número de designación de ATCC PTA-6085; GBI-30, número de designación de ATCC PTA-6086; y GBI-40, número de designación de ATCC PTA-6087; consulte la patente de EE. UU. No. 6.849.256 de Farmer).

10 *Bacillus coagulans* se caracterizó erróneamente como un *Lactobacillus* y se etiquetó como *Lactobacillus sporogenes* (ver Nakamura et al. 1988. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 63-73). Sin embargo, la clasificación inicial fue incorrecta porque *Bacillus coagulans* produce esporas y excreta L(+)-ácido láctico a través del metabolismo. Ambas características proporcionan características clave para la utilidad de *Bacillus coagulans*. Estos aspectos metabólicos y de desarrollo requerían que la bacteria se clasificara como *Bacillus* de ácido láctico. Además, generalmente no se aprecia que las especies clásicas de tipo *Lactobacillus* sean inadecuadas para la colonización del intestino debido a su inestabilidad en el riguroso medio (es decir, ácido) del pH de la bilis, particularmente de la bilis humana. Por el  
15 contrario, *Bacillus coagulans* es capaz de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal en el entorno de la bilis e incluso crecer en este rango de pH bajo.

#### Actividad probiótica de *Bacillus coagulans*

20 Está bien documentado clínicamente que muchas especies de patógenos bacterianos, micóticos y de levadura poseen la capacidad de causar una variedad de trastornos gastrointestinales que incluyen, entre otros: la alteración de la función bioquímica gastrointestinal normal, la necrosis de los tejidos gastrointestinales y la alteración de la bioabsorción de nutrientes, y condiciones similares. Las composiciones que contienen microorganismos probióticos descritas en este documento inhiben estos patógenos. Por lo tanto, las composiciones son útiles en el tratamiento profiláctico o terapéutico de afecciones asociadas con la infección por estos patógenos mencionados anteriormente.

25 En un aspecto, se incluye una cepa de *Bacillus coagulans* en una composición bebible para la preparación de té que comprende esporas de *Bacillus coagulans* viables, en donde la preparación de dicho té comprende la combinación de dicha composición con agua hirviendo, comprendiendo dicha composición las esporas de *Bacillus coagulans* y la materia vegetal deshidratada utilizada para la elaboración del té, en donde dicha materia vegetativa deshidratada se obtiene de *Camellia sinensis*, o de té de jengibre, té de hibisco, té de rooibos, té de menta o té de estevia y en donde:

30 (a) la materia vegetativa se recubre o pulveriza con esporas de *Bacillus coagulans* aisladas;

(b) la composición está contenida en una bolsa de té, y se incluyen esporas de *Bacillus coagulans* en forma de polvo secadas por pulverización en la superficie de la bolsa de té; o

(c) la composición está contenida en una bolsita de té, y se incluyen en la bolsita de té esporas de *Bacillus coagulans* en forma de polvo secadas por pulverización.

35 Debido a que las esporas de *Bacillus* son resistentes al calor y la presión y pueden almacenarse como un polvo seco, son particularmente útiles para la formulación y fabricación de productos tales como las diversas composiciones bebibles descritas en el presente documento. Una especie de *Bacillus* es muy adecuada para la presente invención, particularmente, especies que tienen la capacidad de formar esporas que son relativamente resistentes al calor y otras condiciones, lo que las hace ideales para el almacenamiento prolongado (vida útil) en  
40 formulaciones de productos.

45 La *Bacillus coagulans*, en las composiciones descritas, sobreviven al almacenamiento (vida útil) de aproximadamente 12 días a aproximadamente 5 años; desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 18 meses; desde aproximadamente 3 meses hasta aproximadamente 1 año; o desde unos 6 meses hasta unos 9 meses. Por ejemplo, al menos 50, 65, 75, 90, 95 ó 99% de las esporas germinan después de la preparación de la bebida caliente después de un período de almacenamiento prolongado (por ejemplo, 2 años).

#### Actividad probiótica antimicrobiana

50 La capacidad de *Bacillus coagulans* para inhibir diversos patógenos bacterianos se determinó cuantitativamente mediante el uso de un ensayo in vitro. Este ensayo forma parte de un cribado patógeno bacteriano estandarizado (desarrollado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA)) y está disponible comercialmente en discos de soporte sólido (Discos de antibióticos DIFCO® BACTROL®). Para realizar el ensayo, las placas de patata-dextrosa (DIFCO®) se prepararon inicialmente utilizando procedimientos estándar. Luego, las placas se inocularon individualmente con las bacterias (aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  CFU) que se analizaron para formar un lecho bacteriano confluyente.

55 La inhibición de microorganismos (por ej., patógenos gastrointestinales) por *Bacillus coagulans* se determinó posteriormente colocando aproximadamente  $1,8 \times 10^6$  CFU de *Bacillus coagulans* en 10 µl de caldo o tampón,

directamente en el centro de la placa de patata-dextrosa con un locus de prueba de aproximadamente 8 mm de diámetro por placa. Se usaron un mínimo de tres loci de prueba para cada ensayo. El control negativo consistió en un volumen de 10 µl de una solución salina estéril, mientras que el control positivo consistió en un volumen de 1 µl de glutaraldehído. Las placas se incubaron a continuación durante aproximadamente 18 horas a 30°C, momento en el que se midieron las zonas de inhibición. Como se designa en este documento, una "excelente inhibición" significa que la zona tenía 10 mm o más de diámetro; y una "buena inhibición" significa que la zona tenía más de 2 mm de diámetro pero menos de 10 mm de diámetro.

Como se esperaba, no se observó "inhibición" con el control salino negativo, y se observó una excelente "inhibición" (aproximadamente 16,2 mm de diámetro; promedio de tres pruebas) con el control positivo de glutaraldehído. Para los microorganismos entéricos analizados, se encontró la siguiente inhibición por *Bacillus coagulans*: (i) especies de *Clostridium*-excelente inhibición; (ii) *Escherichia coli*-excelente inhibición; (iii) especies de *Clostridium*-excelente inhibición, donde la zona de inhibición fue consistentemente mayor a 15 mm de diámetro. De manera similar, también se observó una excelente inhibición para los patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Las bacterias entéricas patógenas que fueron inhibidas por la actividad de *Bacillus coagulans* incluyen, pero no se limitan a: *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Streptococcus pyogenes*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli* (especies enterohemorrágicas); numerosas especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tributycum*, *Clostridium sporogenes*, y similares); *Gardnereia vaginalis*; *Propionibacterium aenes*; *Aeromonas hydrophilia*; especie *Aspergillus*; especie *Proteus*; y especie *Klebsiella*.

#### Composiciones bebibles probióticas

La invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que las bacterias productoras de ácido láctico, es decir, *Bacillus coagulans*, siguen siendo viables y conservan sus propiedades probióticas beneficiosas en composiciones bebibles, tales como las preparadas en agua hirviendo. Las bebidas se preparan combinando materia seca y un líquido, por ejemplo, agua. En una realización, se agrega agua hirviendo (aproximadamente 100°C) a una combinación de té como se define en el presente documento que comprende esporas de *Bacillus coagulans* viables en una bolsa de té y que se deja reposar durante aproximadamente cuatro minutos.

Las esporas se formulan en una variedad de composiciones adecuadas para su uso en una composición bebible. La bacteria puede estar presente como al menos 90% de esporas, por ejemplo, 95%, 98% o 99% de esporas. El té es una bebida elaborada por el remojo de una materia vegetal deshidratada, como hojas procesadas, brotes, raíces o ramitas del arbusto de té, *Camellia sinensis*, en agua caliente durante unos minutos. La invención proporciona una base de té deshidratada, por ejemplo, té negro, té oolong, té verde, té amarillo y té blanco y *Bacillus coagulans*. En un aspecto, el té es té descafeinado.

La invención también abarca mezclas de té. Muchas mezclas de té se preparan agregando otras plantas a un té (té negro, oolong, verde, amarillo o blanco); por ejemplo, el popular té Earl Grey es té negro con bergamota, mientras que el té de jazmín es té chino con jazmín.

La invención también proporciona composiciones bebibles a base de "té" de hierbas en las que la materia vegetal deshidratada se obtiene a partir de té de jengibre, té de hibisco, té rooibos, té de menta o té de estevia. Una hierba se caracteriza por ser una planta pequeña con semillas, con partes carnosas y no leñosas (de las cuales obtenemos el término "herbáceo"). Además de las plantas perennes herbáceas, las hierbas incluyen árboles, arbustos, plantas anuales, enredaderas y plantas más primitivas, como helechos, musgos, algas, líquenes y hongos. Las [hierbas] son valoradas por su sabor, fragancia, cualidades medicinales y saludables, usos económicos e industriales, propiedades pesticidas y materiales colorantes (tintes). El "té" de hierbas se puede hacer con flores frescas o secas, frutas, hojas, semillas o raíces, generalmente vertiendo agua hirviendo sobre las partes de la planta y dejándolas reposar durante unos minutos. Los tés de hierbas adecuados incluyen el té de raíz de jengibre, el té de hibisco (a menudo mezclado con la rosa mosqueta), el té de menta, el té Rooibos (rojo) o el té de Estevia.

La invención también proporciona composiciones que comprenden *Bacillus coagulans* como las definidas anteriormente y uno o más ingredientes no bacterianos en una bolsa de té. En un aspecto, los ingredientes no bacterianos comprenden materia vegetativa deshidratada obtenida de *Camellia sinensis*, como se define anteriormente. Opcionalmente, la materia vegetativa deshidratada se procesa a partir de hojas, brotes, raíces y/o ramitas.

También se proporcionan por la invención bolsas de té. Las bolsas de té adecuadas incluyen las de una bolsa porosa de seda, papel, algodón o nylon con té en el interior que se usa para elaborar el té. La bolsa de té consta de dos partes, el té y la bolsa. El té permanece dentro de la bolsa a medida que se elabora, lo que facilita su eliminación. Preferiblemente, la bacteria *Bacillus coagulans* en forma de polvo secado por pulverización se incluye en la superficie de la bolsa de té junto con la materia vegetal deshidratada o sobre ésta.

En un aspecto, la bacteria *Bacillus* se aplica directamente a la materia vegetativa deshidratada o al ingrediente no bacteriano, p. ej. las hojas de té u otra materia vegetal deshidratada se recubren o pulverizan con esporas (Figura 1A).

## ES 2 700 855 T3

- El agente activo aislado de Bacillus y/o Bacillus coagulans se aplica utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos que incluyen, por ejemplo, la aplicación de un polvo, el secado por pulverización sobre la bolsita de té o el remojo de ésta en una solución que contiene el probiótico. Opcionalmente, la bacteria Bacillus se aplica antes de preparar la bolsa de té. Alternativamente, la bacteria Bacillus se aplica mientras o después de que se haya hecho la bolsa de té. Se puede usar cualquiera de una variedad de métodos para colocar la composición bacteriana en una composición bebible. Sin embargo, los métodos preferidos incluyen un método de "secado por pulverización" en el que las bolsas de té se exponen en una cámara de baja humedad a una mezcla atomizada que contiene una composición líquida, donde la cámara se expone posteriormente a aproximadamente 80-110°F (26,7-43,3°C) para secar el líquido, impregnando así el material de la bolsa de té con los componentes de la composición.
- Una concentración típica es de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{12}$  CFU;  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{11}$  CFU; o  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  CFU de esporas/pulgadas<sup>2</sup> de la superficie externa de la bolsa de té. Después del secado, la bolsa de té está lista para su uso inmediato o para su almacenamiento en un paquete estéril.
- Los ingredientes activos (es decir, las bacterias vivas o los componentes extracelulares), comprenden entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 10%; de 0,01% a aproximadamente 1%; o de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 0,1% en peso de la composición bebible. Opcionalmente, el Bacillus coagulans aislado presenta aproximadamente de 1 mg a aproximadamente 10 g; de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g; o de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg en peso de la composición bebible. Más preferiblemente, la cantidad de la bacteria Bacillus coagulans es aproximadamente  $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) de bacterias por bolsa de té (aproximadamente 50 mg de bacterias por bolsa de té en aproximadamente 2-3 gramos de té).
- En un aspecto, la cantidad de bacterias es de aproximadamente  $10^4$  a  $10^{14}$  unidades formadoras de colonias (CFU) de bacterias por gramo de composición bebible (es decir, esporas bacterianas), preferiblemente de  $10^5$  a  $10^{13}$  CFU/g. Más preferiblemente, las concentraciones son de  $10^8$  a  $10^{13}$  CFU/g;  $10^9$  a  $10^{12}$  CFU/g; o  $10^{10}$  a  $10^{11}$  CFU/g. En un aspecto, la cantidad de bacterias es aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU por composición bebible. La cantidad real en una composición variará dependiendo de las cantidades de la composición a dispersar en la composición bebible y de las rutas de dispersión.
- En un aspecto, la invención proporciona el almacenamiento de la bolsa de té en un paquete estéril a temperatura ambiente antes del consumo. Alternativamente, la bolsa de té se utiliza inmediatamente.
- En otro aspecto, la composición bebible comprende al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o el 100% de esporas de Bacillus coagulans aislado.
- A modo de ejemplo, y no de limitación, las esporas de Bacillus coagulans puede incorporarse a cualquier tipo de producto seco o liofilizado que se disuelva o mezcle con agua caliente, siempre que la temperatura de la mezcla que contiene esporas de Bacillus coagulans se incremente a la temperatura de choque térmico requerida (es decir, 80°C durante 5 minutos) necesaria para la germinación de las esporas.
- Ejemplo 1: Preparación de cultivos de Bacillus coagulans.**
- Se inoculó la bacteria Bacillus coagulans Hammer (N° de entrada ATCC 31284) y se cultivó hasta una densidad celular de aproximadamente  $10^8$  a  $10^9$  células/ml en caldo nutritivo que contenía 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 10 30 mg de  $MnSO_4$  y 1.000 ml de agua destilada, ajustada a pH 7,0, utilizando un recipiente estándar de fermentación por vía aérea a 30°C. El rango de  $MnSO_4$  aceptable para la esporulación es de 1 mg/l a 1 g/l. Las células vegetativas pueden reproducirse activamente hasta 45°C, y las esporas son estables hasta 90°C. Después de la fermentación, las células bacterianas o esporas de B. coagulans se recolectan utilizando métodos estándar (por ejemplo, filtración, centrifugación) y las células y esporas recolectadas se pueden liofilizar, secar por pulverización, secar al aire o congelar. Como se describe en este documento, el sobrenadante del cultivo celular se recolecta y se usa como un agente extracelular secretado por B. coagulans.
- Un rendimiento típico del cultivo anterior está en el intervalo de aproximadamente  $10^9$  a  $10^{10}$  esporas viables y, más típicamente, de aproximadamente 100 a 150 mil millones de células/esporas por gramo antes del secado. Las esporas mantienen una viabilidad de al menos el 90% después del secado cuando se almacenan a temperatura ambiente hasta por diez años y, por lo tanto, la vida útil efectiva de una composición que contiene las esporas de B. coagulans Hammer a temperatura ambiente es de aproximadamente 10 años.
- Ejemplo 2: Preparación de esporas de Bacillus coagulans**
- Un cultivo de esporas de B. coagulans secas se preparó como sigue. Se inocularon diez millones de esporas en un cultivo de un litro que contenía 24 g de caldo de dextrosa de patata, 10 g de digestión enzimática de tejido de aves de corral y pescado, 5 g de FOS y 10 g de  $MnSO_4$ . El cultivo se mantuvo durante 72 horas en un ambiente de alto oxígeno a 37°C para producir un cultivo que tiene aproximadamente 150 mil millones de células por gramo de cultivo. Posteriormente, el cultivo se filtró para eliminar el medio de cultivo líquido, y el sedimento bacteriano se resuspendió en agua y se liofilizó. Luego, el polvo liofilizado se muele hasta obtener un polvo fino utilizando una buena práctica de fabricación estándar (GMP).

Ejemplo 3: Supervivencia de esporas de *Bacillus coagulans*

Este estudio se realizó para determinar la tasa de supervivencia de esporas de *Bacillus coagulans* a medida que pasan a través del estómago. Las muestras de esporas de *Bacillus coagulans* se sometieron a un entorno gástrico simulado durante periodos de tiempo variables para alcanzar su tasa de supervivencia. Primero, se preparó una muestra homogénea de materia prima de *Bacillus coagulans* de al menos 12 gramos. Se preparó una solución salina a pH 1 usando HCl 3N (150 ml cada uno en seis botellas de medio de 250 ml) y se esterilizó. Se prepararon soluciones salinas adicionales con pH 2 y 3 de manera similar, dando como resultado 6 botellas estériles de 250 ml, cada una conteniendo 150 ml de solución salina con pH ajustado. Se prepararon y esterilizaron seis botellas de medios estériles de 250 ml que contenían cada una 150 ml de solución salina normal. Se preparó tampón fosfato (aproximadamente 400 ml) a pH 7,2. Los tubos de ensayo (24) se prepararon y esterilizaron, cada uno con 9 ml de tampón fosfato pH 7,2. Se prepararon tubos de ensayo (120), cada uno con 9 ml de solución salina normal. Se preparó medio de agar GYE y se esterilizó y se enfrió a 45°C en un baño de agua. Se pesaron muestras (24) de materia prima, cada una de ~500 miligramos (equivalente a 10 mil millones de esporas). Las muestras se agregaron a botellas de medio a 37°C y se incubaron la mitad durante 20 minutos y la otra mitad durante 120 minutos. Después de 20 y 120 minutos de incubación, respectivamente, las muestras se mezclaron hasta uniformidad y se pipeteó 1 ml en 9 ml de tampón fosfato estéril, pH 7,2. Después de que las 12 muestras de cada punto de tiempo se colocaron en tubos de ensayo que contenían tampón de fosfato estéril, se realizaron diluciones en serie hasta que se usaron 6 tubos para cada muestra. La dilución final para los dos tubos de ensayo finales fue  $3 \times 10^7$  y  $3 \times 10^8$ , lo que dio un recuento de aproximadamente 300 y 30 CFU, respectivamente. Los últimos 2 tubos de ensayo de cada muestra se colocaron en un baño de agua a 70°C durante 30 minutos. Después de 30 minutos, se enfriaron inmediatamente a 45°C. Se expusieron tres placas petri estériles por tubo. Se añadió 1,0 ml del tubo tratado térmicamente a cada placa de petri, luego se vertieron 15 ml de medio de agar GYE fundido estéril (a 45°C) en cada una de las placas de petri y se mezclaron completamente. Cuando se solidificaron, las placas se incubaron en una posición invertida durante 48 horas a 40°C. Se contaron las colonias individuales. Los resultados se expresaron como CFU por gramo, como se muestra en la tabla a continuación.  $1.0E+10 = 1,0 \times 10^{10}$

Tabla 1.

Muestra	20 minutos de incubación, Recuento de esporas, CFU/gramos	120 minutos de incubación, Recuento de esporas, CFU/gramos
Solución salina normal - A	1,90E+10	1,88E+10
Solución salina normal - B	2,12E+10	2,00E+10
Solución salina normal - C	1,64E+10	2,06E+10
Promedio	1,89E+10	1,98E+10
Solución salina pH 1,0 - D	2,08E+09	5,98E+07
Solución salina pH 1,0 - E	1,47E+09	0,00E + 00
Solución salina pH 1,0 - F	3,59E+09	0,00E + 00
Promedio	2,38E+09	1,99E+07
Solución salina pH 2,0 - G	3,63E+09	3,46E+09
Solución salina pH 2,0 - H	4,47E+09	2,48E+09
Solución salina pH 2,0 - I	3,58E+09	2,82E+09
Promedio	3,89E+09	2,92E+09
Solución salina pH 3,0 - J	1,65E+10	1,13E+10
Solución salina pH 3,0 - K	1,35E+10	1,11E+10
Solución salina pH 3,0 - L	1,80E+10	1,39E+10

## ES 2 700 855 T3

Promedio	1,60E+10	1,21E+10
----------	----------	----------

### Ejemplo 4: Prueba de supervivencia de choque de esporas de *Bacillus coagulans*

El propósito del siguiente estudio fue determinar la tasa de supervivencia de GBI-30 (*Bacillus coagulans*-30; BC<sup>30</sup>) después de remojar con té durante 5 minutos, seguido de una sujeción a un entorno gástrico simulado (por ejemplo, pH 2,0) durante 2 horas. Las muestras de GBI-30 se colocaron en agua hirviendo junto con una bolsa de té (Celestial Seasonings® - Authentic Green Tea) y se dejaron reposar durante 5 minutos. Luego fueron sometidos a un ambiente gástrico simulado durante 2 horas para determinar su tasa de supervivencia. Los resultados se detallan a continuación.

Se preparó un litro de solución salina (pH 2,0 usando HCl 3N) y 150 ml de solución salina normal. Se colocó una solución salina (90 ml; pH 2,0) en cada una de seis botellas de medio de 250 ml y se esterilizó. Se prepararon aproximadamente 100 ml de tampón fosfato (pH 7,2). Se prepararon y esterilizaron tubos de ensayo (3) que contenían 9 ml de tampón fosfato (pH 7,2). Se prepararon y esterilizaron nueve tubos de ensayo que contenían 9 ml de solución salina normal. Se preparó medio de agar GYE estéril y se enfrió a 45°C en un baño maría. Se pesaron tres muestras de materia prima (16 mil millones/gramo) (cada una ~ 62,5 miligramos; GBI-30).

Se prepararon seis muestras de la siguiente manera. El agua potable se hirvió y se vertieron 200 ml de agua hirviendo en un vaso de precipitados de 400 ml que contenía 1 bolsita de té y ~62,5 mg de materia prima (GBI-30). La bolsita de té fue remojada durante 5 minutos. La bolsa de té se retiró y la solución se mezcló bien y se colocaron 10 ml en 90 ml de solución salina (pH 2,0). Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C. La solución se mezcló luego hasta uniformidad y se colocó 1 ml en 9 ml de tampón fosfato estéril (pH 7,2). Se prepararon tres diluciones en serie de 1 ml en 9 ml de solución salina estéril. El recuento final fue de aproximadamente  $5 \times 10^1$  (50 CFU). Los últimos 3 tubos de ensayo de cada muestra fueron puestos en placas. Se contaron las colonias individuales. Los resultados de este experimento se enumeran en la tabla a continuación. Estos datos indican que las esporas de *Bacillus coagulans* sobreviven en el ambiente gástrico después del consumo de las composiciones bebibles descritas en este documento.

Tabla 2.

2 horas a 37°C	Recuento de esporas, CFU total	Tasa de supervivencia
1	1,44E+08	13,0%
2	1,84E+08	17,2%
3	2,16E+08	20,9%
	1,81E+08	17,0%

En otra serie de experimentos, las bolsas de té que contenían GBI-30 se colocaron en agua hirviendo y el té se remojó durante cuatro minutos. Se realizaron recuentos celulares. Alrededor del 65% de las bacterias de *Bacillus coagulans* sobrevivieron. Estos datos indican que las esporas de *Bacillus coagulans* retienen la viabilidad en las composiciones bebibles descritas en este documento.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición bebible para la preparación de té que comprende esporas viables de *Bacillus coagulans*, en donde la preparación de dicho té comprende combinar dicha composición con agua hirviendo, comprendiendo dicha composición esporas aisladas de *Bacillus coagulans* y materia vegetativa deshidratada usada para elaborar té, en donde se obtiene dicha materia vegetativa deshidratada de *Camellia sinensis*, o de té de jengibre, té de hibisco, té de rooibos, té de menta o té de estevia y en donde:
- 5 (a) la materia vegetativa se recubre o pulveriza con esporas aisladas de *Bacillus coagulans*;
- (b) la composición está contenida en una bolsa de té, y se incluyen esporas aisladas de *Bacillus coagulans* en forma de polvo liofilizado, secadas por pulverización, secadas al aire o congeladas en la superficie de la bolsa de té; o
- 10 (c) la composición está contenida en una bolsa de té, y las esporas aisladas de *Bacillus coagulans* en forma de polvo liofilizado, secadas por pulverización, secadas al aire o congeladas se incluyen en la bolsa de té.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la materia vegetativa está revestida o pulverizada con esporas aisladas de *Bacillus coagulans*.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición está contenida en una bolsa de té.
- 15 4. La composición de la reivindicación 3, en la que la composición está contenida en una bolsa de té, y se incluyen esporas aisladas de *Bacillus coagulans* en forma de polvo liofilizado, secadas por pulverización, secadas al aire o congeladas en la superficie de la bolsa de té.
5. La composición de la reivindicación 3, en la que la composición está contenida en una bolsa de té, y se incluyen esporas aisladas de *Bacillus coagulans* en forma de polvo liofilizado, secadas por pulverización, secadas al aire o congeladas en la bolsa de té.
- 20 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho polvo comprende polvo secado por pulverización.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha materia vegetativa deshidratada se selecciona del grupo que consiste en hojas procesadas, brotes, raíces y ramitas.
- 25 8. La composición de la reivindicación 7, en la que dicho té es té verde, té negro, té oolong, té amarillo o té blanco.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho té es té verde.
10. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho té es té elaborable, y en el que dicha composición bebible es opcionalmente té descafeinado.
- 30 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 7 a 10, en la que dicho *Bacillus coagulans* aislado es una cepa de *Bacillus coagulans* Hammer con Número de entrada ATCC 31284, o en la que dicho *Bacillus coagulans* aislado se selecciona del grupo que consiste en la cepa GBI-30, Número de designación ATCC PTA-6086), cepa GBI-20 (Número de designación ATCC PTA-6085), y cepa GBI-40 (Número de designación ATCC PTA-6087).
- 35 12. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho *Bacillus coagulans* aislado es la cepa GBI-30 (Número de designación ATCC PTA-6086).
13. Un método para preparar una composición bebible probiótica, que comprende combinar una composición bebible de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 7 a 12 con agua hirviendo, en donde la composición bebible está contenida en una bolsa de té.
14. El método de la reivindicación 13, que comprende remojar el té durante 4 minutos.
- 40 15. El método de la reivindicación 13, en el que dicha composición bebible comprende té verde.
16. El método de la reivindicación 13, en el que al menos el 50% de las esporas de *Bacillus coagulans* en la composición bebible probiótica germinan después de la preparación de la composición bebible probiótica.

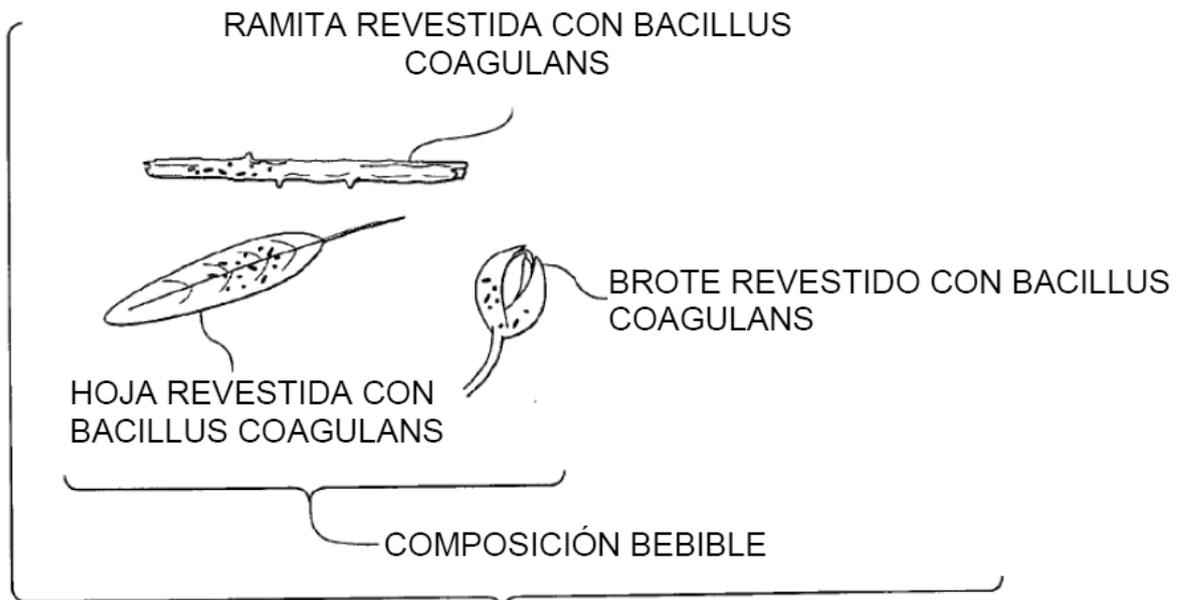


Fig. 1A

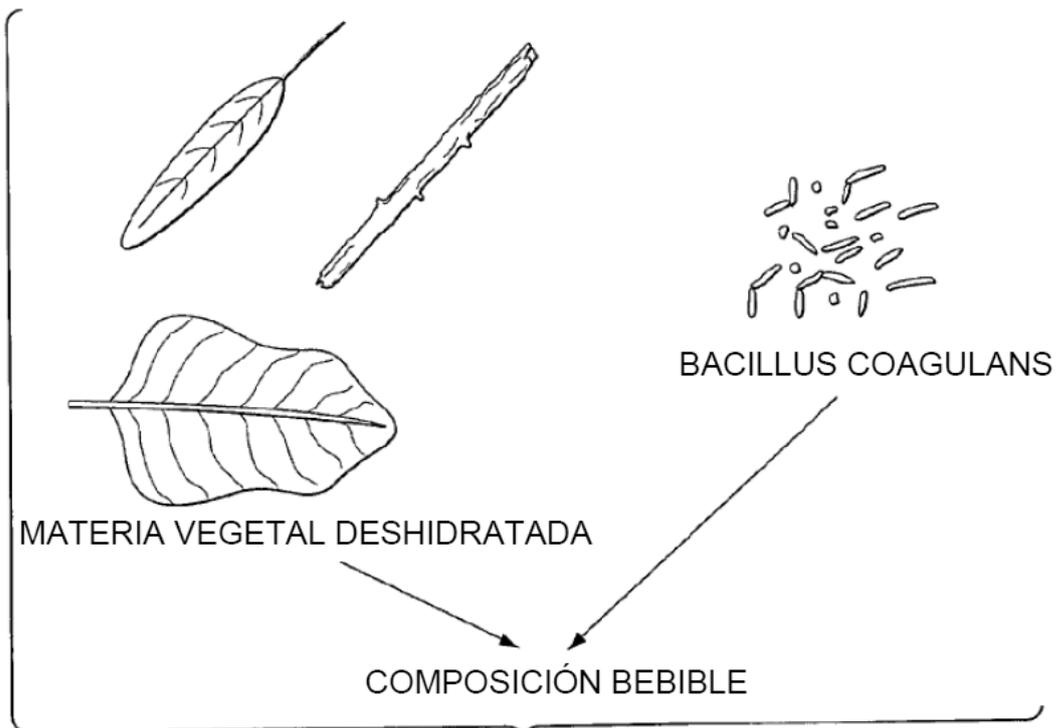


Fig. 1B