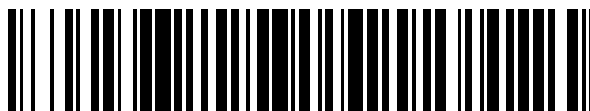


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 256**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/10** (2006.01)

**A23L 33/135** (2006.01)

**A23L 33/21** (2006.01)

**A61K 35/747** (2015.01)

**A61K 38/43** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2014** **PCT/GB2014/053302**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015** **WO15067948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2014** **E 14806046 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** **EP 3065571**

54 Título: **Composición**

30 Prioridad:

**05.11.2013 GB 201319538**

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

**13.05.2020**

73 Titular/es:

**OPTIBIOTIX LIMITED (100.0%)**  
**Innovation Centre Innovation Way**  
**Heslington, York YO10 5DG, GB**

72 Inventor/es:

**O'HARA, STEPHEN PATRICK**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 760 256 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

## Composición

Campo técnico de la invención

- 5 La invención se refiere a una composición probiótica y prebiótica que es útil en el tratamiento de los niveles de colesterol.

Antecedentes de la invención

- 10 Los probióticos son bacterias que confieren beneficios para la salud a un hospedador. Normalmente, los cultivos de cepas bacterianas probióticas son consumidos o administrados a individuos para suplementar la población de bacterias del intestino que existen de forma natural. Varios beneficios para la salud se han asociado a los probióticos, que incluyen reducir la incidencia de cáncer, diarrea y síndrome del intestino irritable, por nombrar algunos. Los probióticos tienen el potencial de ayudar en el tratamiento de varias afecciones fisiológicas y actúan reduciendo la absorción de ciertas sustancias ingeridas, tales como los lípidos. Estudios preliminares también indican que los probióticos pueden ser útiles en reducir los niveles de colesterol en suero y la tensión arterial y ayudar a modular la diabetes y reducir el peso.

- 15 Los lactobacilos son probióticos comunes en los productos lácteos y constituyen aproximadamente el 75 % de los probióticos actualmente comercializados. Sin embargo, se ha estimado que solo el 2 % de la dosis de lactobacilos sobrevive para ser eficaz en el intestino.

- 20 Los prebióticos son ingredientes dietéticos que pueden potenciar selectivamente la microbiota intestinal nativa beneficiosa, tales como los lactobacilos o las bifidobacterias, y están encontrando una aplicación muy elevada en el sector alimentario. Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que son selectivamente metabolizados por bacterias colónicas que contribuyen a la salud mejorada. Como tal, su uso puede promover los beneficiosos cambios dentro del medio microbiano intestinal nativo y, por tanto, pueden ayudar en la supervivencia de los probióticos. Son distintos de la mayoría de las fibras dietéticas, como pectina, celulosas, xilano, que no son selectivamente metabolizados en el intestino. Los criterios para la clasificación como un prebiótico es que deben resistir a la acidez gástrica, hidrólisis por enzimas de mamífero y absorción gastrointestinal, se fermenta por la microflora intestinal y estimula selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales asociadas a la salud y el bienestar.

- 25 Se ha demostrado que los fructo-oligosacáridos (FOS, inulina y oligofructosa) y los galacto-oligosacáridos (GOS) satisfacen los criterios para la clasificación de prebióticos repetidamente en estudios de intervención humana. Actualmente, no existe prebiótico para lactobacilos.

- 30 El documento de patente WO2010124387 desvela una composición oral para reducir el colesterol en suero, lípidos en suero, grasa corporal o índice aterogénico, o para la profilaxis o el tratamiento de aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares, que comprende una bacteria altamente activa para BSH, cepa aislada o sobrenadante de la misma.

- 35 El documento de patente WO2004074496 desvela un proceso para la producción de un novedoso oligosacárido, comprendiendo el proceso combinar un sustrato con la enzima alfa-galactosidasa de lactobacillus.

- 40 El documento de patente US2011177044 desvela una composición simbiótica que comprende el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y un prebiótico basado en hidrato de carbono, tal como fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, oligosacáridos de leche humana, o combinaciones de los mismos, y el uso de la composición para la prevención y/o el tratamiento de enfermedad alérgica.

- El documento de patente US2011206649 desvela el uso de una cepa bacteriana probiótica en la fabricación de un medicamento o composición nutricional terapéutica para mejorar la maduración de patrones del sueño en lactantes, niños jóvenes o animales jóvenes, y/o para reducir las alteraciones del sueño y/o mejorar los patrones del sueño en seres humanos o animales en cualquier edad.

- 45 El documento de patente EP2216036 desvela el uso de probióticos en combinación con prebióticos para tratar o prevenir la obesidad.

PARK, YOO HEON ET AL (2007) (JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, (2007), vol. 17, no. 4, páginas 655 - 662) desvela el efecto de la inclusión dietética de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 sobre el metabolismo del colesterol en ratas.

- 50 El documento de patente US2004115179 desvela cepas aisladas de *Lactobacillus* resistentes a ácidos y sales biliares que tienen la capacidad de reducir el colesterol.

El documento de patente US2013089633 desvela medios y métodos de mejora del metabolismo de los lípidos, y un medio o método para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos asociados al trastorno del metabolismo de los lípidos.

5 El documento de patente US2012213753 desvela una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos una de las cepas seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, *Lactobacillus plantarum* CECT 7528 y *Lactobacillus plantarum* CECT 7529.

10 Es un objeto de la presente invención proporcionar una combinación de un probiótico de lactobacillus y prebiótico específico para los lactobacilos que fuera adecuado para su uso en la modificación de la absorción del colesterol en un individuo. También sería beneficioso si la composición de probiótico también se pudiera usar para tratar otras afecciones fisiológicas, tales como enfermedad cardíaca, diabetes u obesidad.

#### Sumario de la invención

La presente invención se describe en las reivindicaciones adjuntas.

15 La invención reivindicada se refiere a una composición que comprende una cepa de lactobacilo que tiene una elevada actividad de hidrolasa de sales biliares y un agente modificador de colesterol; en donde la cepa es *Lactobacillus plantarum* 2830 (ECGC 13110402).

Según un aspecto adicional de la invención reivindicada, se desvela una composición para su uso en la modificación de la absorción de colesterol en un individuo que comprende una cepa de lactobacilo que tiene una elevada actividad de hidrolasa de sales biliares y un agente modificador de colesterol; en donde la cepa es *Lactobacillus plantarum* 2830 (ECGC 13110402).

20 Según otro aspecto más, se desvela una composición para su uso en el tratamiento de colesterol alto, enfermedad cardíaca, diabetes u obesidad que comprende una cepa de lactobacilo que tiene una elevada actividad de hidrolasa de sales biliares y un agente modificador de colesterol; en donde la cepa es *Lactobacillus plantarum* 2830 (ECGC 13110402).

25 El término "cepa mutante" en el contexto de la presente solicitud de patente pretende significar cualquier cepa que derive directamente de las cepas desveladas, pero que sea fenotípicamente diferente debido a la introducción de una o más mutaciones genéticas (tanto por ingeniería genética como por selección).

30 El agente modificador de colesterol comprende oligosacáridos. Preferentemente, el oligosacárido se produce a partir de uno o más de los siguientes:  $\beta$ -galactosidasas,  $\alpha$ -galactosidasas,  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasas,  $\alpha$ -manosidasas, o  $\beta$ -xilidasas. Más preferentemente, la cepa bacteriana es capaz de producir los oligosacáridos por reacción enzimática inversa.

El agente modificador de colesterol puede comprender un medio de crecimiento selectivo para la cepa de lactobacilo.

La composición puede comprender además un prebiótico o un prebiótico secundario si el agente modificador de colesterol comprende un prebiótico.

35 La composición probiótica estará preferentemente presente en la composición en una cantidad eficaz para provocar un cambio en el perfil de absorción de colesterol en el intestino delgado. Preferentemente, los cultivos se administrarán a un individuo en una cantidad en el intervalo de  $10^5$  ufc/g a  $10^{12}$  ufc/g. Más preferentemente, la cepa bacteriana probiótica está en una cantidad en el intervalo de  $10^8$  ufc/g a  $10^9$  ufc/g. Aunque se apreciará que se pueden administrar diferentes dosificaciones dependiendo de la afección del individuo.

40 La cepa se puede encapsular. Muchas técnicas de encapsulación serán evidentes para el destinatario experto y la empleada será adaptada a la estabilidad requerida del cultivo probiótico durante el tránsito digestivo. El encapsulado puede comprender un prebiótico específicamente adaptado al probiótico.

45 La composición probiótica puede comprender además un compuesto de excipiente o vehículo para permitir que se libere en el momento más apropiado para reducir la absorción de colesterol. Normalmente, el cultivo debe sobrevivir relativamente intacto hasta que llegue a los enterocitos intestinales del intestino delgado.

La composición puede estar en varios formatos de alimento, tales como un líquido bebible, un untado y/o polvo que se puede mezclar con un alimento sólido o líquido.

La composición se puede combinar con uno o más principios activos, tales como vitaminas, minerales, productos fitoquímicos, antioxidantes, y combinaciones de los mismos.

50 Las vitaminas pueden incluir vitaminas liposolubles tales como vitamina A, vitamina D, vitamina E, y vitamina y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, las vitaminas pueden incluir vitaminas solubles en agua tales como vitamina C (ácido ascórbico), las vitaminas B (tiamina o B1, riboflavina o B2, niacina o B3, piridoxina o B6, ácido fólico o B9, cianocobalamina o B12, ácido pantoténico, biotina), y combinaciones de las mismas.

Los minerales pueden incluir, pero no se limitan a, sodio, magnesio, cromo, yodo, hierro, manganeso, calcio, cobre, fluoruro, potasio, fósforo, molibdeno, selenio, cinc, y combinaciones de los mismos.

Los antioxidantes pueden incluir, pero no se limitan a, ácido ascórbico, ácido cítrico, aceite de romero, vitamina A, vitamina E, fosfato de vitamina E, tocoferoles, fosfato de di-alfa-tocoferilo, tocotrienoles, ácido alfa-lipoico, ácido dihidrolipoico, xantófilos, beta-criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina, astaxantina, beta-caroteno, carotenos, carotenoides mixtos, polifenoles, flavonoides, y combinaciones de los mismos.

Los productos fitoquímicos pueden incluir, pero no se limitan a, carotenoides, clorofila, clorofilina, fibra, flavonoides, antocianinas, cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina, flavanoles, catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, teaflavinas, tearubiginas, proantocianinas, flavonoles, quercetina, kaempferol, miricetina, isoramnetina, eshesperetina de flavonona, naringenina, eriodictiol, tangeretina, flavonas, apigenina, luteolina, lignanos, fitoestrógenos, resveratrol, isoflavonas, daidzeína, genisteína, gliciteína, isoflavonas de soja, y combinaciones de los mismos.

Alternativa (o adicionalmente) a un fármaco o medicamento, la composición se usa como suplemento dietético, un nutraceutico, o un alimento funcional. Además, la composición se podría incorporar en un alimento existente, tal como yogurt, alimento untado, o como un polvo que puede ser fácilmente combinado con alimentos o preparado en una bebida líquida. La composición también se puede formular en un suplemento dietético.

Según un aspecto adicional, se desvela un método de producción de la composición como se describe anteriormente en el presente documento, que comprende mezclar una cepa de lactobacilo que tiene una elevada actividad de hidrolasa de sales biliares con un agente modificador de colesterol en una cantidad biológicamente eficaz; en donde la cepa es *Lactobacillus plantarum* 2830 (ECGC 13110402).

Será evidente para el destinatario experto que el método de producción de la composición también puede incorporar etapas adicionales e incorporar o mezclar la composición con componentes adicionales como se ha descrito anteriormente.

#### Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción detallada y los experimentos, se debe considerar que las realizaciones que se encuentran fuera del alcance de la invención reivindicada como se explica en la reivindicación 1 y sus aspectos adicionales explicados en las reivindicaciones 2-13 se interpretan como ilustrativas y/o comparativas a la invención reivindicada. Las realizaciones se describirán ahora, a modo de ejemplo solo, en las que:

La Figura 1A es un gráfico del recuento bacteriano con el tiempo usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. plantarum* en el Experimento 1;

la Figura 1B es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. casei* en el Experimento 1;

la Figura 1C es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. salivarius* en el Experimento 1;

la Figura 1D es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. fermentum* en el Experimento 1;

la Figura 1E es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. rhamnosus* en el Experimento 1;

la Figura 1F es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. delbrueckii* en el Experimento 1;

la Figura 2A es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. plantarum* en el Experimento 1;

la Figura 2B es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. casei* en el Experimento 1;

la Figura 2C es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. salivarius* en el Experimento 1;

la Figura 2D es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. delbrueckii* en el Experimento 1;

la Figura 2E es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. rhamnosus* en el Experimento 1;

la Figura 2F es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. acidophilus* en el Experimento 1;

la Figura 2G es un gráfico de recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. helveticus* en el Experimento 1;

5 la Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de diferentes cepas bacterianas durante 14 horas ( $DO_{600}$  medida cada hora) en 0,4 % de bilis de buey y 100 mg/L de concentración de colesterol en medio MRS en el Experimento 1;

10 la Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de diferentes cepas bacterianas durante 2 días antes de la prueba ( $DO_{600}$  medida cada hora) en 0,4 % de bilis de buey y 100 mg/L de concentración de colesterol en medio MRS en el Experimento 1;

la Figura 5 es una fotografía de cepas de lactobacilo cultivadas en MRSA sobre una placa de 96 pocillos en condiciones aerobias en el Experimento 2;

15 la Figura 6 es una fotografía de cepas de lactobacilo cultivadas sobre una placa de 96 pocillos en condiciones anaerobias, siendo las cepas cultivadas en MRSA solo (control), MRSA + 0,5 % de GDCA, MRSA + 0,5 % de TDCA, MRSA + 0,5 % de bilis de buey; y MRSA + 2 % de bilis de buey en el Experimento 2;

la Figura 7 es una fotografía de cepas de lactobacilo cultivadas sobre una placa de 96 pocillos en condiciones aerobias, siendo las cepas cultivadas en MRSA solo (control), MRSA + 0,5 % de GDCA, MRSA + 0,5 % de TDCA, MRSA + 0,5 % de bilis de buey; y MRSA + 2 % de bilis de buey en el Experimento 2;

20 la Figura 8 es un gráfico de sectores que muestra el diverso intervalo de cepas de lactobacilo que se sometieron a cribado de alta resolución;

la Figura 9 es un gráfico de sectores que muestra los resultados de las 24 cepas que se identificaron para análisis adicional de su capacidad reductora de colesterol;

la Figura 10 es un gráfico de sectores que muestra los resultados de las 24 cepas mostradas en la Figura 5 después de normalizar la asimilación de colesterol a la densidad óptica;

25 la Figura 11 es un gráfico de barras que muestra el recuento de polvo de varias cepas durante los experimentos de liofilización;

la Figura 12 es un gráfico de barras que muestra la supervivencia a la liofilización de varias cepas durante los experimentos de liofilización;

30 la Figura 13 es un gráfico de barras que muestra la supervivencia *in vitro* en el estómago de varias cepas que habían sido liofilizadas;

la Figura 14 es un gráfico de barras que muestra la actividad de hidrolasa de las sales biliares a GDC 200  $\mu$ M para las cepas B4321, B2828 y B2830; y

la Figura 15 es un gráfico de barras que muestra la actividad de hidrolasa de las sales biliares (bilis de buey) para las cepas B4321, B2828 y B2830.

## 35 EXPERIMENTO 1

Las bases de estos experimentos eran usar reversiblemente  $\beta$ -galactosidasas en microorganismos para producir un GOS novedoso. En general, las  $\beta$ -galactosidasas digerirían lactosa. Sin embargo, cambiando las condiciones de reacción, en términos de sustrato y temperatura, la enzima actúa reversiblemente y genera una versión de oligosacáridos de la lactosa (GOS).

40 Los lactobacilos se usan más frecuentemente como probióticos que las bifidobacterias, todavía no existe prebiótico selectivo para lactobacilos. Como estos probióticos también alojan actividad de  $\beta$ -galactosidasa, los experimentos indujeron la producción de GOS que era específica para estos probióticos. El metabolismo de los prebióticos como GOS son específicos de especie (como se evidencia por bacterias Bi-Immuno y bifidobacterias), por lo que un GOS de lactobacilo tiene el potencial de potenciar el crecimiento, supervivencia y beneficios para la salud de los

45 lactobacilos.

Los experimentos realizados fueron del siguiente modo:

1. Ensamblar y probar un intervalo de lactobacilos probióticos para su capacidad para generar GOS y medir actividades de  $\beta$ -galactosidasa;
2. Generar un GOS prebiótico usando el procedimiento de enzima inversa;

3. Aumentar de escala la novedosa molécula para permitir la prueba *in vitro*;
4. Comparar la supervivencia y el crecimiento de lactobacilos en ausencia y presencia del prebiótico en una serie de experimentos de 'modelo intestinal' que prueban los probióticos y simbióticos;
5. Evaluar la posibilidad de usar GOS como material de encapsulación para los lactobacilos; y
- 5 6. Probar las propiedades de administración del material de encapsulación.

Las cepas bacterianas inicialmente investigadas durante la primera etapa de los experimentos se muestran a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1

| Cepa                                      | Número      | Origen         |
|-------------------------------------------|-------------|----------------|
| Lactobacillus acidophilus                 | NCIMB 30184 | Humano         |
| Lactobacillus rhamnosus                   | NCIMB 30188 | Humano         |
| Lactobacillus plantarum                   | NCIMB 30187 | Col fermentada |
| Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus | NCIMB 30186 | Yogurt         |
| Lactobacillus casei                       | NCIMB 30185 | Queso          |
| Lactobacillus salivarius ssp. salivarius  | NCIMB 30225 | Humano         |
| Lactobacillus fermentum                   | NCIMB 30226 | Lácteo         |
| Lactobacillus helveticus                  | NCIMB30224  | Lácteo         |
| Lactobacillus fermentum                   | ATCC11976   | Humano         |
| Lactobacillus salivarius                  | ATCC 11741  | Humano         |

- 10 Se realizó la determinación de la curva de crecimiento bacteriana muestreando cultivos a intervalos de 0 h, 3 h, 5 h, 8 y 24 h usando una serie de dilución de 100 µL de cultivo en 900 µL de PBS. Se extendieron 20 µL de cada serie sobre un frasco y se evaluaron con un control negativo y crecimiento.

- 15 Se evaluó el recuento bacteriano de varias de las cepas usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento. Las Figuras 1A - 1F muestran que el recuento bacteriano con el tiempo usando 0,1 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* y *L. delbrueckii* todos produjeron una curva de crecimiento estacionario desde aproximadamente 6,5 log<sub>10</sub> UFC/mL hasta por encima de 9,5 log<sub>10</sub> UFC/mL en aproximadamente 13 horas y el crecimiento fue disminuyendo ya que no aumentó en 25 horas.

- 20 Se evaluó el recuento bacteriano de varias de las cepas usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento. Las Figuras 2A-2G muestran el recuento bacteriano con el tiempo usando 5 % de lactosa como medio de crecimiento para *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *L. helveticus*. Otra vez, todos produjeron una curva de crecimiento estacionaria desde aproximadamente 6,5 log<sub>10</sub> UFC/ml hasta por encima de 9,5 log<sub>10</sub> UFC/ml en aproximadamente 13 horas y el crecimiento fue entonces plano ya que no aumentó en 25 horas.

- 25 Entonces se incluyó colesterol en el medio de cultivo de las cepas bacterianas y se probó cada cepa para la cantidad de colesterol después de la incubación.

El ensayo de colesterol usado se basa en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de colesterol } \times \text{ peso seco (g)}^{-1} = (B-T/B \times 100)/W$$

donde B= contenido de colesterol en el control sin inocular mg/l<sup>-1</sup>, T= colesterol en medio de cultivo mg/l<sup>-1</sup> y W= células (peso seco g después de 12 h de inc).

- 30 Se midió el peso del sedimento del cultivo independientemente del sobrenadante y también se midió el caldo gastado (residuos evaporados). El ensayo de colesterol se realizó por triplicado en varias series.

La Figura 3 muestra el crecimiento de diferentes cepas bacterianas durante 14 horas (DO<sub>600</sub> medida cada hora) en 0,4 % de bilis de buey y 100 mg/L de concentración de colesterol en medio MRS y muestra que algunas cepas

bacterianas fueron mucho más eficaces en crecer en este medio. *L. plantarum* mostró el mejor perfil de crecimiento, seguido por *L. delbrueckii*, *L. casei* y *L. fermentum*.

La Figura 3 muestra el crecimiento de diferentes cepas bacterianas durante 12 horas (DO<sub>600</sub> medida cada hora) en 0,4 % de bilis de buey y 100 mg/L de concentración de colesterol en medio MRS y muestra que algunas cepas bacterianas fueron mucho más eficaces en crecer en este medio. *L. plantarum* mostró el mejor perfil de crecimiento, seguido por *L. delbrueckii*, *L. casei* y *L. fermentum*.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de diferentes cepas bacterianas durante 2 días antes de la prueba (DO<sub>600</sub> medida cada hora) en 0,4 % de bilis de buey y 100 mg/L de concentración de colesterol en medio MRS. *L. fermentum* mostró el mejor perfil de crecimiento, seguido por *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. helveticus* y *L. salivarius*.

Entonces se realizaron pruebas de ensayo directo en placa sobre las cepas para medir adicionalmente la actividad de colesterol. Se midió la actividad de hidrolasa de sales biliares (BSH) de células en reposo para evaluar la liberación de aminoácidos de la hidrólisis de ácidos biliares conjugados. Se midió la desconjugación de sales biliares (basada en la liberación de ácido cólico libre) y finalmente se evaluó la co-precipitación de colesterol con bilis desconjugada. La Tabla 2 a continuación muestra los resultados del ensayo directo en placa.

Tabla 2

| Bacterias             | 1ª serie | 2ª serie | 3ª serie |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| <i>L. casei</i>       | Y        | Y        | Y        |
| <i>L. delbrueckii</i> | Y        | Y        | Y        |
| <i>L. acidophilus</i> | Y        | Y        | Y        |
| <i>L. fermentum</i>   | X        | Y        | Y        |
| <i>L. salivarius</i>  | X        | X        | X        |
| <i>L. halveticus</i>  | Y        | X        | X        |
| <i>L. rhamnosus</i>   | X        | X        | X        |
| <i>L. plantarum</i>   | X        | Y        | Y        |
| <i>L. salivarius*</i> | X        | X        | X        |
| <i>L. fermentum*</i>  | X        | X        | Y        |

Se puede observar que *L. casei*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* tuvieron todos actividad de BSH fiable. Sin embargo, *L. fermentum* y *L. plantarum* también tuvieron crecimientos satisfactorios (2 de las 3 series) y se demostró previamente que *L. plantarum* fue particularmente eficaz en el crecimiento sobre 0,4 % de bilis de buey y 100 mg/L de colesterol como se ilustra en las Figuras 3 y 4.

Comparando los resultados de las cepas que son capaces de crecer en medios que contienen colesterol y las cepas que tienen actividad de BSH, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum* y *L. plantarum* parecieron ser candidatos adecuados para producir e identificar un GOS prebiótico específico.

El GOS prebiótico generado por una cepa específica tiene metabolismo optimizado no solo para producir el GOS, sino también para metabolizarlo (como se genera a partir de un procedimiento enzimático inverso). El GOS se puede incorporar, por tanto, con el probiótico en un simbiótico que crearía un entorno altamente selectivo para el probiótico. Como un probiótico puede tener un beneficio específico para la salud, entonces se puede generar una fórmula simbiótica que se adapta a un beneficio específico para la salud.

## EXPERIMENTO 2

En paralelo con el Experimento 1, se realizó un cribado de alto rendimiento (HTS) inicial de 718 cepas de lactobacilo para evaluar la resistencia a diferentes tipos de sales biliares. Entonces se realizaron experimentos adicionales para investigar la precipitación de la bilis en 286 cepas resistentes para establecer la actividad de hidrolasa de sales biliares.

Las cepas probadas fueron: *Lactobacilli acidophilus*, *Lactobacilli helveticus*, *Lactobacilli alimentarius*, *Lactobacilli brevis*, *Lactobacilli buchneri*, *Lactobacilli casei* (incluyendo las subespecies: *rhamnosus*, *casei*, *tolerans*, *pseudopantarum*, *paracasei*, *alactotus* y *rhamnosus*), *Lactobacilli crispatus*, *Lactobacilli curvatus* (incluyendo la

subespecie: *curvatus*), *Lactobacilli delbrueckii* (incluyendo las subespecies: *bulgaricus* y *lactis*), *Lactobacilli fermentum*, *Lactobacilli panis*, *Lactobacilli paracasei* (incluyendo la subespecie: *paracasei*), *Lactobacilli pentosus*, *Lactobacilli plantarum*, *Lactobacilli rhamnosus*, *Lactobacilli sakei*, *Lactobacilli salivarius* (incluyendo la subespecie: *salivarius*).

- 5 Se cultivaron las cepas durante la noche en MRS a 37 °C. De estos cultivos se prepararon reservas de glicerol y se almacenaron a -80 °C. Se inoculó una placa de microtitulación y se dispusieron todas las cepas por cuadruplicado en placas maestras.

- 10 Las sales biliares usadas en estos experimentos se compraron de Sigma® y fueron del siguiente modo: glicodesoxicolato de sodio (GDCA) (producto de Sigma número G3258, CAS: 16409-34-0); taurodesoxicolato de sodio hidratado (TDCA) (producto de Sigma número T0875, CAS: 207737-97-1) y bilis bovina (bilis de buey) (producto de Sigma número B3883, CAS: 8008-63-7). Las concentraciones de las sales biliares usadas en los experimentos fueron del siguiente modo: 0,5 % de GDCA; 0,5 % de TDCA; 0,5 % de bilis de buey; y 2,0 % de bilis de buey. Se cree que es más probable que los datos *in vitro* usando glicodesoxicolato reflejen la probabilidad de la eficacia de producto y que imite más estrechamente el entorno humano *in vivo*.

- 15 Se cultivaron los cultivos durante la noche en placas de 96 pocillos en MRSA a 37 °C. Entonces se depositaron 5 µL de los cultivos en pocillos que contenían 150 µL de agar de MRSA con sales biliares añadidas en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 48 horas en condiciones aerobias/anaerobias. Se monitorizaron las condiciones de pH para garantizar el apropiado crecimiento de las cepas.

- 20 Los resultados mostraron que ciertas cepas crecen sobre las placas de MRSA en tanto condiciones anaerobias como aerobias. La Tabla 3 a continuación muestra todos los resultados positivos del HTS inicial donde una cepa particular es capaz de crecer (evaluado por medición de DO<sub>600</sub>) en un intervalo de sales biliares en condiciones anaerobias:

Tabla 3

| Especie/cepa de lactobacillus  | Promedio de 0,5 % de TDCA-24 h | Promedio de 0,5% de TDCA-72 h | Promedio de 0,5 % de GDCA-24 h | Promedio de 0,5 % de GDCA-72 h | Promedio de 0,5 % de bilis de buey-24 h | Promedio de 0,5 % de bilis de buey-72 h | Promedio de 2,0 % de bilis de buey-24 h | Promedio de 2,0 % de bilis de buey-72 h |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 293                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 306                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 1692                           | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| <b>Lactobacillus casei</b>     | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| <b>262</b>                     | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 1694                           | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| <b>Lactobacillus plantarum</b> | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 1683                           | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2258                           | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2471                           | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2472                           | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |

| Especie/cepa de lactobacillus                   | Promedio de 0,5 % de TDCA-24 h | Promedio de 0,5% de TDCA-72 h | Promedio de 0,5 % de GDCA-24 h | Promedio de 0,5 % de GDCA-72 h | Promedio de 0,5 % de bilis de buey-24 h | Promedio de 0,5 % de bilis de buey-72 h | Promedio de 2,0 % de bilis de buey-24 h | Promedio de 2,0 % de bilis de buey-72 h |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 2475                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2478                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2480                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2481                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2487                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2490                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2491                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2492                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2534                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2536                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2819                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2826                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2828                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2830                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2831                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 2832                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 4038                                            | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| 299 (1837)                                      | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| AbBio                                           | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| WCFS1 (1836)                                    | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| <b>Lactobacillus salivarius ssp. Salivarius</b> | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |
| NCIMB 30225                                     | Y                              | Y                             | Y                              | Y                              | Y                                       | Y                                       | Y                                       | Y                                       |

La Figura 5 ilustra que muchas cepas crecen bien en MRSA en condiciones aerobias. Como se muestra en la Figura 7, GDCA inhibe el crecimiento de las cepas en todos los casos en condiciones aerobias, pero como se muestra en la Figura 6 en condiciones anaerobias, algunas cepas crecen en GDCA. Se encontró que 2,0 % de bilis de buey inhibía el crecimiento de algunas cepas en tanto condiciones aerobias como anaerobias. Las placas en las Figuras 6 y 7 muestran un buen crecimiento para las siguientes cepas: (*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8026, *Lactobacillus fermentum* ATCC 11976, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus plantarum* AbBio, *Lactobacillus*

*helveticus* LBK-16H, *Lactobacillus plantarum* WCF51 (1836), *Lactobacillus plantarum* NCIMB 30187, *Lactobacillus plantarum* 299 (1837)). Cuando estos resultados se comparan con los datos de crecimiento de cepas comparativas cultivadas en un medio que contiene 100 mg/L de colesterol en el Experimento 1 (y se ilustra en las Figuras 3 y 4), parece que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* tienen excelente crecimiento en presencia de colesterol y son resistentes a las sales biliares y tienen actividad de hidrolasa de sales biliares.

La Tabla 4 a continuación muestra un breve resumen de los resultados de crecimiento:

Tabla 4

| Medio                  | Cepas cultivadas en 20 / 72 horas |
|------------------------|-----------------------------------|
| 0,5 % de TDCA          | 163 / 208                         |
| 0,5 % de GDCA          | 38 / 45                           |
| 0,5 % de bilis de buey | 116 / 160                         |
| 2,0 % de bilis de buey | 84 / 103                          |

Se encontró que un total de 41 cepas crecían en presencia de las tres sales biliares presentes a 0,5 %.

Entonces se evaluó la actividad de hidrolasa de sales biliares en cepas resistentes aplicando 5 µL en "placa de tubos de PCR" (150 µL de agar en tubos de microcentrifugadora de paredes delgadas). Estas placas de tubos se cultivaron en las mismas condiciones que las placas de 96 pocillos (MRS + 0,5 % de TDCA, MRS + 0,5 % de GDCA, MRS + 0,5 % de bilis de buey, MRS + 2,0 % de bilis de buey, MRS sin bilis (control)).

Las placas se incubaron anaeróbicamente a 37 °C y se evaluó la precipitación de bilis (relacionada con la actividad de hidrolasa de sales biliares) después de 24 y 48 h usando el siguiente sistema de puntuación: Crecimiento récord como + o – para actividad de BSH. Entonces se seleccionaron los positivos para el posterior cultivo en línea sobre placas de MRS que contenían 0,5 % de bilis de buey.

Después de 72 horas, se habían identificado cepas positivas. Los cultivos positivos solo mostraron la precipitación en GDCA y TDCA.

La Figura 8 muestra la variedad de cepas usadas en el ensayo de cribado de alto rendimiento inicial.

Después de reducir el número de cepas hasta 24 basándose en la actividad de BSH anterior, se realizó el cribado adicional de la asimilación de colesterol en medio MRS complementado con 0,4 %.

La Tabla 3 a continuación muestra los resultados de las cepas seleccionadas y su % promedio de reducción de colesterol.

Tabla 3

|            | Duplicado biológico 1              | Duplicado biológico 2              | Duplicado biológico 1 | Duplicado biológico 2 | Duplicado biológico 1        | Duplicado biológico 2        | Promedio                     |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Cepa       | DO después de 24 horas crecimiento | DO después de 24 horas crecimiento | Colesterol en mg/l    | Colesterol en mg/l    | % de reducción de colesterol | % de reducción de colesterol | % de reducción de colesterol |
| 306        | 1,58                               | 1,45                               | 21,0                  | 19,6                  | 5,7                          | 12,0                         | 8,9                          |
| 2490       | 1,31                               | 1,28                               | 19,1                  | 21,5                  | 14,4                         | 3,7                          | 9,1                          |
| 2471       | 1,55                               | 1,53                               | 19,7                  | 19,4                  | 11,4                         | 13,1                         | 12,2                         |
| 2475       | 0,72                               | 0,75                               | 19,1                  | 20,0                  | 14,4                         | 10,4                         | 12,4                         |
| 2478       | 1,56                               | 1,5                                | 19,0                  | 19,2                  | 14,7                         | 14,0                         | 14,3                         |
| 2480       | 1,2                                | 1,04                               | 19,3                  | 18,3                  | 13,4                         | 18,0                         | 15,7                         |
| 1708       | 2,2                                | 1,9                                | 18,1                  | 19,4                  | 18,7                         | 13,1                         | 15,9                         |
| 2472       | 1,66                               | 1,95                               | 19,0                  | 17,6                  | 14,9                         | 21,0                         | 17,9                         |
| 2260       | 3,52                               | 3,62                               | 11,5                  | 11,3                  | 48,2                         | 49,1                         | 48,7                         |
| ATCC 11976 | 1,37                               | 1,44                               | 2,63                  | 6,77                  | 71,5                         | 26,8                         | 49,2                         |
| 293        | 3,54                               | 3,27                               | 10,8                  | 11,4                  | 51,7                         | 48,7                         | 50,2                         |
| 1836       | 3,61                               | 3,75                               | 9,7                   | 12,3                  | 56,3                         | 44,6                         | 50,5                         |
| 1837       | 3,6                                | 3,72                               | 10,1                  | 10,0                  | 54,4                         | 54,9                         | 54,7                         |
| 2481^      | 1,45                               | 1,42                               | 1,0                   | 18,4                  | 95,4                         | 17,3                         | 56,3                         |
| 1683       | 4,28                               | 3,92                               | 10,6                  | 8,6                   | 52,4                         | 61,3                         | 56,9                         |
| 2535       | 2,65                               | 2,62                               | 9,1                   | 8,1                   | 59,3                         | 63,5                         | 61,4                         |
| ATCC 11741 | 1,24                               | 1,33                               | 3,43                  | 3,50                  | 62,9                         | 62,1                         | 62,5                         |
| 2826       | 3,28                               | 4,36                               | 7,3                   | 6,8                   | 67,0                         | 69,4                         | 68,2                         |
| 2691       | 3,12                               | 2,68                               | 7,1                   | 5,7                   | 68,2                         | 74,4                         | 71,3                         |
| ATCC 43121 | 3,15                               | 4,52                               | 6,4                   | 4,4                   | 71,4                         | 80,1                         | 75,7                         |
| 2831       | 3,75                               | 3,81                               | 4,5                   | 5,5                   | 79,6                         | 75,4                         | 77,5                         |
| 2830       | 3,22                               | 2,84                               | 5,3                   | 4,5                   | 76,1                         | 79,7                         | 77,9                         |
| 2828       | 3,4                                | 3,02                               | na**                  | 4,0                   |                              | 82,2                         | 82,2                         |
| NCIMB30187 | 2,75                               | 2,58                               | 3,5                   | 4,3                   | 84,4                         | 80,8                         | 82,6                         |

La Figura 9 muestra los resultados de la tabla en un diagrama de barras e ilustra que existe una gran diferencia entre las primeras 8 cepas en comparación con el resto de las cepas.

- 5 La Tabla 4 a continuación y la Figura 10 muestran la asimilación normalizada de colesterol con respecto a la densidad óptica.

Tabla 4

|             | Duplicado biológico 1              | Duplicado biológico 2              | Duplicado biológico 1 | Duplicado biológico 2 | Duplicado biológico 1  | Duplicado biológico 2  | Promedio                             |
|-------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Cepa        | DO después de 24 horas crecimiento | DO después de 24 horas crecimiento | Colesterol en mg/l    | Colesterol en mg/l    | mg de reducción por DO | mg de reducción por DO | mg de reducción de colesterol por OD |
| 306         | 1,58                               | 1,45                               | 21,0                  | 19,6                  | 0,8                    | 1,8                    | 1,3                                  |
| 2490        | 1,31                               | 1,28                               | 19,1                  | 21,5                  | 2,5                    | 0,6                    | 1,5                                  |
| 1708        | 2,2                                | 1,9                                | 18,1                  | 19,4                  | 1,9                    | 1,5                    | 1,7                                  |
| 2471        | 1,55                               | 1,53                               | 19,7                  | 19,4                  | 1,6                    | 1,9                    | 1,8                                  |
| 2478        | 1,56                               | 1,5                                | 19,0                  | 19,2                  | 2,1                    | 2,1                    | 2,1                                  |
| 2472        | 1,66                               | 1,95                               | 19,0                  | 17,6                  | 2,0                    | 2,4                    | 2,2                                  |
| 2260        | 3,52                               | 3,62                               | 11,5                  | 11,3                  | 3,1                    | 3,0                    | 3,0                                  |
| 1836        | 3,61                               | 3,75                               | 9,7                   | 12,3                  | 3,5                    | 2,7                    | 3,1                                  |
| 1683        | 4,28                               | 3,92                               | 10,6                  | 8,6                   | 2,7                    | 3,5                    | 3,1                                  |
| 2480        | 1,2                                | 1,04                               | 19,3                  | 18,3                  | 2,5                    | 3,9                    | 3,2                                  |
| 293         | 3,54                               | 3,27                               | 10,8                  | 11,4                  | 3,3                    | 3,3                    | 3,3                                  |
| 1837        | 3,6                                | 3,72                               | 10,1                  | 10,0                  | 3,4                    | 3,3                    | 3,3                                  |
| 2475        | 0,72                               | 0,75                               | 19,1                  | 20,0                  | 4,5                    | 3,1                    | 3,8                                  |
| 2826        | 3,28                               | 4,36                               | 7,3                   | 6,8                   | 4,6                    | 3,5                    | 4,0                                  |
| ATCC 43121  | 3,15                               | 4,52                               | 6,4                   | 4,4                   | 5,0                    | 3,9                    | 4,5                                  |
| 2831        | 3,75                               | 3,81                               | 4,5                   | 5,5                   | 4,7                    | 4,4                    | 4,6                                  |
| 2535        | 2,65                               | 2,62                               | 9,1                   | 8,1                   | 5,0                    | 5,4                    | 5,2                                  |
| 2691        | 3,12                               | 2,68                               | 7,1                   | 5,7                   | 4,9                    | 6,2                    | 5,5                                  |
| 2830        | 3,22                               | 2,84                               | 5,3                   | 4,5                   | 5,3                    | 6,3                    | 5,8                                  |
| 2828        | 3,4                                | 3,02                               | na*                   | 4,0                   |                        | 6,1                    | 6,1                                  |
| NCIMB 30187 | 2,75                               | 2,58                               | 3,5                   | 4,3                   | 6,8                    | 7,0                    | 6,9                                  |
| ATCC 11976  | 1,37                               | 1,44                               | 2,63                  | 6,77                  | 8,6                    | 5,3                    | 6,9                                  |
| ATCC 11741  | 1,24                               | 1,33                               | 3,43                  | 3,50                  | 8,8                    | 8,2                    | 8,5                                  |
| 2481^       | 1,45                               | 1,42                               | 1,0                   | 18,4                  | 14,7                   | 2,7                    | 8,7                                  |

Entonces se hizo una evaluación comparando los resultados de las cepas basándose en el % de reducción de colesterol (Tabla 5 a continuación) y la reducción de colesterol normalizada a la DO (Tabla 6 a continuación) en el contexto de su posible eficacia de crecimiento en el intestino.

Tabla 5 (los candidatos interesantes están subrayados)

|                   | clasificado por "% de reducción de colesterol" |                                      |                                                               |      |                   |                 |                              |      |                   |                 |                |
|-------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------|-------------------|-----------------|------------------------------|------|-------------------|-----------------|----------------|
|                   | Promedio                                       | Promedio                             | Actividad de BSH; semana 27 (algunas cepas no crecieron - na) |      |                   |                 | Actividad de BSH - semana 30 |      |                   |                 |                |
| Cepa              | % de reducción de colesterol                   | mg de reducción de colesterol por DO | TDCA                                                          | GDCA | 0,5 bilis de buey | 2 bilis de buey | TDCA                         | GDCA | 0,5 bilis de buey | 2 bilis de buey | Especies de L. |
| 306               | 8,9                                            | 1,3                                  | 0                                                             | 0    | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | brevis         |
| 2490              | 9,1                                            | 1,5                                  | 0                                                             | 2    | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 2471              | 12,2                                           | 1,8                                  | 0                                                             | 2    | 0                 | 0               | 0                            | 0    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2475              | 12,4                                           | 3,8                                  | 0                                                             | 0    | 0                 | 0               | 0                            | 3    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2478              | 14,3                                           | 2,1                                  | 0                                                             | 0    | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2480              | 15,7                                           | 3,2                                  | 0                                                             | 0    | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 1708              | 15,9                                           | 1,7                                  | 0                                                             | 1    | 0                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | brevis         |
| 2472              | 17,9                                           | 2,2                                  | 0                                                             | 2    | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 2260              | 48,7                                           | 3,0                                  | 0                                                             | 3    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 293               | 50,2                                           | 3,3                                  | 0                                                             | 0    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 3                 | 3               | brevis         |
| 1836              | 50,5                                           | 3,1                                  | 0                                                             | 1    | 1                 | 0               | 0                            | 1    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 1837              | 54,7                                           | 3,3                                  | 0                                                             | 2    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2481              | 56,3                                           | 8,7                                  | 0                                                             | 2    | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 1683              | 56,9                                           | 3,1                                  | 0                                                             | 3    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 2535              | 61,4                                           | 5,2                                  | 0                                                             | 0    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| ATCC 11976        | 67,3                                           | 6,9                                  | 0                                                             | 0    | 0                 | 0               | 0                            | 0    | 0                 | 0               | fermentum      |
| <u>2826</u>       | <u>68,2</u>                                    | <u>4,0</u>                           | 0                                                             | 3    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>2691</u>       | <u>71,3</u>                                    | <u>5,5</u>                           | 0                                                             | 0    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>ATCC 43121</u> | <u>75,7</u>                                    | <u>4,5</u>                           | 3                                                             | 0    | 2                 | 1               | 3                            | 0    | 0                 | 0               | acidophilus    |
| ATCC 11741        | 75,9                                           | 8,5                                  | na                                                            | na   | na                | na              | 0                            | 0    | 0                 | 0               | salivarius     |
| 2831              | 77,5                                           | 4,6                                  | na                                                            | na   | na                | na              | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>2830</u>       | <u>77,9</u>                                    | <u>5,8</u>                           | 0                                                             | 0    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>2828</u>       | <u>82,2</u>                                    | <u>6,1</u>                           | 0                                                             | 3    | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| NCIM B 30187      | 82,6                                           | 6,9                                  | na                                                            | na   | na                | na              | na                           | na   | na                | na              | plantarum      |

Tabla 6 (los candidatos interesantes están subrayados)

|                   |                              | clasificado por "mg reducción de colesterol normalizada a DO" |      |                                                              |                   |                 |                              |      |                   |                 |                |
|-------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|------------------------------|------|-------------------|-----------------|----------------|
|                   | Promedio                     | Promedio                                                      |      | Actividad de BSH; semana 27 (algunas cepas no crecieron- na) |                   |                 | Actividad de BSH - semana 30 |      |                   |                 |                |
| Cepa              | % de reducción de colesterol | mg reducción de colesterol por OD                             | TDCA | GDCA                                                         | 0,5 bilis de buey | 2 bilis de buey | TDCA                         | GDCA | 0,5 bilis de buey | 2 bilis de buey | Especies de L. |
| 306               | 8,9                          | 1,3                                                           | 0    | 0                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | brevis         |
| 2490              | 9,1                          | 1,5                                                           | 0    | 2                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 1708              | 15,9                         | 1,7                                                           | 0    | 1                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | brevis         |
| 2471              | 12,2                         | 1,8                                                           | 0    | 2                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 0    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2478              | 14,3                         | 2,1                                                           | 0    | 0                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2472              | 17,9                         | 2,2                                                           | 0    | 2                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 2260              | 48,7                         | 3,0                                                           | 0    | 3                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 1836              | 50,5                         | 3,1                                                           | 0    | 1                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 1    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 1683              | 56,9                         | 3,1                                                           | 0    | 3                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 2480              | 15,7                         | 3,2                                                           | 0    | 0                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 293               | 50,2                         | 3,3                                                           | 0    | 0                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 3                 | 3               | brevis         |
| 1837              | 54,7                         | 3,3                                                           | 0    | 2                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2475              | 12,4                         | 3,8                                                           | 0    | 0                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 3    | 1                 | 1               | plantarum      |
| 2826              | 68,2                         | 4,0                                                           | 0    | 3                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>ATCC 43121</u> | <u>75,7</u>                  | <u>4,5</u>                                                    | 3    | 0                                                            | 2                 | 1               | 3                            | 0    | 0                 | 0               | acidophilus    |
| 2831              | 77,5                         | 4,6                                                           | na   | na                                                           | na                | na              | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| 2535              | 61,4                         | 5,2                                                           | 0    | 0                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>2691</u>       | <u>71,3</u>                  | <u>5,5</u>                                                    | 0    | 0                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>2830</u>       | <u>77,9</u>                  | <u>5,8</u>                                                    | 0    | 0                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| <u>2828</u>       | <u>82,2</u>                  | <u>6,1</u>                                                    | 0    | 3                                                            | 1                 | 0               | 0                            | 3    | 0                 | 0               | plantarum      |
| NCIMB 30187       | 82,6                         | 6,9                                                           | na   | na                                                           | na                | na              | na                           | na   | na                | na              | plantarum      |
| ATCC 11976        | 67,3                         | 6,9                                                           | 0    | 0                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 0    | 0                 | 0               | fermentum      |
| ATCC 11741        | 75,9                         | 8,5                                                           | na   | na                                                           | na                | na              | 0                            | 0    | 0                 | 0               | salivarius     |
| 2481              | 56,3                         | 8,7                                                           | 0    | 2                                                            | 0                 | 0               | 0                            | 2    | 1                 | 1               | plantarum      |

Las cepas 2828 (ECGC 13110403), 2830 (ECGC 13110402), 2691 (ECGC 13110401) y ATCC43121 muestran alta reducción del colesterol y buena actividad de BSH en ambos análisis anteriores en las Tablas 5 y 6. Las pruebas *in vitro* realizadas sugieren fuertemente que estas cepas, tanto en combinación entre sí como individualmente, serían adecuadas para su uso en modificar la absorción de colesterol o en el tratamiento de enfermedad cardíaca, diabetes u obesidad en un individuo. Estas cepas se podrían usar conjuntamente con prebióticos específicos del crecimiento para incentivar y soportar el crecimiento.

Entonces se realizaron experimentos para mirar cómo de bien se las arreglaron varias cepas con ser liofilizadas y también la posterior actividad de BSH hacia sales biliares específicas de tres cepas seleccionadas.

La primera etapa era fermentar varias cepas. Se encontró que las cepas acidificaron todos los vehículos y crioprotectores elegidos. Se evaluó que las formulaciones deberían trabajar en frío durante la producción. La elección de vehículos y sus concentraciones finales fueron del siguiente modo: 82 % de MD + 14 % de sorbitol (MD = maltodextrina) (resto del medio, y bacterias) y 82 % de MD + 14 % de sacarosa. Todas las cepas crecieron bien sobre las fuentes de nitrógeno seleccionadas con una mezcla de extracto de levadura y peptona de soja. No se sugirieron ingredientes animales para la validación, pero se evaluó que la peptona de soja puede provocar precipitado insoluble, que podría impedir el procesamiento aguas abajo en el futuro. Idealmente, se evaluó que el medio que se iba a usar en la producción se basa en 100 % de YE, sin otras fuentes de nitrógeno. La Tabla 7 a continuación muestra el resumen de los resultados de las tasas de fermentación y viabilidad para las tres cepas elegidas (B4321, B2828 y B2830) en los medios. En los siguientes datos, B4321 se refiere a la misma cepa que B2691 denominado antes.

Tabla 7

| Cepa                                       | B4321 (B2691) |          | B2828    |          | B2830    |          |
|--------------------------------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Medio                                      | Sorbitol      | Sacarosa | Sorbitol | Sacarosa | Sorbitol | Sacarosa |
| Coagulación                                | Sí            |          | NO       |          | NO       |          |
| DOMáx-fermentación                         | 9,5           |          | 12,9     |          | 15,7     |          |
| UFC-fermentación                           | 7,5E+09       |          | 1,4E+10  |          | 1,6E+10  |          |
| Células/DO                                 | 8E+08         |          | 1E+09    |          | 1E+09    |          |
| Factor de conversión en vehículo           | 24%           | 24%      | 18%      | 17%      | 14%      | 14%      |
| UFC en disolución de vehículo (30 % de DM) | 3,9E+09       | 4,1E+09  | 2,1E+09  | 2,5E+09  | 1,8E+09  | 2,2E+09  |
| UFC en polvo                               | 3,24E+09      | 4,12E+09 | 2,35E+09 | 2,82E+09 | 1,38E+09 | 2,62E+09 |
| Supervivencia a la liofilización           | 28%           | 34%      | 39%      | 39%      | 27%      | 41%      |

La Figura 11 muestra los recuentos de polvo para varias cepas, mientras que la Figura 12 muestra la supervivencia a la liofilización de las mismas cepas.

La Figura 13 muestra la supervivencia de las cepas en el estómago. La cepa B4321 (B2691) sobrevive claramente mejor en las condiciones probadas ~109 UFC/mL de células estacionarias incubadas durante 60 min a pH 2,45 en una disolución de Na/K/HCl con pepsina y lipasa.

Las Figuras 14 y 15 muestran la actividad de hidrolasa de sales biliares en las cepas elegidas. B2828 y B2830 convirtieron casi 100 % del sustrato en 3 horas. Por tanto, no apareció discriminación que fuera posible entre estas cepas.

#### Depósito de material biológico

Se hizo un depósito de material biológico a efectos de una solicitud de patente de Reino Unido en la Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC) en el R. U. La NCTC es una Autoridad Internacional de Depósito (IDA) reconocida en virtud del Tratado de Budapest.

Cada una de las cepas depositadas en la NCTC en el R. U. ha sido asignada con un número con el prefijo ECGC. ECGC representa la Colección General de Cultivos Europeos.

Se debe observar que B2691 (ECGC 13110401) fue originalmente fenotípicamente clasificada como *L. reteri* tras el depósito en la NCTC. Se ha encontrado posteriormente que es un *L. plantarum* basado en análisis genético y esta cepa se denomina en la presente solicitud B2691 y se renombró B4321 en experimentos posteriores.

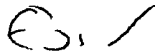
|                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Para<br>OptiBiotix Health Ltd<br>2 Hann Road<br>Rownhams<br>Southampton<br>Hampshire<br>SO16 8LN<br><br>NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE SE<br>CONCEDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD | DECLARACIÓN DE VIABILIDAD<br>concedida según la Regla 10.2 por la<br>AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br>identificada en la siguiente página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                                                                                     | II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nombre: OptiBiotix Health Ltd<br><br>Dirección:<br>2 Hann Road<br>Rownhams<br>Southampton<br>Hampshire<br>SO16 8LN                                                                                                                                                                 | Número de acceso dado por la<br>AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL<br>13110401<br><br>Fecha del depósito o de la transferencia:<br>04 de noviembre de 2013 <sup>1</sup> |
| III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                          |
| La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se probó el 04 de noviembre de 2013 <sup>2</sup> . En esa fecha, dicho microorganismo fue:<br><input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable<br><input type="checkbox"/> <sup>3</sup> ya no era viable |                                                                                                                                                                          |

**1** Indicar la fecha del depósito original o, si se ha hecho un depósito nuevo o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

5 **2** En los casos citados en la regla 10.2(a)(ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.

**3** Marcar con una cruz el recuadro aplicable

|                                                                                                                                          |                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD<sup>4</sup></b>                                               |                                                                                                                       |
| El depósito de patente NIZO 2691 número de acceso 13110401 se probó según el propio protocolo del depositante y se mostró que era viable |                                                                                                                       |
| <b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                            |                                                                                                                       |
| Nombre: Supervisor de patentes de NCTC                                                                                                   | Firma(s) de las persona(s) que tienen las facultades para representar a la Autoridad Internacional de Depósito        |
| Dirección: Public Health England<br>Culture Collections<br>Porton Down<br>SALISBURY SP4 0JG<br>Reino Unido                               | <br>Fecha: 21 de noviembre de 2013 |

**4** Rellenar si se ha solicitado la información y si los resultados de la prueba fueron negativos.

|                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Para<br>OptiBiotix Health Ltd<br>2 Hann Road<br>Rownhams<br>Southampton<br>Hampshire<br>SO16 8LN<br><br>NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE SE CONCEDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD | DECLARACIÓN DE VIABILIDAD<br>concedida según la Regla 10.2 por la<br>AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br>identificada en la siguiente página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>                                                                                                                             |
| Nombre: OptiBiotix Health Ltd<br>Dirección:<br>2 Hann Road<br>Rownhams<br>Southampton<br>Hampshire<br>SO16 8LN                                                                                                                                                                     | Número de acceso dado por la<br>AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL<br>13110402<br><br>Fecha del depósito o de la transferencia:<br>04 de noviembre de 2013 <sup>1</sup> |
| <b>III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD</b>                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se probó el 04 de noviembre de 2013 <sup>2</sup> . En esa fecha, dicho microorganismo fue:<br><input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable<br><input type="checkbox"/> <sup>3</sup> ya no era viable |                                                                                                                                                                          |

**1** Indicar la fecha del depósito original o, si se ha hecho un depósito nuevo o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

**5 2** En los casos citados en la regla 10.2(a)(ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.

**3** Marcar con una cruz el recuadro aplicable

|                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD<sup>4</sup></b>                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                        |
| El depósito de patente NIZO 2830 número de acceso 13110402 se probó según el propio protocolo del depositante y se mostró que era viable                            |                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <p>Nombre: Supervisor de patentes de NCTC</p> <p>Dirección: Public Health England<br/>Culture Collections<br/>Porton Down<br/>SALISBURY SP4 0JG<br/>Reino Unido</p> | <p>Firma(s) de las persona(s) que tienen las facultades para representar a la Autoridad Internacional de Depósito</p> <p></p> <p>Fecha: 21 de noviembre de 2013</p> |

**4** Rellenar si se ha solicitado la información y si los resultados de la prueba fueron negativos.

|                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Para</p> <p>OptiBiotix Health Ltd</p> <p>2 Hann Road</p> <p>Rownhams</p> <p>Southampton</p> <p>Hampshire</p> <p>SO16 8LN</p> <p><b>NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE SE<br/>CONCEDE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD</b></p> | <p><b>DECLARACIÓN DE VIABILIDAD</b></p> <p>concedida según la Regla 10.2 por la</p> <p><b>AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b></p> <p>identificada en la siguiente página</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                                                                                                  | II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Nombre: OptiBiotix Health Ltd</p> <p>Dirección:</p> <p>2 Hann Road</p> <p>Rownhams</p> <p>Southampton</p> <p>Hampshire</p> <p>SO16 8LN</p>                                                                                                                                                   | <p>Número de acceso dado por la</p> <p>AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL</p> <p>13110403</p> <p>Fecha del depósito o de la transferencia:</p> <p>04 de noviembre de 2013<sup>1</sup></p> |
| <p><b>III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                            |
| <p>La viabilidad del microorganismo identificado en II. anteriormente se probó el 04 de noviembre de 2013<sup>2</sup>. En esa fecha, dicho microorganismo fue:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable</p> <p><input type="checkbox"/> <sup>3</sup> ya no era viable</p> |                                                                                                                                                                                            |

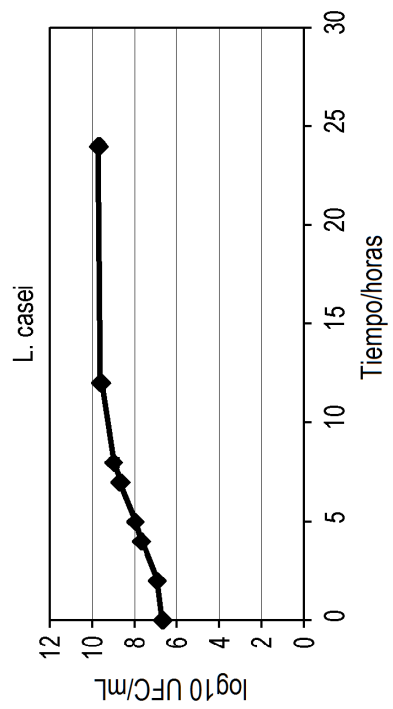
- |   |                                                                                                                                                                                         |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Indicar la fecha del depósito original o, si se ha hecho un depósito nuevo o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia). |
| 5 | 2 En los casos citados en la regla 10.2(a)(ii) y (iii), referirse a la prueba de viabilidad más reciente.                                                                               |
|   | 3 Marcar con una cruz el recuadro aplicable                                                                                                                                             |

|                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE HA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD<sup>4</sup></b>                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| El depósito de patente NIZO 2828 número de acceso 13110403 se probó según el propio protocolo del depositante y se mostró que era viable                            |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <p>Nombre: Supervisor de patentes de NCTC</p> <p>Dirección: Public Health England<br/>Culture Collections<br/>Porton Down<br/>SALISBURY SP4 0JG<br/>Reino Unido</p> | <p>Firma(s) de las persona(s) que tienen las facultades para representar a la Autoridad Internacional de Depósito</p>  <p>Fecha: 21 de noviembre de 2013</p> |

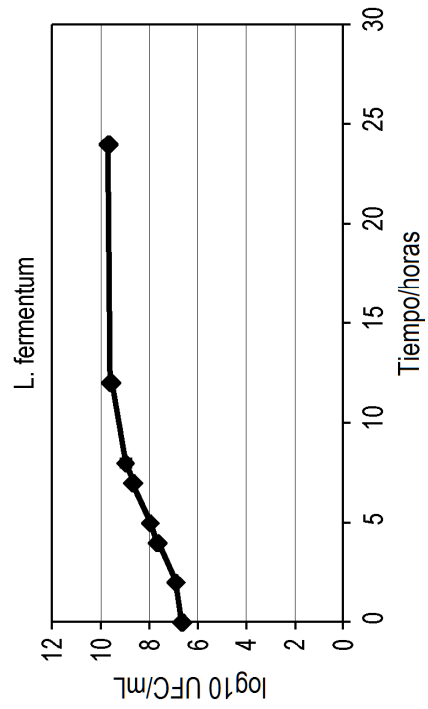
**4** Rellenar si se ha solicitado la información y si los resultados de la prueba fueron negativos.

## REIVINDICACIONES

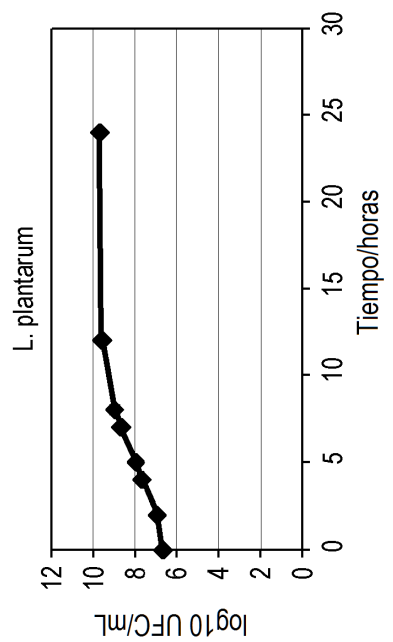
1. Una composición que comprende una cepa de *Lactobacilli* que tiene una elevada actividad de hidrolasa de sales biliares y un agente modificador de colesterol; en donde la cepa es *Lactobacillus plantarum* 2830 (ECGC 13110402).
2. La composición según la reivindicación 1, para su uso en modificar la absorción de colesterol en un individuo.
- 5 3. La composición según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de colesterol alto, enfermedad cardíaca, diabetes u obesidad.
4. La composición según cualquier reivindicación precedente, en donde el agente modificador de colesterol comprende un oligosacárido, y opcionalmente en donde el oligosacárido se produce a partir de uno o más de los siguientes:  $\beta$ -galactosidasas,  $\alpha$ -galactosidasas,  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosidasas,  $\alpha$ -manosidasas, o  $\beta$ -xilosidasas.
- 10 5. La composición según la reivindicación 4, en donde la cepa bacteriana es capaz de producir los oligosacáridos por reacción enzimática inversa.
6. La composición según cualquier reivindicación precedente, en donde el agente modificador de colesterol comprende un medio de crecimiento selectivo para la cepa de *Lactobacilli*.
- 15 7. La composición según cualquier reivindicación precedente, en donde la cepa está en una cantidad en el intervalo de  $10^5$  ufc/g a  $10^{12}$  ufc/g.
8. La composición según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición está encapsulada.
9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o 4 a 8 cuando es dependiente de las reivindicaciones 1 o 2, en forma de un alimento.
- 20 10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o 4 a 9 cuando es dependiente de las reivindicaciones 1 o 2, como suplemento dietético.
11. La composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende además uno o más principios activos seleccionados de vitaminas, minerales, productos fitoquímicos, antioxidantes, y combinaciones de los mismos.
12. La composición según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un prebiótico o un prebiótico secundario si el agente modificador de colesterol comprende un prebiótico.
- 25 13. Un método de producción de la composición de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende mezclar una cepa de *Lactobacilli* que tiene una elevada actividad de hidrolasa de sales biliares con un agente modificador de colesterol en una cantidad biológicamente eficaz; en donde la cepa es *Lactobacillus plantarum* 2830 (ECGC 13110402).



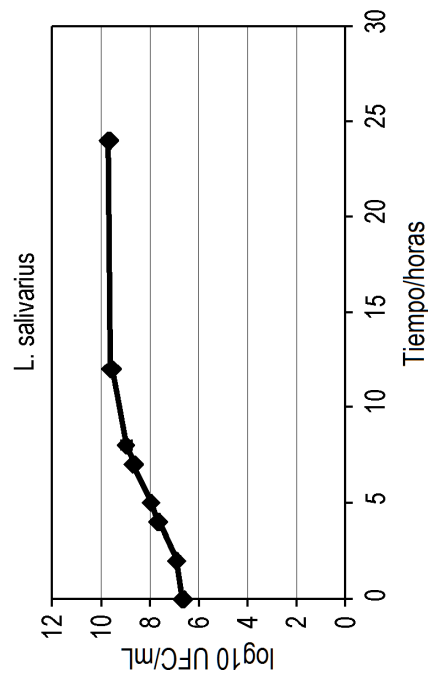
**FIG. 1B**



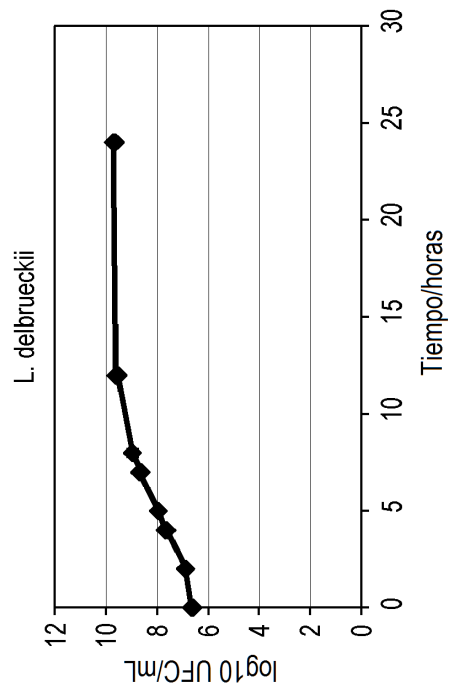
**FIG. 1D**



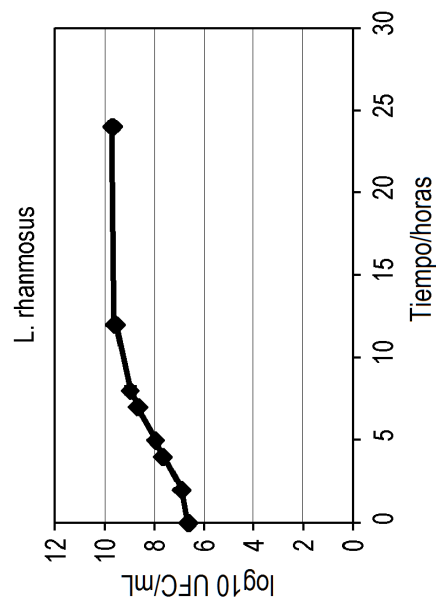
**FIG. 1A**



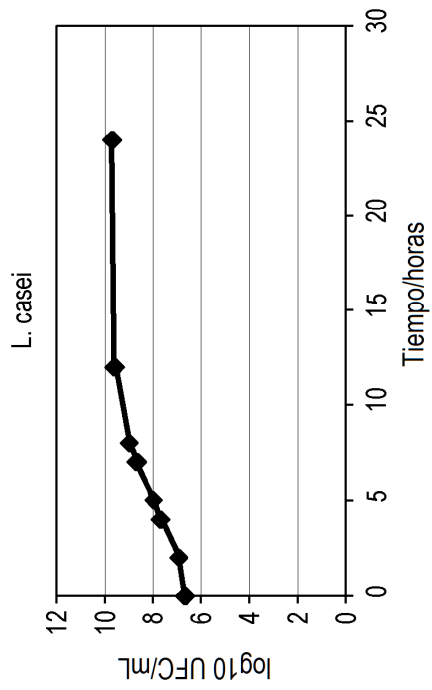
**FIG. 1C**



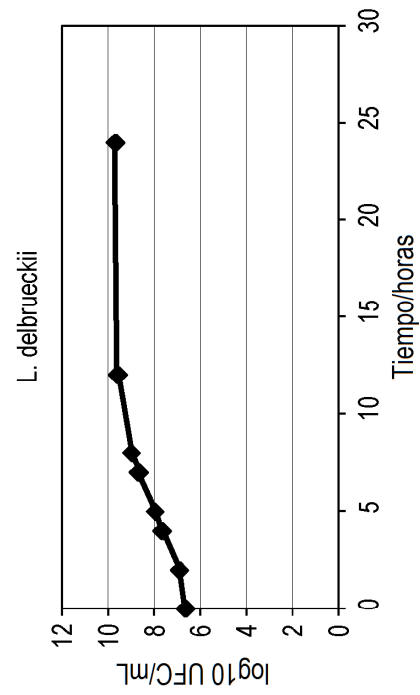
**FIG. 1F**



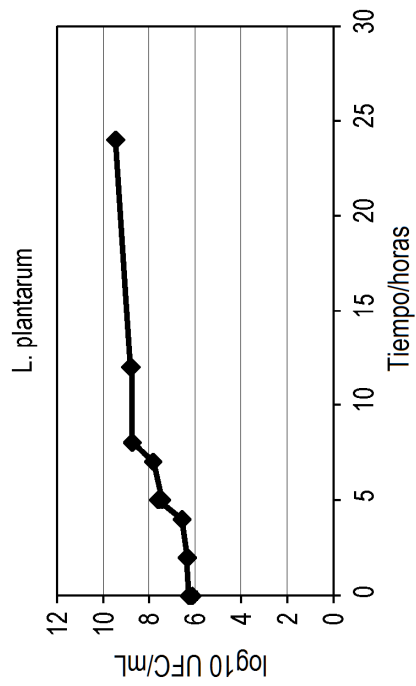
**FIG. 1E**



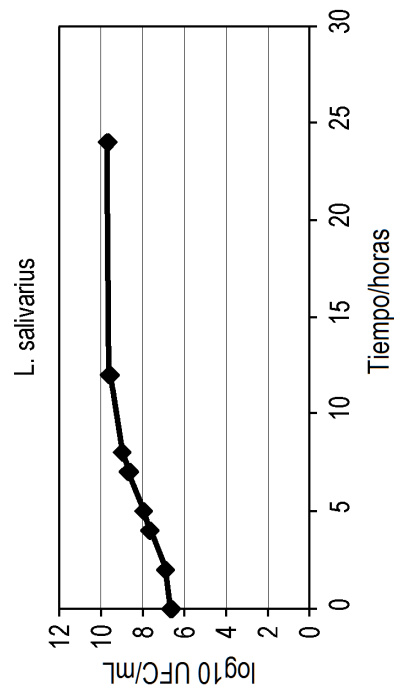
**FIG. 2B**



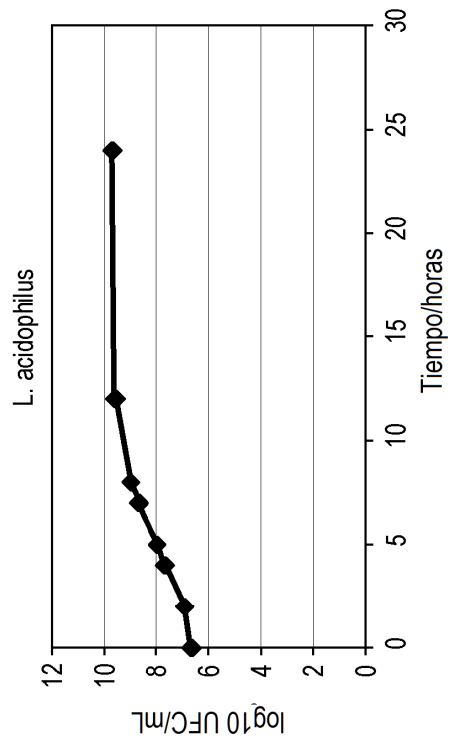
**FIG. 2D**



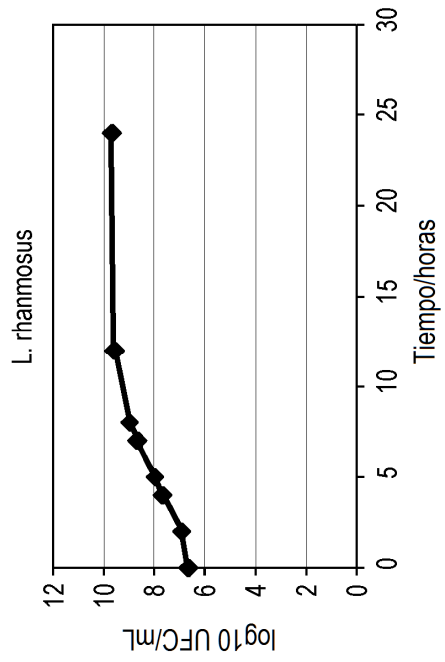
**FIG. 2A**



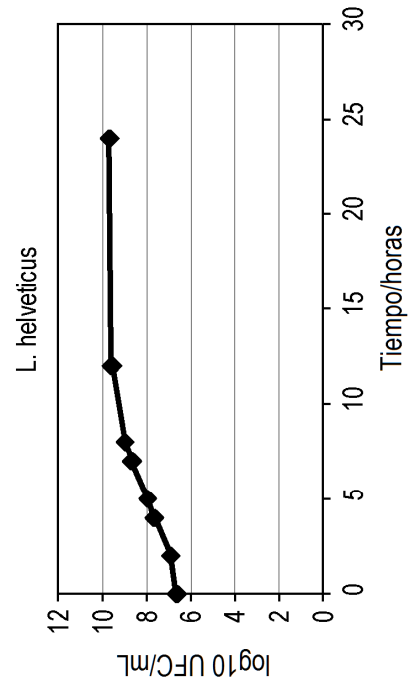
**FIG. 2C**



**FIG. 2F**



**FIG. 2E**



**FIG. 2G**

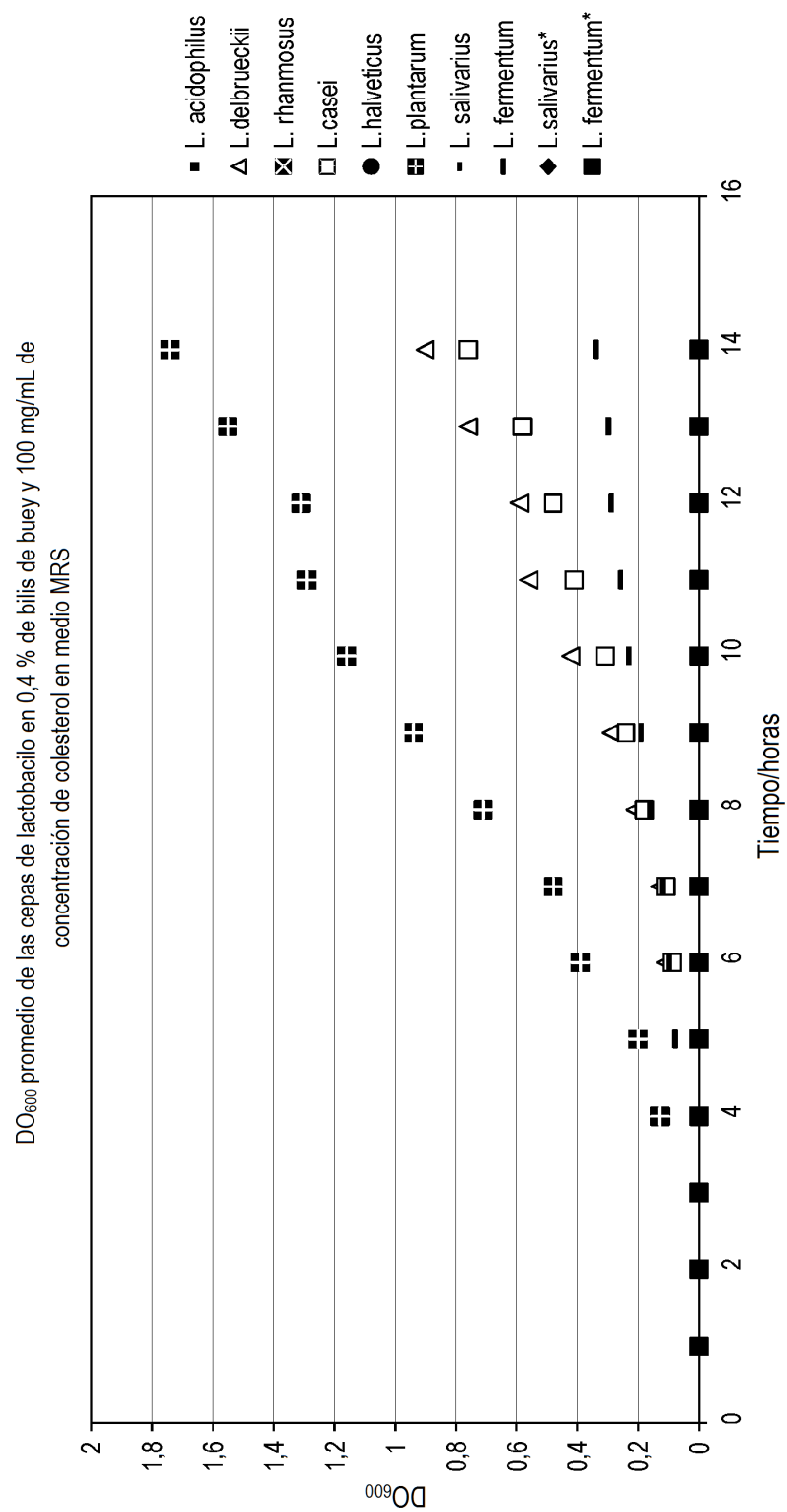


FIG. 3

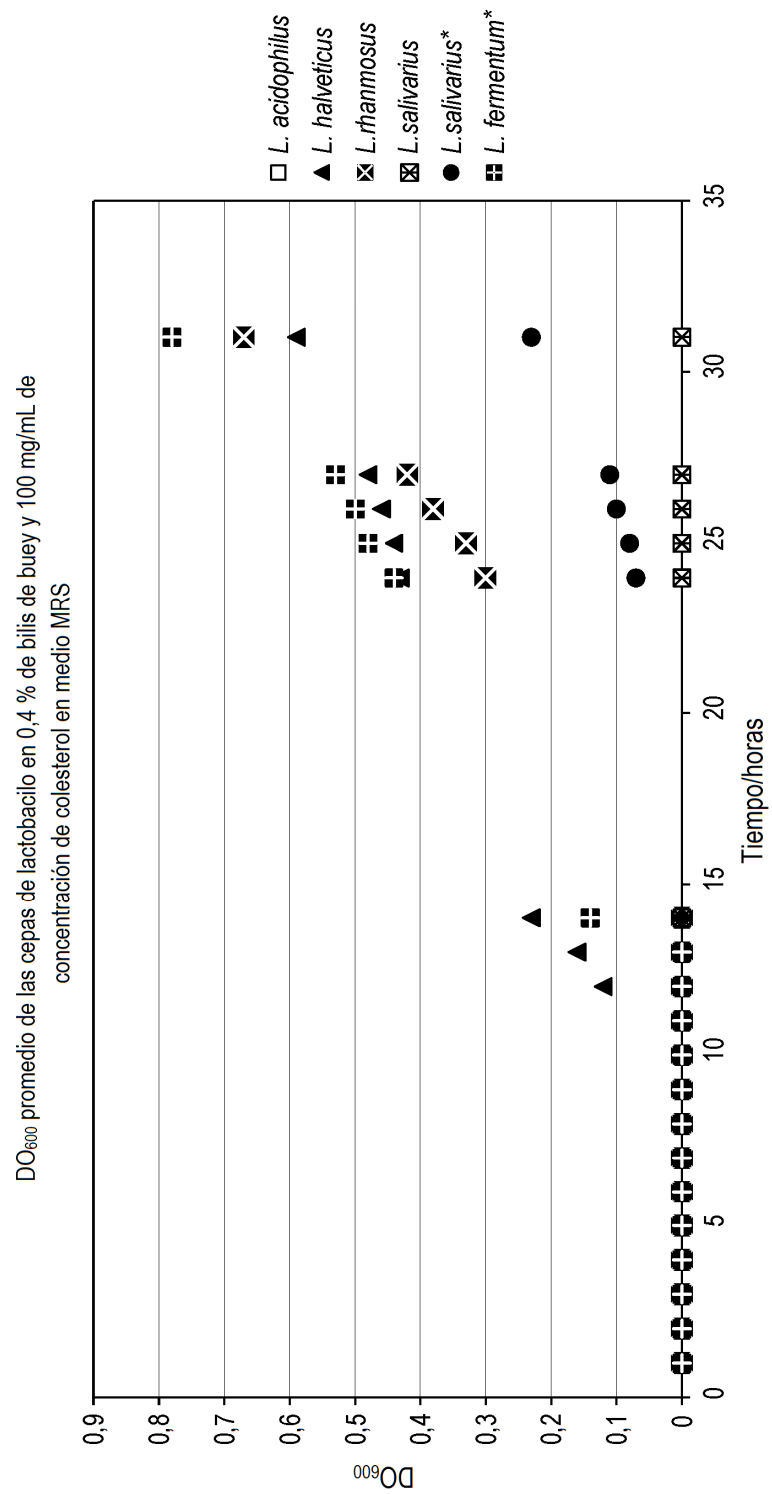


FIG. 4

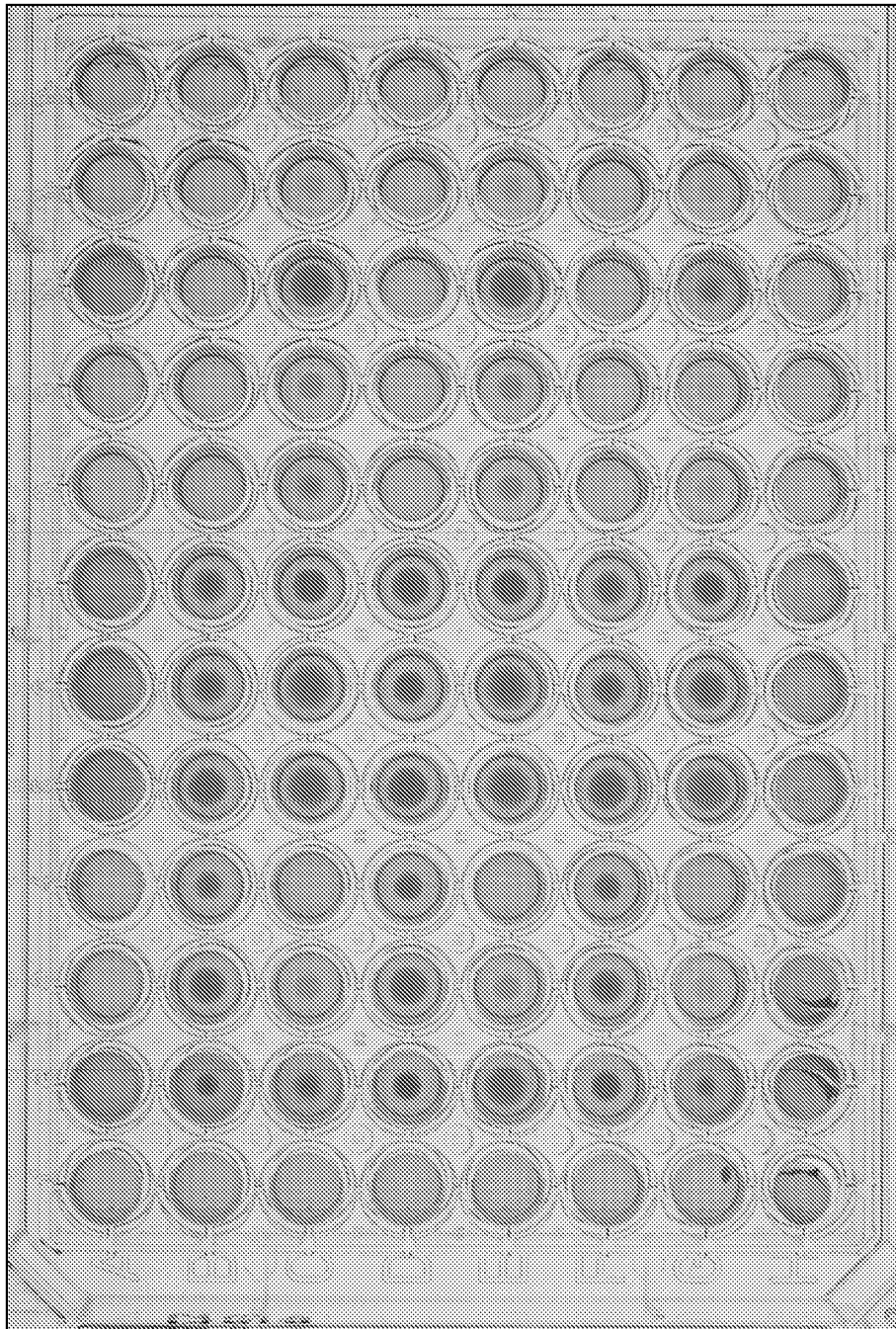


FIG. 5

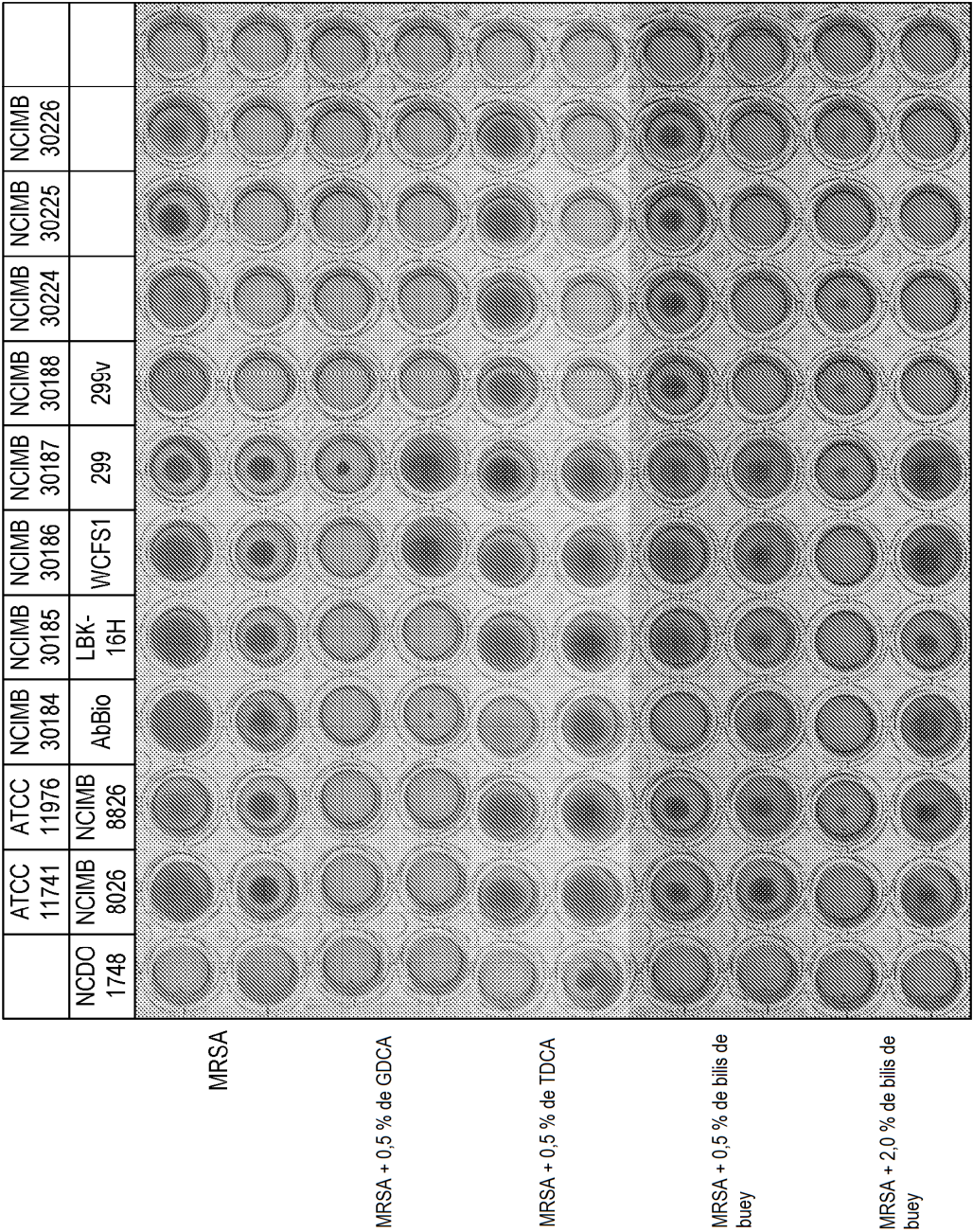


FIG. 6

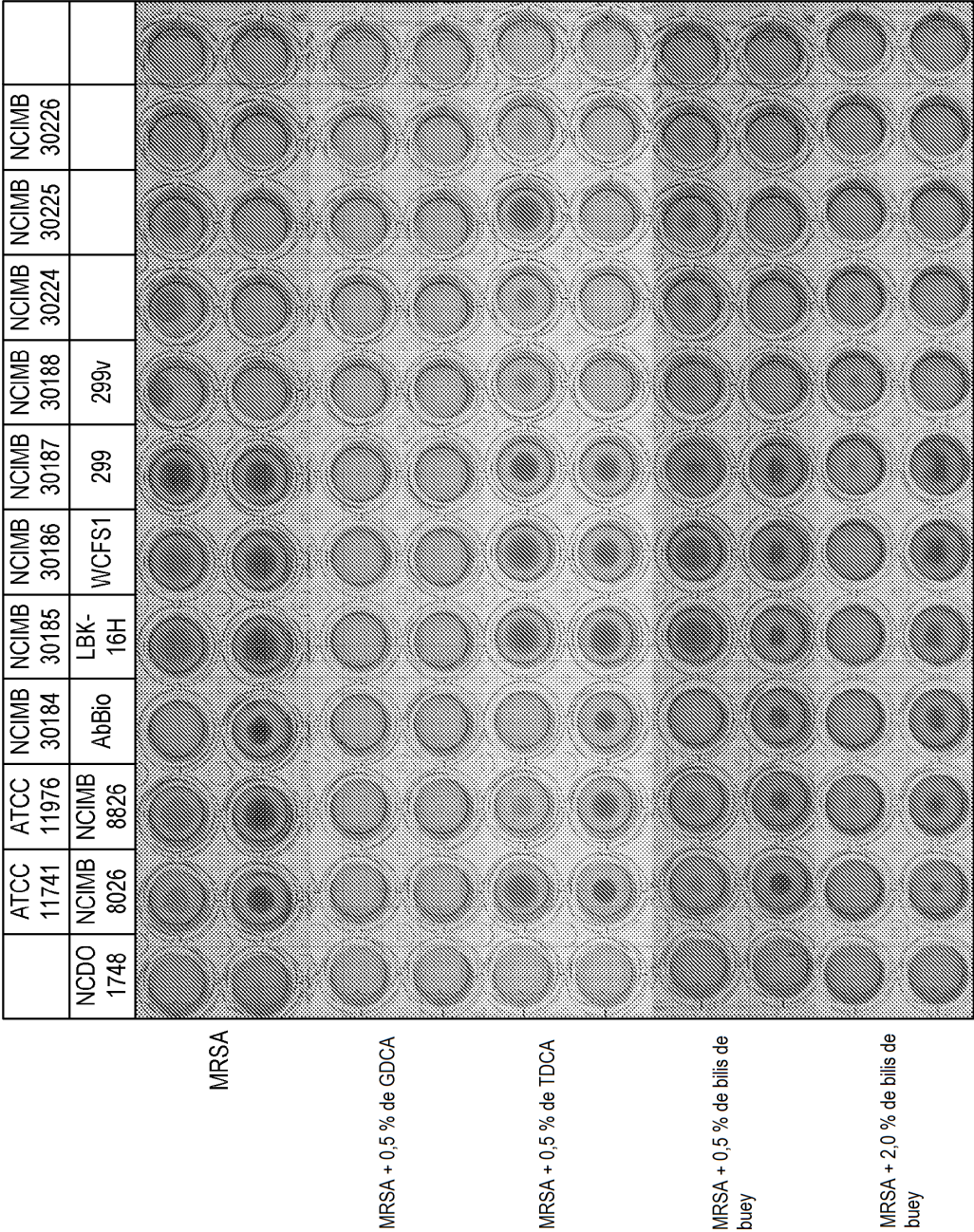


FIG. 7

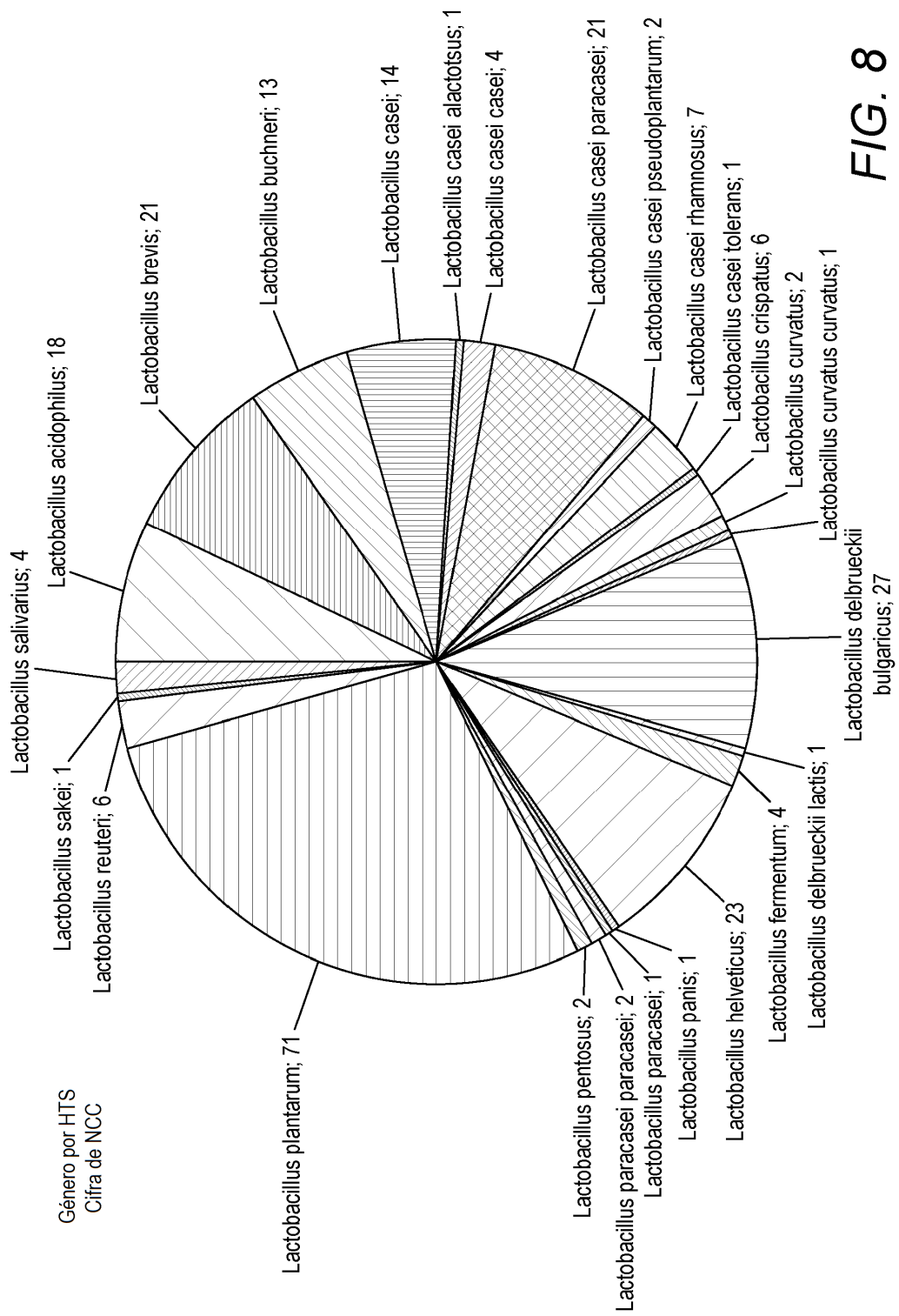
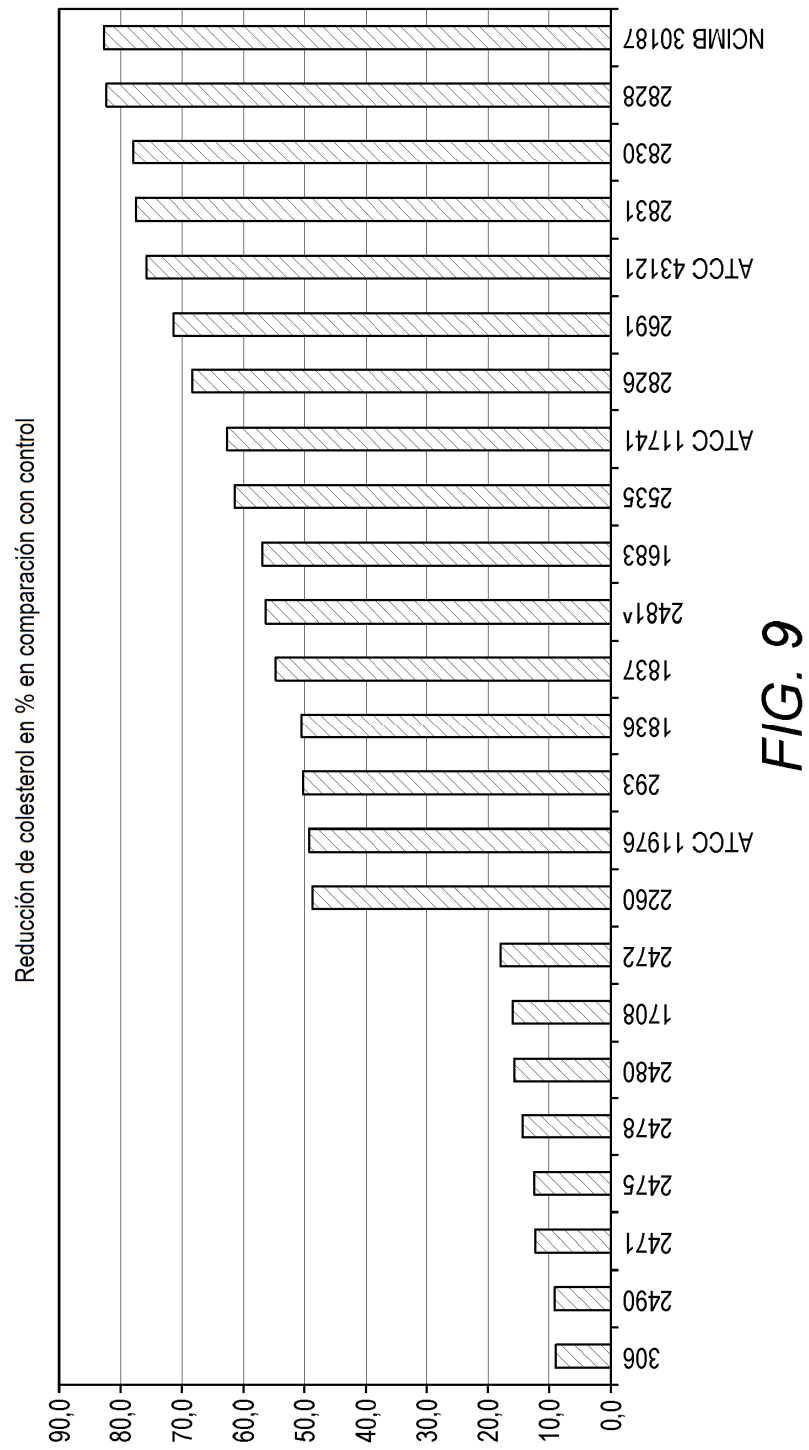


FIG. 8



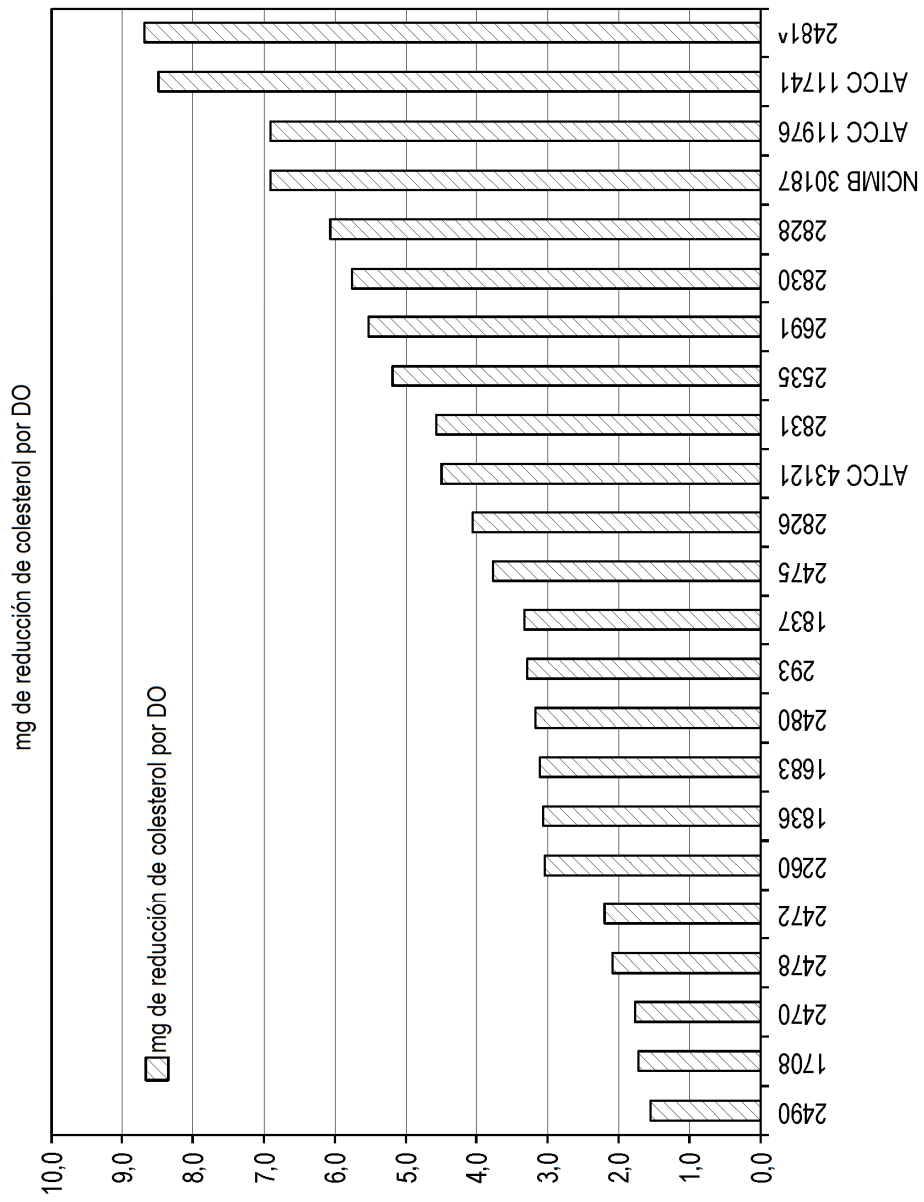
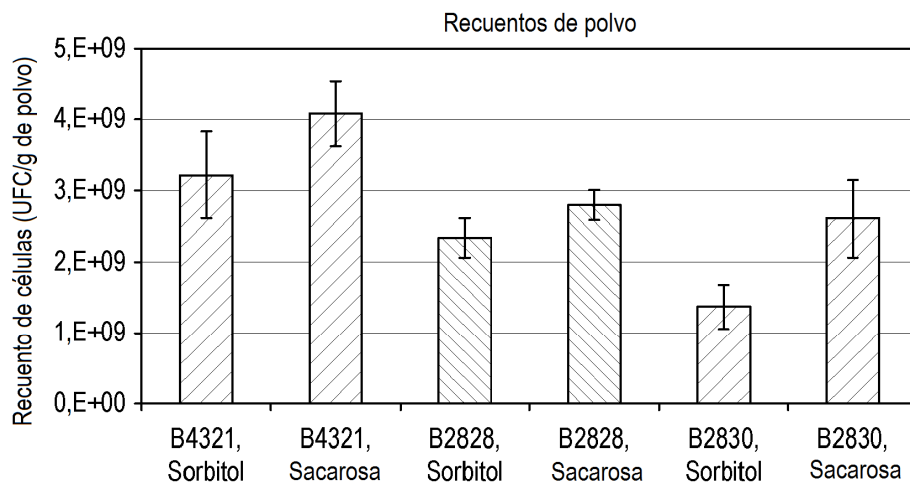
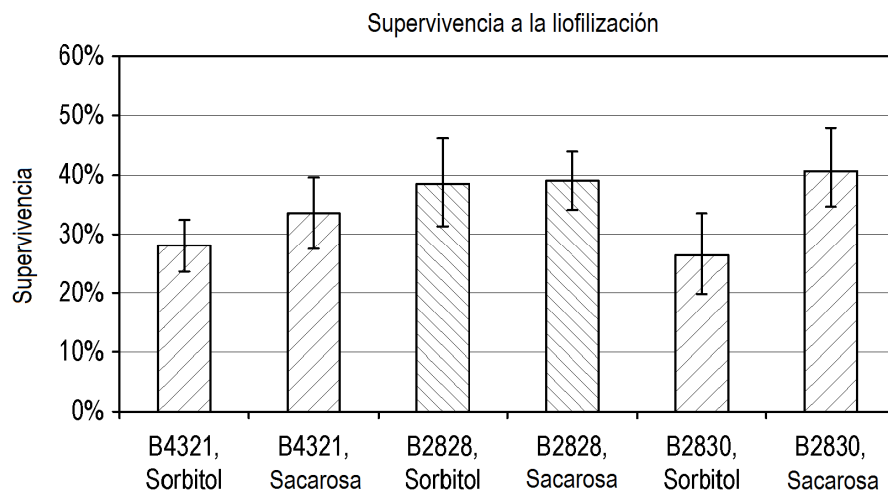


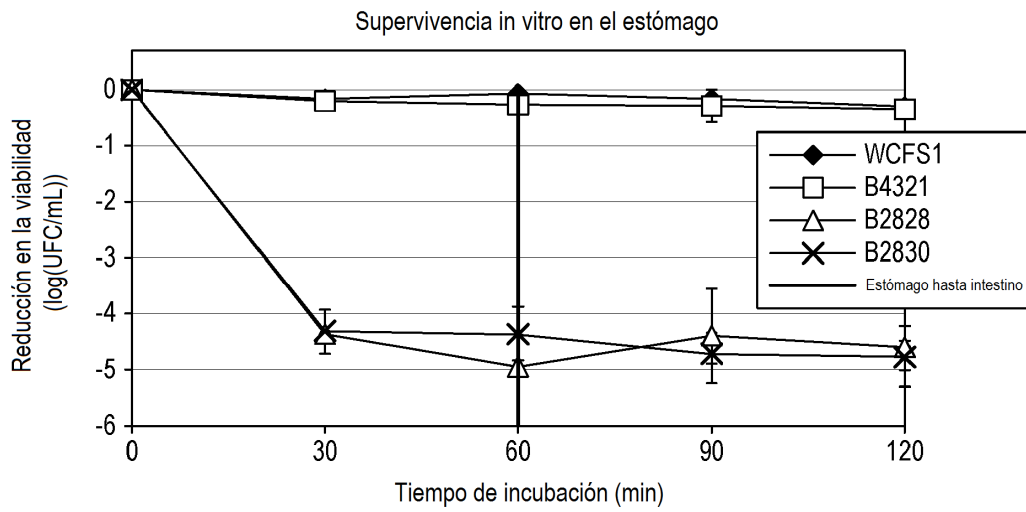
FIG. 10



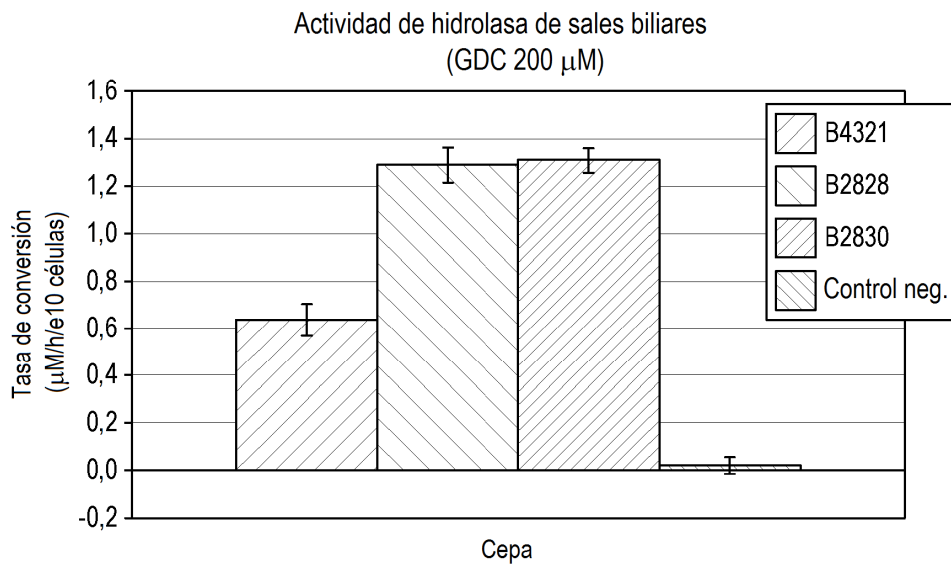
**FIG. 11**



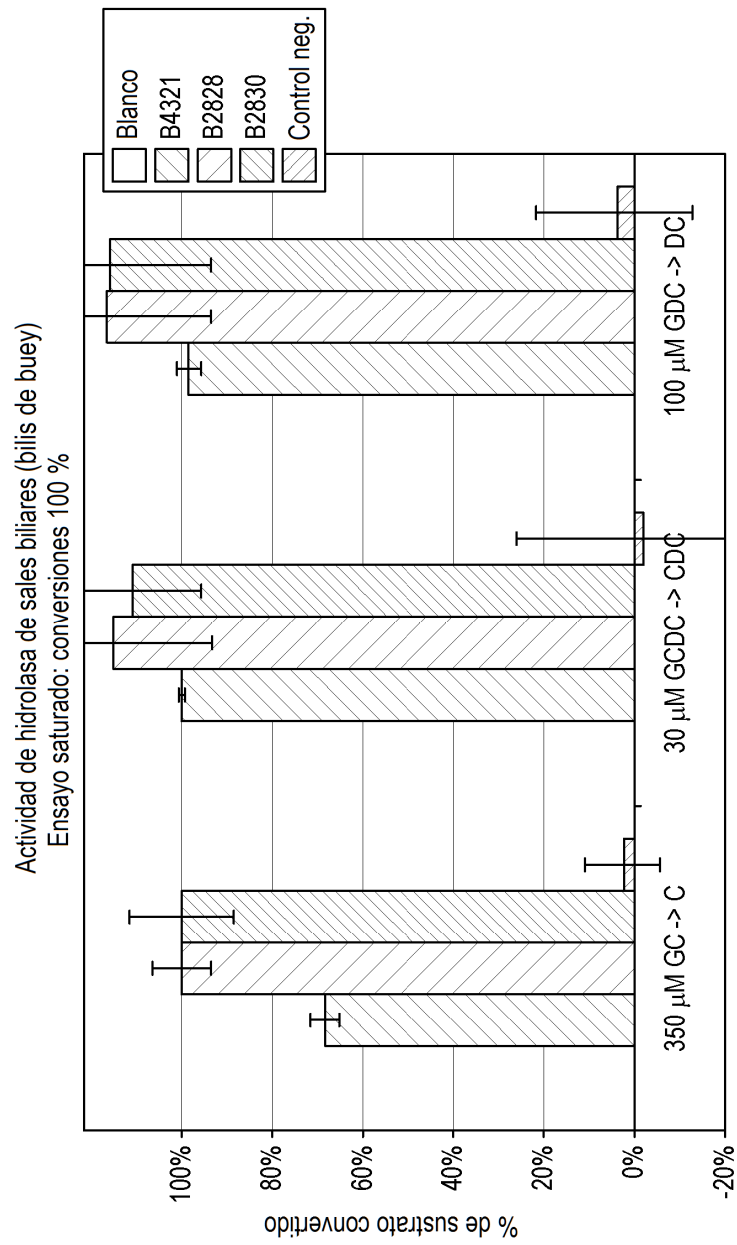
**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**