

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 868 135**

51 Int. Cl.:

C12H 6/02 (2009.01)

A23F 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008** **E 13172175 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.03.2021** **EP 2638807**

54 Título: **Composiciones de bebidas**

30 Prioridad:

16.10.2007 US 999243 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FARMER, SEAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 868 135 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de bebidas

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente U.S.S.N. 60/999.243, depositada el 16 de octubre de 2007.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud se refiere a composiciones de bebidas que comprenden bacterias productoras de ácido láctico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La microflora gastrointestinal desempeña una serie de funciones vitales en el mantenimiento de la función del tracto gastrointestinal y la salud fisiológica general. El crecimiento y el metabolismo de las muchas especies de bacterias individuales que habitan el tracto gastrointestinal dependen principalmente de los sustratos disponibles, la mayoría de los cuales se derivan de la dieta. (Véase, por ejemplo, Gibson GR y col., 1995. Gastroenterología 106: 975-982; Christl, SU y col., 1992. Gut 33: 1234-1238).

20

El documento WO 2005/117926A1 se refiere a un agente para la mejora de la flora bacteriana intestinal que comprende un extracto de corteza de árbol como ingrediente activo; y alimento que comprende un extracto de corteza de árbol y al menos un miembro seleccionado entre oligosacáridos, *Bacillus bifidus* y *Lactobacillus*.

25

El documento JP 2000/093162A describe un procedimiento para obtener bacterias de ácido láctico esporógeno a bajo coste, que tiene una alta estabilidad en una solución acuosa ácida y es útil para varios tipos de alimentos y bebidas o similares mediante el cultivo de bacterias de ácido láctico esporógeno en un medio de cultivo que tiene un valor de pH ácido específico en la etapa inicial de cultivo e incluyendo un contenido específico de hidrolizado de soja.

30

El documento JP 11.169.245 describe una bebida con una excelente capacidad de almacenamiento obtenida al agregar *Lactobacillus sporogenes* con un valor D_{100} (min) de ≥ 2.8 (pref. ≥ 3.0) en su solución ácida de pH 3.5 (*Bacillus coagulans*) en aproximadamente 10^8 recuentos a una bebida de pH 3-4 correspondientes a una sola ingesta para mantener las bacterias como esporas maduras sin germinación de esporas.

35

El documento EP 1.819.579 describe un sistema espesante de mezcla seca para productos de bebida preparados con leche. La composición de mezcla seca comprende un tampón, un hidrocoloide y un agente quelante que comprende pirofosfato tetrasódico.

40

El documento WO 2005/055934 describe la utilización de bacterias probióticas productoras de ácido láctico, por ejemplo, *Bacillus coagulans*, en una composición nutricional para aumentar la absorción de carbohidratos dentro del tracto gastrointestinal de un mamífero.

45

Los organismos probióticos no son patógenos ni toxigénicos, conservan la viabilidad durante el almacenamiento y sobreviven al paso por el estómago y el intestino delgado. Dado que los probióticos generalmente no colonizan permanentemente al huésped, deben ingerirse regularmente para que persistan las propiedades promotoras de la salud. Estos hallazgos han llevado a intentos de modificar la composición y las actividades metabólicas de la comunidad bacteriana a través de la dieta, principalmente con probióticos, que son complementos alimenticios microbianos vivos.

50

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención está dirigida al descubrimiento sorprendente de que las bacterias productoras de ácido láctico, en particular las especies de *Bacillus*, permanecen viables y conservan sus propiedades probióticas beneficiosas en las composiciones de bebidas, tales como las preparadas a altas temperaturas (por ejemplo, 80, 90, 100, 120 o 150°C) en agua hirviendo. La invención describe composiciones para bebidas que contienen esporas. Específicamente, la invención proporciona una composición de bebida que incluye bacterias *Bacillus coagulans* aisladas y uno o más ingredientes no bacterianos, donde dichos uno o más ingredientes no bacterianos (i) se seleccionan del grupo que consiste en granos de café o fragmentos de los mismos y café en polvo; o (ii) comprenden materia vegetal deshidratada para preparar té, donde dichas bacterias *Bacillus coagulans* comprenden al menos un 85 % de esporas y donde dicha bacteria *Bacillus coagulans* comprende la cepa GBI-30 (Número de designación ATCC PTA-6086).

60

En un aspecto adicional, la materia vegetativa deshidratada se obtiene de *Camellia sinensis*, preferiblemente donde dicha materia vegetativa deshidratada se selecciona del grupo que consiste en hojas procesadas, brotes, raíces y/o ramitas. En un aspecto adicional, la composición de bebida es té verde, té negro, té oolong, té amarillo o té blanco, 5 preferiblemente donde dicha composición de bebida es té instantáneo o té preparable, opcionalmente té descafeinado.

Alternativamente, la materia vegetal deshidratada se obtiene de una especie distinta de *Camellia sinensis*, preferiblemente en la que dicha composición de bebida es té de hierbas, más preferiblemente té de rosa mosqueta, 10 té de manzanilla, té de jiaogulan, té de jengibre, té de menta, té de limoncillo, té de ginseng y té de rooibos.

El *Bacillus coagulans* aislado puede comprender entre aproximadamente un 0,1 % y aproximadamente un 50 % en peso de la composición de bebida. Preferiblemente, el *Bacillus coagulans* aislado comprende entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 10 % en peso de la composición de bebida. Preferiblemente, la 15 cantidad de bacterias de *Bacillus coagulans* es de aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colonias (CFU) de bacterias por bolsita de té (aproximadamente 50 mg de bacterias por bolsita de té en aproximadamente 2-3 gramos de té).

Las bacterias *Bacillus coagulans* incluidas en las composiciones de bebida de esta invención incluyen la cepa GBI- 20 30 de *Bacillus coagulans*, Número de Designación ATCC PTA-6086; consulte la Patente de EE. UU. 6.849.256 de Farmer.

Preferiblemente, el *Bacillus coagulans* aislado está en forma de espora. La invención proporciona la activación de esporas de *Bacillus coagulans* al entrar en contacto con líquido caliente, preferiblemente agua caliente. En un 25 aspecto adicional, preparar la composición de bebida comprende combinar la bacteria *Bacillus coagulans* y uno o más ingredientes no bacterianos con agua caliente. En otro aspecto más, dicha agua caliente comprende agua hirviendo.

En un aspecto, las bacterias *Bacillus coagulans* aisladas están en forma de espora, en forma de célula vegetativa o 30 en forma de mezcla de células vegetativas y esporas.

La invención describe también composiciones de bebida como se definieron anteriormente que incluyen una bacteria *Bacillus coagulans* aislada y uno o más ingredientes no bacterianos, tales como granos de café o fragmentos de los mismos, café en polvo, chocolate en polvo y cacao en polvo. Según otro aspecto, los granos de café o fragmentos 35 de los mismos comprenden granos de café molidos. Las composiciones de bebidas ejemplares incluyen café. En un aspecto adicional, la composición de bebida es café instantáneo o café preparable, donde dicha composición de bebida es opcionalmente café descafeinado. En un aspecto adicional, las bacterias *Bacillus coagulans* en forma de polvo secado por pulverización se añaden directamente a dicho uno o más ingredientes no bacterianos. Según otro aspecto, las bacterias *Bacillus coagulans* aisladas se encuentran en forma de polvo, masa celular seca, pasta 40 estabilizada o gel estabilizado. En un aspecto adicional, el ingrediente no bacteriano mencionado anteriormente se recubre o se pulveriza con esporas de *Bacillus coagulans*, o células vegetativas de *Bacillus coagulans* liofilizadas. En otro aspecto más, el ingrediente no bacteriano se recubre o se pulveriza con *Bacillus coagulans* liofilizado, secado por pulverización, secado al aire o congelado.

45 Las cepas de *Bacillus coagulans* Hammer como se describen en esta invención no son patógenas y generalmente se consideran seguras para su uso en nutrición humana (es decir, clasificación GRAS) por la Administración Federal de Medicamentos de EE. UU. (FDA) y el Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA), y por aquellos expertos en la materia. Además, las cepas de *Bacillus coagulans* Hammer como se describen en esta invención germinan a la temperatura del cuerpo humano o por debajo de ella, lo que las hace útiles como probióticos. Muchas 50 cepas de *Bacillus coagulans* fuera del grupo Hammer tienen principalmente aplicaciones industriales, poco o ningún beneficio nutricional y contaminantes ambientales cuya seguridad no ha sido evaluada. Además, muchas otras cepas de *Bacillus coagulans* que no son de Hammer crecen de manera óptima a temperaturas que exceden la temperatura del cuerpo humano y, por lo tanto, no germinan de manera eficaz en el cuerpo humano. Estas cepas son menos adecuadas o no son adecuadas como probióticos para el consumo humano.

55

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

60 La figura 1B es un dibujo que ilustra que la bacteria *Bacillus* se añade a la composición de bebida separada o junto con la materia vegetal deshidratada o el ingrediente no bacteriano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 La presente invención está dirigida al descubrimiento de que las bacterias productoras de ácido láctico no patógenas

(es decir, las "bacterias del ácido láctico"), tales como el *Bacillus coagulans* ejemplar, siguen siendo viables y conservan sus propiedades probióticas beneficiosas en las composiciones de bebidas, tales como las preparadas en agua hirviendo.

5 Bacterias probióticas productoras de ácido láctico

Una bacteria probiótica productora de ácido láctico adecuada para su uso en los procedimientos y composiciones de la invención tal como se define para su uso en la presente invención produce ácido y no es patógena. Hay muchas bacterias adecuadas identificadas como se describe en esta invención, aunque la invención no se limita a las especies bacterianas actualmente conocidas en la medida en que se describen los propósitos y objetivos de las bacterias. La propiedad de producción de ácido es importante para la eficacia de las bacterias probióticas productoras de ácido láctico de esta invención.

La invención proporciona el uso de una bacteria productora de ácido láctico, tal como una especie de *Bacillus* formadora de esporas, tal como *B. coagulans*. Preferiblemente, la especie de *Bacillus* formadora de esporas de la invención es *B. coagulans* Hammer.

En esta invención se describen procedimientos y composiciones ejemplares utilizando *Bacillus coagulans* como probiótico. El *Bacillus coagulans* purificado y/o aislado es particularmente útil como probiótico en composiciones de bebidas. El probiótico *B. coagulans* no es patógeno y generalmente se considera seguro (es decir, clasificación GRAS) por la Administración Federal de Medicamentos de EE. UU. (FDA) y el Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) y por los expertos en la materia.

Bacillus coagulans es una bacteria formadora de esporas gram positiva no patógena que produce ácido láctico L(+) (dextrorrotatorio) en condiciones de fermentación. Se ha aislado de fuentes naturales, tales como muestras de suelo tratadas térmicamente inoculadas en un medio nutritivo (Manual de Bergey de bacteriología sistemática, Vol. 2, Sneath, PHA, y col., Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1986). Las cepas de *B. coagulans* purificadas han servido como fuente de enzimas que incluyen endonucleasas (por ejemplo, el documento de patente de EE. UU. n.º 5.200.336); amilasa (documento de patente de EE. UU. n.º 4.980.180); lactasa (documento de patente de EE. UU. n.º 4.323.651); y ciclo-malto-dextrina glucano-transferasa (documento de patente de EE. UU. n.º 5.102.800). *B. coagulans* se ha utilizado para producir ácido láctico (documento de patente de EE. UU. n.º 5.079.164). Se ha combinado una cepa de *B. coagulans* (denominada *L. sporogenes*; Sakaguti & Nakayama (ATCC 31284)) con otras bacterias productoras de ácido láctico y *B. natto* para producir un producto alimenticio fermentado a partir de semillas de soja al vapor (documento de patente de EE. UU. n.º 4.110.477).

La presente invención se refiere específicamente a la cepa GBI-30 de *Bacillus coagulans*, número de designación ATCC PTA-6086. Se describen además especies bacterianas que incluyen *Bacillus coagulans*, por ejemplo, *Bacillus coagulans* hammer, preferiblemente la cepa de *Bacillus coagulans* hammer n.º de acceso ATCC 31284, o una o más cepas derivadas de la cepa de *Bacillus coagulans* hammer n.º de acceso ATCC 31284 (por ejemplo, números ATCC: GBI-20, Número de designación ATCC PTA-6085;; y GBI-40, Número de designación ATCC PTA-6087; consulte la patente de EE. UU. n.º 6.849.256 de Farmer).

Bacillus coagulans fue previamente mal caracterizado como un *Lactobacillus* y etiquetado como *Lactobacillus sporogenes* (véase Nakamura y col. 1988. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 63-73). Sin embargo, la clasificación inicial fue incorrecta porque *Bacillus coagulans* produce esporas y excreta ácido láctico L(+)- a través del metabolismo. Ambas características proporcionan características clave para la utilidad de *Bacillus coagulans*. Estos aspectos del desarrollo y del metabolismo requerían que la bacteria se clasificara como un ácido láctico *Bacillus*. Además, generalmente no se aprecia que las especies clásicas de *Lactobacillus* sean inadecuadas para la colonización del intestino debido a su inestabilidad en el ambiente de pH duro (es decir, ácido) de la bilis, particularmente la bilis humana. Por el contrario, *Bacillus coagulans* puede sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal en el entorno biliar e incluso crecer en este intervalo de pH bajo.

Actividad probiótica de *Bacillus coagulans*

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

En un aspecto, se incluye una cepa de *Bacillus coagulans* en la composición en forma de células vegetativas. Preferiblemente, la cepa de *Bacillus coagulans* se incluye en la composición en forma de esporas. La invención también proporciona la inclusión de la cepa de *Bacillus coagulans* en la composición en forma de polvo, masa celular seca, pasta estabilizada o gel estabilizado.

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

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

Actividad probiótica antimicrobiana

La capacidad de *Bacillus coagulans* para inhibir varios patógenos bacterianos se determinó cuantitativamente mediante el uso de un ensayo *in vitro*. Este ensayo es parte de un cribado de patógenos bacterianos estandarizado (desarrollado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE. UU. (FDA)) y está disponible comercialmente en discos de soporte sólido (discos de antibióticos DIFCO® BACTROL®). Para realizar el ensayo, se prepararon inicialmente placas de patata-dextrosa (DIFCO®) utilizando procedimientos estándar. A continuación, las placas se inocularon individualmente con las bacterias (aproximadamente 1.5×10^6 CFU) para su ensayo con el fin de formar un lecho bacteriano confluyente.

Posteriormente se determinó la inhibición de microorganismos (*por ejemplo*, patógenos gastrointestinales) por *Bacillus coagulans* colocando aproximadamente 1.8×10^6 UFC de *Bacillus coagulans* en 10 µl de caldo o tampón, directamente en el centro de la placa de patata-dextrosa con un punto de prueba de aproximadamente 8 mm de diámetro por placa. Se utilizó un mínimo de tres loci de prueba para cada ensayo. El control negativo consistió en un volumen de 10 µl de una solución salina estéril, mientras que el control positivo consistió en un volumen de 1 µl de glutaraldehído. A continuación, las placas se incubaron durante aproximadamente 18 horas a 30 °C, momento en el que se midieron las zonas de inhibición. Como se designa en esta invención, "inhibición excelente" significa que la zona tenía un diámetro de 10 mm o más; y "buena inhibición" significa que la zona tenía más de 2 mm de diámetro pero menos de 10 mm de diámetro.

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

Composiciones de bebidas probióticas

La invención está dirigida al descubrimiento sorprendente de que las bacterias productoras de ácido láctico, particularmente las especies de *Bacillus* permanecen viables y conservan sus propiedades probióticas beneficiosas en composiciones de bebidas, tales como las preparadas en agua hirviendo. Las bebidas se preparan combinando materia seca y un líquido, *por ejemplo*, agua. En un aspecto, las bebidas se preparan combinando materia seca y un líquido, y calentando la combinación resultante. Opcionalmente, la combinación se calienta usando calor aplicado, una llama o un microondas. Preferiblemente, se añade agua hirviendo (aproximadamente a 100 °C) a una combinación de té y bacterias *Bacillus coagulans* en una bolsita de té y se deja reposar durante aproximadamente cuatro minutos. En otro aspecto, el agua caliente pasa a través de la combinación del café y la bacteria *Bacillus coagulans*.

Las composiciones se formulan en muchas configuraciones, porque la bacteria está presente como una célula vegetativa o como una spora, o ambas, dependiendo de la especie y forma del organismo probiótico. Las células/esporas se formulan en una variedad de composiciones adecuadas para su uso en una composición de bebida. En un aspecto, la bacteria está presente como una mezcla de esporas y células vegetativas que comprenden al menos un 85 % de esporas. Preferiblemente, la bacteria está presente como al menos un 90 % de esporas, *por ejemplo*, 95 %, 98 %, o 99 % de esporas. Opcionalmente, antes de la adición a las composiciones de bebida de la invención, las células de *Bacillus coagulans* se cultivan en líquido en ausencia o con cantidades

limitadas de una fuente de alimento para inducir la esporulación. El secado por pulverización con pistola de calor extermina el 50 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 99 % de las células vegetativas antes de la adición a las composiciones de bebida de la invención.

5

Preferiblemente, la composición de la bebida es un té. El té es una bebida que se elabora al remojar materia vegetal deshidratada tal como hojas procesadas, brotes, raíces o ramitas del arbusto del té, *Camellia sinensis*, en agua caliente durante unos minutos. La invención proporciona una base de té deshidratado, *por ejemplo*, té negro, té oolong, té verde, té amarillo y té blanco y un *Bacillus coagulans*. Opcionalmente, el té es té instantáneo o té preparable. En un aspecto, el té es té descafeinado. En el caso del té instantáneo, la composición incluye un concentrado o deshidratado de té elaborado y *Bacillus coagulans*. Normalmente, una formulación de este tipo no contiene materia vegetal.

También se incluyen en la invención las mezclas de té. Muchas mezclas de té se preparan añadiendo otras plantas a un té (té negro, oolong, verde, amarillo o blanco); por ejemplo, el popular té Earl Grey es té negro con bergamota, mientras que el té de jazmín es té chino con jazmín.

La invención también proporciona composiciones de bebidas de "té" de hierbas. Una hierba se caracteriza por ser una planta pequeña con semillas, con partes carnosas, en lugar de leñosas (de las cuales obtenemos el término "herbácea"). Además de las plantas perennes herbáceas, las hierbas incluyen árboles, arbustos, plantas anuales, enredaderas y plantas más primitivas, tales como helechos, musgos, algas, líquenes y hongos. Las [hierbas] son valoradas por su sabor, fragancia, cualidades medicinales y saludables, usos económicos e industriales, propiedades pesticidas y colorantes (tintes). Un "té" de tisana, ptisan o de hierbas es cualquier infusión de materia vegetal distinta del arbusto del té (*Camellia sinensis*). El "té" de hierbas se puede preparar con flores frescas o secas, frutas, hojas, semillas o raíces, generalmente vertiendo agua hirviendo sobre las partes de la planta y dejándolas reposar durante unos minutos. El "té" de hierbas se puede preparar con hojas secas, flores, frutos o semillas de una planta medicinal. Las semillas y las raíces también se pueden hervir en el fuego o en el microondas. El "té" de hierbas se cuele entonces, se endulza si se desea y se sirve. Los té de hierbas adecuados incluyen té de anís, té de cebada tostada, té de bissap, té de cannabis, té de hierba gatera, té de Cerasse, té de manzanilla, té de crisantemo (hecho de flores secas), té de cáscara de cítricos (incluyendo bergamota, cáscara de limón y naranja), té de maíz tostado, té de equinácea, té de Essiac (una mezcla de té de hierbas), té de hinojo, té de genciana, té de raíz de jengibre, té de ginseng, té griego de montaña (elaborado con una variedad de la planta *Sideritis syriaca*), té de hibisco (a menudo mezclado con rosa mosqueta), té de Honeybush (arbusto de miel), té de marrubio, té de jiaogulan, té de raíz de kava, té de labrador, té de lapacho, té de hierba de limón, té de raíz de regaliz, té de flor de tilo, té de flor de loto, té de mate, té de *mate de coca*, té de menta, té de muérdago europeo, té de hojas de neem, té de hojas de ortiga, té de hojas de frambuesa roja, té de arroz tostado, té de rooibos (arbusto rojo o rojo), té de rosa mosqueta (a menudo mezclado con hibisco), té de romero, té de salvia, té de sasafrás, té de Skullcap, té de zumaque de Virginia, té de stevia, té de tomillo, té de tulsi, té de Uncaria tomentosa (uña de gato), té de valeriana, té de verbena, té de vetiver, té de trigo tostado, té Wong Logat, té Woodruff (*Galium odoratum*), té de milenrama, té Yuen Kut Lam Kam Wo y té medicinal Tan Ngan Lo.

La invención también describe composiciones que comprenden *Bacillus coagulans* aislado y uno o más ingredientes no bacterianos en una bolsita de té. En un aspecto, los ingredientes no bacterianos comprenden materia vegetal deshidratada obtenida de *Camellia sinensis*, donde dicha materia deshidratada se selecciona del grupo que consiste en hojas, brotes, raíces y/o ramitas procesadas.

También se describen en esta invención bolsitas de té. Las bolsitas de té adecuadas incluyen las de seda porosa, papel, algodón o bolsita de nailon con té en el interior que se utiliza para preparar té. La bolsita de té consta de dos partes, el té y la bolsita. El té permanece dentro de la bolsita mientras se prepara, lo que facilita su desecho. Preferiblemente, la bacteria *Bacillus coagulans* en forma de un polvo secado por pulverización se incluye en o sobre la superficie de la bolsita de té junto con la materia vegetal deshidratada. Alternativamente, la bacteria *Bacillus coagulans* en forma de polvo secado por pulverización se incluye en o sobre la superficie de una bolsa junto con la materia vegetal deshidratada. Se describe además que se puede incluir maltodextrina en o sobre la superficie de la bolsa junto con la bacteria *Bacillus coagulans*. La maltodextrina también se puede incluir en o sobre la superficie de la bolsa junto con la bacteria *Bacillus coagulans* con materia vegetal deshidratada. Aproximadamente mil millones de bacterias *Bacillus coagulans* en forma de polvo secado por pulverización se describen como incluidas en o sobre la superficie de una bolsa con materia vegetal deshidratada.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones de bebidas que incluyen bacterias *Bacillus coagulans* aisladas y uno o más ingredientes no bacterianos, donde dichos uno o más ingredientes no bacterianos (i) se seleccionan del grupo que consiste en granos de café o fragmentos de los mismos y café en polvo; o (ii) comprenden materia vegetal deshidratada para preparar té, donde dicha bacteria *Bacillus coagulans* comprende al menos un 85 % de esporas y donde dicha bacteria *Bacillus coagulans* comprende la cepa GBI-30 (Número de designación ATCC PTA-6086). Los ingredientes no bacterianos adecuados incluyen granos de café o fragmentos de los mismos y café en polvo. Composiciones de bebidas ejemplares incluyen café. Opcionalmente, el café es café

instantáneo o café para preparar. En un aspecto, el café es café descafeinado. También se describen otros ingredientes no bacterianos adecuados tales como productos lácteos, cremas no lácteas, cremas aromatizadas, extractos aromatizantes, edulcorantes naturales (*por ejemplo*, Stevia) y edulcorantes artificiales tales como Splenda, Sweet'N Low. En un aspecto, las bacterias *Bacillus coagulans* en forma de polvo seco por pulverización se añaden directamente al mismo uno o más ingredientes no bacterianos (*por ejemplo*, granos de café molidos o cristales o polvo de café elaborado liofilizado).

La invención también describe composiciones de bebidas que incluyen *Bacillus coagulans* aislado en remedios para el resfriado que requieren agua caliente, como TheraFlu™. La bacteria *Bacillus coagulans* en forma de polvo seco por pulverización se agrega antes o después de la adición del remedio en polvo para el resfriado (*por ejemplo*, Theraflu™) al agua caliente. Alternativamente, *B. coagulans* se mezcla o se intercala con ingredientes secos de los ingredientes del remedio para el resfriado.

En un aspecto, la bacteria *Bacillus coagulans* se aplica directamente a la materia vegetativa deshidratada o ingrediente no bacteriano, *por ejemplo*, hojas de té u otra materia vegetativa deshidratada se recubre o pulveriza con esporas o células vegetativas de *Bacillus coagulans* liofilizadas (Figura 1A). En otro aspecto, la bacteria *Bacillus* se añade a la composición de la bebida separada o junto con la materia vegetal deshidratada o el ingrediente no bacteriano, *por ejemplo*, la composición de la bebida es una mezcla de dos o más restos distintos, siendo un primer resto materia vegetativa deshidratada y siendo o conteniendo un segundo resto una bacteria o espora de *Bacillus coagulans* (en ausencia de materia vegetativa deshidratada) (Figura 1B). En el último caso, la composición de bebida es una mezcla de dos o más entidades o partículas diferentes. La porción de *Bacillus coagulans* de la mezcla es opcionalmente una masa bacteriana seca encapsulada o microencapsulada, o esporas, o una mezcla que contiene partículas de *Bacillus coagulans* y esporas.

Opcionalmente, el *Bacillus coagulans* aislado está en forma de espora. Los *Bacillus coagulans* aislados son al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % de esporas puras. Alternativamente, el *Bacillus coagulans* aislado se encuentra en forma de célula vegetativa. El *Bacillus coagulans* aislado puede ser al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % de células vegetativas puras. En otro aspecto, el *Bacillus coagulans* aislado se encuentra en forma de una mezcla de células vegetativas y esporas. La mezcla de *Bacillus coagulans* puede tener un 90 % de esporas y un 10 % de células vegetativas. Se describen además el 75 % de esporas, 25 % de células vegetativas; 60 % de esporas, 40 % de células vegetativas; 50 % de esporas, 50 % de células vegetativas; 60 % de células vegetativas, 40 % de esporas; 75 % de células vegetativas; 25 % de esporas; o 90 % de células vegetativas, 10 % de esporas.

El agente activo aislado de *Bacillus* y/o *Bacillus coagulans* se aplica usando cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos que incluyen, *por ejemplo*, aplicar un polvo, secar por pulverización el probiótico sobre la bolsita de té o granos de café, o remojar la bolsita de té o los granos de café en una solución que contenga probiótico. Opcionalmente, la bacteria *Bacillus* se aplica antes de hacer la bolsita de té. Alternativamente, la bacteria *Bacillus* se aplica durante o después de que se haya hecho la bolsita de té. En otro aspecto, la bacteria *Bacillus coagulans* en forma de polvo seco por pulverización se añade directamente al té en sí. Opcionalmente, aproximadamente 70 mg por unidad de porción de bacterias *Bacillus coagulans* en forma de polvo seco por pulverización se agregan directamente al té en sí. Se describe además que la maltodextrina junto con la bacteria *Bacillus coagulans* en forma de polvo seco por pulverización se pueden añadir directamente al té en sí. Opcionalmente, aproximadamente mil millones por unidad de porción de bacterias *Bacillus coagulans* en forma de polvo seco por pulverización junto con maltodextrina se agregan directamente al té en sí.

Puede usarse cualquiera de una variedad de procedimientos para colocar la composición bacteriana en una composición de bebida. Sin embargo, los procedimientos preferidos incluyen un procedimiento de "seco por pulverización" en el que la bolsita de té o los granos de café se exponen en una cámara de baja humedad a una mezcla atomizada que contiene una composición líquida, donde la cámara se expone posteriormente a aproximadamente 27-43 °C (80-110 °F) para secar el líquido, impregnando así el material de la bolsita de té o los granos de café con los componentes de la composición.

Una concentración típica es de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^{12} UFC; 1×10^8 a 1×10^{11} UFC; o 1×10^9 a 1×10^{10} UFC de bacteria viable o esporas/en² de la superficie externa de la bolsita de té. Después del secado, la bolsita de té está lista para su uso inmediato o para su almacenamiento en un paquete estéril.

Los ingredientes activos (es decir, bacterias vivas o componentes extracelulares) comprenden entre aproximadamente un 0,01 % y aproximadamente un 10 %; 0,01 % a aproximadamente 1 %; o de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 0,1 % en peso de la composición de bebida. Opcionalmente, los *Bacillus coagulans* aislados comprenden aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g; aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g; o de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg en peso de la composición de bebida. Más preferiblemente, la cantidad de bacterias *Bacillus coagulans* es de aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias por bolsita de té (aproximadamente 50 mg de bacterias por bolsita de té en aproximadamente 2-3 gramos de té).

A modo de ejemplo, la cantidad de bacterias es de aproximadamente 10^4 a 10^{14} unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias por gramo de composición de bebida (es decir, células vegetativas y/o esporas bacterianas), preferiblemente 10^5 a 10^{13} UFC/g. Más preferiblemente, las concentraciones son de 10^8 a 10^{13} UFC/g; 10^9 a 10^{12} UFC/g; o 10^{10} a 10^{11} UFC/g. Alternativamente, la cantidad de bacterias es de aproximadamente 1×10^6 UFC por composición de bebida. La cantidad real en una composición variará dependiendo de las cantidades de composición que se van a dispersar en la composición de bebida y de las rutas de dispersión.

La invención describe además el almacenamiento de la bolsita de té en un paquete estéril a temperatura ambiente antes de su consumo. Alternativamente, la bolsita de té se usa inmediatamente.

La composición de bebida puede comprender al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % de esporas de *Bacillus coagulans* aisladas.

A modo de ejemplo, y sin carácter limitativo, las esporas de *Bacillus coagulans* pueden incorporarse a cualquier tipo de producto seco o liofilizado que se disuelva o mezcle con agua caliente, siempre que la temperatura de la mezcla que contiene esporas de *Bacillus coagulans* se eleve a la temperatura requerida de choque térmico (es decir, 80°C durante 5 minutos) necesaria para la germinación de las esporas. Las esporas de *Bacillus coagulans* pueden ser incorporadas al producto seco o liofilizado por el fabricante del producto o por el consumidor durante la preparación. Estos productos secos o liofilizados incluyen, entre otros: bolsitas de té, café (por ejemplo, "liofilizado" o molido), bebida caliente condimentos/aromas y cremas y similares.

Ejemplo 1: preparación de cultivos de *Bacillus coagulans*

Se inoculó bacteria *Bacillus coagulans* Hammer (n.º de acceso ATCC 31284) y se cultivó hasta una densidad celular de aproximadamente 10^8 to 10^9 células/ml en caldo nutritivo que contenía 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 10-30 mg de MnSO_4 , y 1.000 ml de agua destilada, ajustada a pH 7.0, usando un recipiente de fermentación de transporte aéreo estándar a 30°C . El intervalo de MnSO_4 aceptable para la esporulación es 1 mg/l a 1 g/l. Las células vegetativas pueden reproducirse activamente hasta 45°C y las esporas son estables hasta 90°C . Después de la fermentación, las células bacterianas o esporas de *B. coagulans* se recogen usando procedimientos estándar (por ejemplo, filtración, centrifugación) y las células y esporas recogidas se pueden liofilizar, secar por pulverización, secar al aire o congelar. Como se describe en esta invención, el sobrenadante del cultivo celular se recoge y se usa como un agente extracelular secretado por *B. coagulans*.

Un rendimiento típico del cultivo anterior está en el intervalo de alrededor de 10^9 a 10^{10} esporas viables y más típicamente alrededor de 100 a 150 mil millones de células/esporas por gramo antes del secado. Las esporas mantienen al menos un 90 % de viabilidad después del secado cuando se almacenan a temperatura ambiente durante hasta diez años y, por lo tanto, la vida útil efectiva de una composición que contiene esporas de *B. coagulans* Hammer a temperatura ambiente es de aproximadamente 10 años.

Ejemplo 2: preparación de esporas de *Bacillus coagulans*

Se preparó un cultivo de esporas de *B. coagulans* secas del siguiente modo. Se inocularon diez millones de esporas en un cultivo de un litro que contenía 24 g de caldo de dextrosa de patata, 10 g de digestión enzimática de tejido de aves y peces, 5 g de FOS y 10 g de MnSO_4 . El cultivo se mantuvo durante 72 horas en un ambiente con alto contenido de oxígeno a 37°C para producir un cultivo que tenía aproximadamente 150 mil millones de células por gramo de cultivo. A continuación, se filtró el cultivo para eliminar el líquido del medio de cultivo y se resuspendió el sedimento bacteriano en agua y se liofilizó. A continuación, el polvo liofilizado se muele hasta obtener un polvo fino utilizando las buenas prácticas de fabricación estándar (BPF).

Ejemplo 3: supervivencia de esporas de *Bacillus coagulans*

Este estudio se realizó para determinar la tasa de supervivencia de las esporas de *Bacillus coagulans* a medida que pasan a través del estómago. Se sometieron muestras de esporas de *Bacillus coagulans* a un entorno gástrico simulado durante períodos de tiempo variables para lograr su tasa de supervivencia. En primer lugar, se preparó una muestra homogénea de materia prima *Bacillus coagulans* de al menos 12 gramos. Se preparó una solución salina a pH 1 usando HCl 3N (150 ml cada una en seis botellas de medio de 250 ml) y se esterilizó. Se prepararon de manera similar soluciones salinas adicionales con pH 2 y 3, dando como resultado 6 botellas estériles de 250 ml, cada una de las cuales contenía 150 ml de solución salina con pH ajustado. Se prepararon y esterilizaron seis botellas de medio estériles de 250 ml que contenían cada una 150 ml de solución salina normal. Se preparó tampón fosfato (~400 ml) a pH 7.2. Se prepararon y esterilizaron tubos de ensayo (24), cada uno de los cuales contenía 9 ml de tampón fosfato pH 7.2. Se prepararon tubos de ensayo (120), cada uno de los cuales contenía 9 ml de solución salina normal. Se preparó medio de agar GYE, se esterilizó y se enfrió a 45°C en un baño de agua. Se pesaron muestras (24) de materia prima, cada una ~ 500 miligramos (equivalente a 10 mil millones de esporas). Las muestras se agregaron a botellas de medio a 37°C y se incubaron la mitad durante 20 minutos y la otra mitad durante 120 minutos. Después de 20 y 120 minutos de incubación, respectivamente, las muestras se mezclaron

hasta uniformidad y se pipetearon 1 ml en 9 ml de tampón fosfato estéril pH 7.2. Después de colocar las 12 muestras de cada punto de tiempo en tubos de ensayo que contenían tampón fosfato estéril, se hicieron diluciones en serie hasta que se usaron 6 tubos para cada muestra. La dilución final para los dos tubos de ensayo finales fue de 3×10^7 y 3×10^8 , lo que dio un recuento de aproximadamente 300 y 30 UFC, respectivamente. Los 2 tubos de ensayo finales de cada muestra se colocaron en un baño de agua a 70 °C durante 30 minutos. Después de 30 minutos, se enfriaron inmediatamente a 45 °C. Se dispusieron tres placas de Petri estériles por tubo. Se añadió 1,0 ml del tubo tratado térmicamente a cada placa de Petri, a continuación se vertieron 15 ml de medio de agar GYE fundido estéril (a 45 °C) en cada una de las placas de Petri y se mezclaron minuciosamente. Cuando se solidificaron, las placas se incubaron en posición invertida durante 48 horas a 40 °C. Se contaron las colonias individuales. Los resultados se expresaron como UFC por gramo como se muestra en la siguiente tabla. $1,0E+10 = 1,0 \times 10^{10}$

Tabla 1.

Muestra	Recuento de esporas de incubación de 20 minutos, UFC/gramo	Recuento de esporas de incubación de 120 minutos, UFC/gramo
Solución salina normal - A	1,90E+10	1,88E+10
Solución salina normal - B	2,12E+10	2,00E+10
Solución salina normal - C	1,64E+10	2,06E+10
Promedio	1,89E+10	1,98E+10
PH salino 1.0 - D	2,08E+09	5,98E+07
PH salino 1.0 - E	1,47E+09	0,00E+00
PH salino 1.0 - F	3,59E+09	0,00E+00
Promedio	2,38E+09	1,99E+07
PH salino 2.0 - G	3,63E+09	3,46E+09
PH salino 2.0 - H	4,47E+09	2,48E+09
PH salino 2.0 - I	3,58E+09	2,82E+09
Promedio	3,89E+09	2,92E+09
PH salino 3.0 - J	1,65E+10	1,13E+10
PH salino 3.0 - K	1,35E+10	1,11E+10
PH salino 3.0 - L	1,80E+10	1,39E+10
Promedio	1,60E+10	1,21E+10

Ejemplo 4: prueba de supervivencia por choque de esporas de *Bacillus coagulans*

El propósito del siguiente estudio fue determinar la tasa de supervivencia de GBI-30 (*Bacillus coagulans*-30; BC³⁺) después de remojar con té durante 5 minutos seguido de sujeción a un entorno gástrico simulado (por ejemplo, pH 2.0) durante 2 horas. Se colocaron muestras de GBI-30 en agua hirviendo junto con una bolsita de té (Celestial Seasonings® - Authentic Green Tea) y se remojaron durante 5 minutos. A continuación fueron sometidos a un entorno gástrico simulado durante 2 horas para determinar su tasa de supervivencia. Los resultados se detallan a continuación:

Se preparó un litro de solución salina (pH 2.0 usando HCl 3N) y 150 ml de solución salina normal. Se colocó solución salina (90 ml; pH 2.0) en cada una de las seis botellas de medio de 250 ml y se esterilizó. Se prepararon aproximadamente 100 ml de tampón fosfato (pH 7.2). Se prepararon y esterilizaron tubos de ensayo (3) que contenían 9 ml de tampón fosfato (pH 7.2). Se prepararon y esterilizaron nueve tubos de ensayo que contenían 9 ml de solución salina normal. Se preparó medio de agar GYE estéril y se enfrió a 45 °C en un baño de agua. Se pesaron tres muestras de materia prima (16 mil millones/gramo) (cada una ~ 62,5 miligramos; GBI-30).

Se prepararon seis muestras del siguiente modo. Se hirvió agua potable y se vertieron 200 ml de agua hirviendo en un vaso de precipitados de 400 ml que contenía 1 bolsita de té y ~62,5 mg de materia prima (GBI-30). La bolsita de té se dejó reposar durante 5 minutos. Se retiró la bolsita de té, se mezcló bien la solución y se colocaron 10 ml en 90 ml de solución salina (pH 2.0). Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37 °C. A continuación, la solución se mezcló hasta uniformidad y se colocó 1 ml en 9 ml de tampón fosfato estéril (pH 7.2). Se prepararon tres diluciones

en serie de 1 ml en 9 ml de solución salina estéril. El recuento final fue de aproximadamente 5×10^1 (50 UFC). Los últimos 3 tubos de ensayo de cada muestra se sembraron en placa. Se contaron las colonias individuales. Los resultados de este experimento se enumeran en el cuadro a continuación. Estos datos indican que las esporas de *Bacillus coagulans* sobreviven en el entorno gástrico después del consumo de las composiciones de bebida 5 descritas en esta invención.

Tabla 2.

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

En otra serie de experimentos, se colocaron bolsitas de té que contenían GBI-30 en agua hirviendo y se dejó reposar el té durante cuatro minutos. Se realizaron recuentos de células. Aproximadamente el 65 % de las bacterias *Bacillus coagulans* sobrevivieron. Estos datos indican que las esporas de *Bacillus coagulans* conservan la viabilidad en las composiciones de bebida descritas en esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de bebida que comprende bacterias *Bacillus coagulans* aisladas y uno o más
5 ingredientes no bacterianos, en la que dicho uno o más ingredientes no bacterianos
(i) se seleccionan del grupo que consiste en granos de café o fragmentos de los mismos y café en polvo; o
(ii) comprenden materia vegetativa deshidratada para preparar té,
en la que dichas bacterias *Bacillus coagulans* comprenden al menos un 85 % de esporas y en las que dicha bacteria
10 *Bacillus coagulans* comprende la cepa GBI-30 (Número de designación ATCC PTA-6086).
2. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que dichas bacterias *Bacillus coagulans*
aisladas están en forma de espora, en forma de célula vegetativa o en forma de mezcla de células vegetativas y
15 esporas.
3. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que dichas bacterias *Bacillus coagulans*
aisladas están en forma de un polvo, una masa celular seca, una pasta estabilizada o un gel estabilizado.
4. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que dicho ingrediente no bacteriano está
20 recubierto o pulverizado con esporas de *Bacillus coagulans* o células vegetativas de *Bacillus coagulans* liofilizadas.
5. La composición de bebida deshidratada de la reivindicación 1, en la que dicho ingrediente no
bacteriano se recubre o se pulveriza con esporas de *Bacillus coagulans* liofilizadas, secadas por pulverización,
secadas al aire o congeladas.
25
6. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que las bacterias *Bacillus coagulans* en forma
de un polvo secado por pulverización se añaden directamente a dichos uno o más ingredientes no bacterianos.
7. La composición de bebida de la reivindicación 1 (i), en la que dicha composición de bebida es café.
30
8. La composición de bebida de la reivindicación 7, en la que dicha composición de bebida es café
instantáneo o café preparable, y en la que dicha composición de bebida es opcionalmente café descafeinado.
9. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que dichas esporas de *Bacillus coagulans* se
35 activan al entrar en contacto con un líquido caliente, preferiblemente agua caliente.
10. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que dicha materia vegetativa deshidratada se
obtiene de *Camellia sinensis*, preferiblemente en la que dicha materia vegetativa deshidratada se selecciona del
grupo que consiste en hojas, brotes, raíces y ramitas procesadas.
40
11. La composición de bebida de la reivindicación 10, en la que dicha composición de bebida es té verde,
té negro, té oolong, té amarillo o té blanco, preferiblemente en la que dicha composición de bebida es té instantáneo
o té preparable, opcionalmente té descafeinado.
- 45 12. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que dicha materia vegetativa deshidratada se
obtiene de una especie distinta de *Camellia sinensis*, preferiblemente en la que dicha composición de bebida es té
de hierbas, más preferiblemente té de rosa mosqueta, té de manzanilla, té de jiaogulan, té de menta, té rooibos, té
de jengibre, té de ginseng o té de limoncillo.
- 50 13. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que dichos granos de café o fragmentos de los
mismos comprenden granos de café molidos.
14. La composición de bebida de la reivindicación 1, en la que preparar dicha composición de bebida
comprende combinar dicha bacteria *Bacillus coagulans* y dicho uno o más ingredientes no bacterianos con agua
55 caliente.
15. La composición de bebida de la reivindicación 14, en la que dicha agua caliente comprende agua
hirviendo.

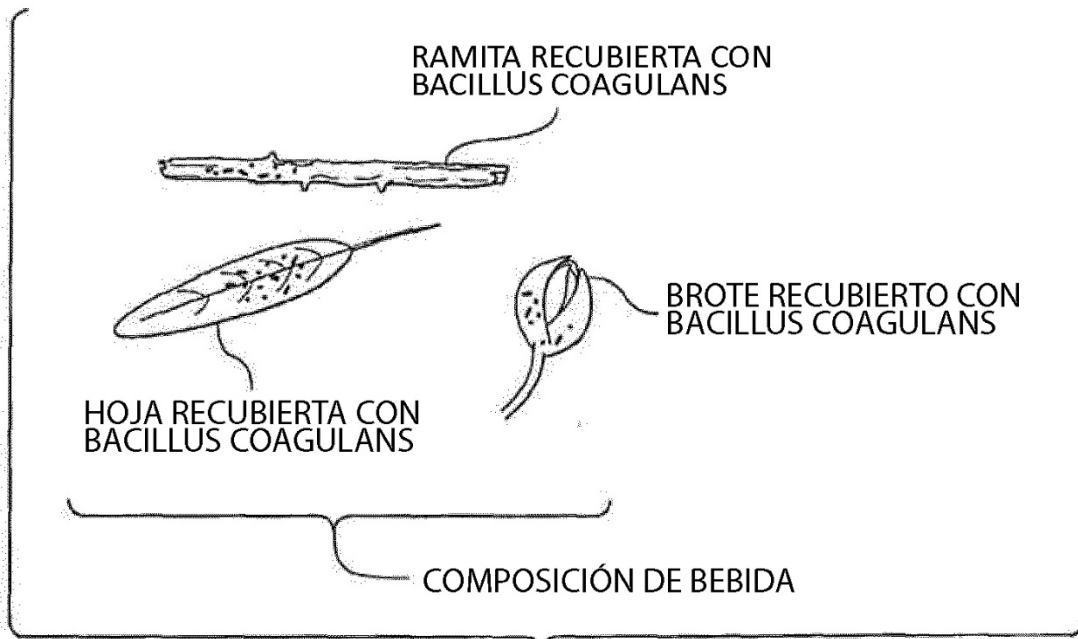


Fig. 1A

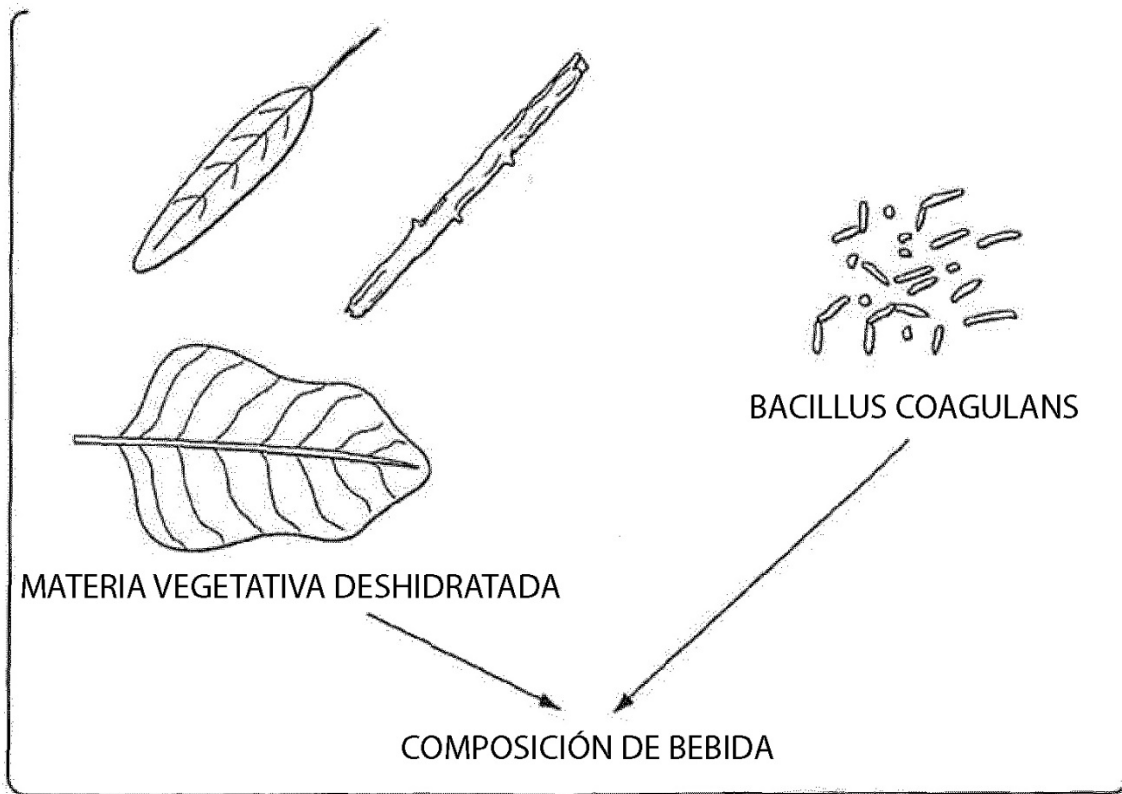


Fig. 1B