



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 372 675**

⑯ Int. Cl.:  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23K 1/00** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑯ Número de solicitud europea: **09723528 .7**  
⑯ Fecha de presentación: **18.03.2009**  
⑯ Número de publicación de la solicitud: **2276357**  
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2011**

⑭ Título: **PRODUCTO ALIMENTICIO PROBIÓTICO DE LARGA DURACIÓN.**

⑯ Prioridad:  
**18.03.2008 EP 08152922**

⑯ Titular/es:  
**Friesland Brands B.V.**  
**Stationsplein 4**  
**3818 LE Amersfoort, NL**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.01.2012**

⑯ Inventor/es:  
**DE VRIES, Ynte Piet y**  
**TE BIESEBEKE, Rob**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.01.2012**

⑯ Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

**ES 2 372 675 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

Producto alimenticio probiótico de larga duración

- 5 La presente invención se refiere a un producto alimenticio que comprende probióticos, en particular a un producto alimenticio de larga duración. Más particularmente, la presente invención se refiere a un producto lácteo líquido (tal como por ejemplo, bebidas lácteas, productos alimenticios derivados de la leche e ingredientes de alimentos lácteos) o un zumo de fruta.
- 10 Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped (FAO/OMS). Por definición, todos los probióticos tienen un carácter no patogénico probado. En general, estos beneficios para la salud están asociados con la mejora del equilibrio de la microflora humana o animal en el tracto gastrointestinal.
- 15 El hecho que la microflora en el tracto gastrointestinal es importante para el bienestar humano ya se conoce desde hace mucho tiempo. Por ejemplo, en 1970 un artículo de reseña titulado "La flora fecal normal del hombre" ("Normal fecal flora of man"), publicado en The American Journal of Clinical Nutrition (Vol. 23: pág: 1457-1465) comienza con: La influencia del equilibrio de la flora normal del tracto intestinal en la salud y bienestar del huésped está bien documentada. Se reporta que las bacterias intestinales están implicadas en el metabolismo entre muchos otros
- 20 componentes de: hidratos de carbono (por ejemplo, prebióticos, azúcares), proteínas, grasas, colesterol, nucleótidos, hormonas, vitaminas y minerales. La ecología de la microflora humana afecta, entre otros, a: la resistencia natural, la inmunidad, la osteoporosis, el cáncer y la incidencia de caries. Numerosas publicaciones han mostrado explicaciones mecanicistas y estudios clínicos que demuestran eficacia, que la microflora que aparece en el tracto gastrointestinal tiene un impacto importante en la resistencia contra infecciones. Además, la microflora
- 25 intestinal (y también especies probióticas que forman colonias de forma temporal) afecta entre otros aspectos a: la salud del intestino (por ejemplo, funcionalidad epitelial, crecimiento de la mucosa, la función de barrera del epitelio, inmunidad de las mucosas, patrones de defecación, tránsito intestinal), enfermedades atópicas, infecciones vaginales, enfermedades de la piel, bienestar humano y estados de ánimo humanos. De hecho, se puede afirmar que la microflora es eficaz en cualquier lugar dentro o sobre el cuerpo humano.
- 30 La presente invención se refiere a productos alimenticios, particularmente que tienen un origen lácteo y/o frutal (zumo). Estos productos son particularmente del tipo generalmente destinado al consumo diario y destinados a tener un efecto positivo en la salud humana o animal y/o mejorar las molestias humanas o animales. Se cree que los efectos esperados están relacionados con la restauración, recuperación, equilibrio o aplicación de la ecología
- 35 microbiana que está presente de forma natural en los cuerpos humanos o animales o sobre los mismos.

Es bien conocido obtener productos lácteos que comprenden microorganismos probióticos, normalmente del género *Lactobacillus* por ejemplo, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus*, u otros y del género *Bifidobacterium*, como por ejemplo, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis* y otros. También se utilizan otras cepas como probióticos. En 1917, Alfred Nissle aisló una cepa de *Escherichia coli* de las heces de un soldado que luchó en la Primera Guerra Mundial y que no desarrolló enterocolitis durante un severo brote de shigelosis. Como los antibióticos no se habían descubierto aún, esta cepa fue utilizada con éxito para tratar los casos agudos de enfermedades infecciosas intestinales (salmonelosis y shigelosis). Otro ejemplo bien conocido es el *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, una cepa bacteriana sin motilidad y que no forma esporas, que es una de las bacterias utilizadas para la producción de yogur. El biólogo ruso Ilia Ilyich Mechnikov estaba convencido de su hipótesis de que el consumo regular de yogur ayudaba a la esperanza de vida larga y saludable de los campesinos búlgaros. Se sugirió que esto se debía a la especie probiótica *Lactobacillus bulgaricus* presente en el yogur. O. Adolfsson y otros, describieron en la revista American Journal of Clinical Nutrition (2004, volumen 80, páginas 245-256) que el yogur por sí mismo tiene también usos médicos, en particular para una variedad de enfermedades gastrointestinales y Ripudaman S. Beniwal y otros, reportaron en la revista Digestive Diseases and Sciences (volumen 48, páginas 2077-2082) los efectos beneficiosos en la prevención de diarrea asociada a antibióticos. Sin estar asociados a ninguna teoría en particular, se cree firmemente que los efectos beneficiosos descritos están asociados a las bacterias de ácido láctico presentes en estos yogures.

Ciertas cepas probióticas son capaces de producir componentes bioactivos que se pueden sumar al efecto directo que puede tener una cepa probiótica, o en algunos casos suministrar. Un buen ejemplo de esta ventaja adicional de una cepa probiótica es *Bacillus subtilis* var. *natto* que produce vitamina K2 que ayuda a proteger contra la degeneración de los huesos. Otro ejemplo pudiera ser *Mortierella* spp. (spp. es sinónimo de subespecie) que produce grandes cantidades de AGPICL (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga), en los que el ácido araquidónico puede regular la funcionalidad del citoesqueleto de las células epiteliales y a través de la misma, la funcionalidad de la barrera epitelial. Otro ejemplo más, es el *Bacillus subtilis* que puede producir antibióticos que pueden modular la microflora gastrointestinal.

65 Es bien conocida la aplicación de probióticos en productos lácteos y su limitado período de validez. La aplicación de

probióticos en zumos de fruta u otros tipos de zumos es un área muy poco explorada.

Los productos anteriores son generalmente productos frescos, de limitado período de validez y, por lo general, requieren almacenamiento refrigerado. Muchos productos lácteos y zumos de frutas se producen como productos de larga duración, que se pueden almacenar sin refrigeración. Un problema es que los probióticos no pueden estar comprendidos dentro de estos productos sin perjudicar o arriesgar su período de validez. Como la disminución del período de validez eliminaría la razón de ser de productos tales como productos lácteos y zumos de frutas de larga duración, los microorganismos probióticos no pueden ser utilizados con eficacia en estos productos. Por lo tanto, es deseable proporcionar una manera en la que se puedan obtener también productos alimenticios de larga duración con los efectos asociados a los microorganismos probióticos.

El término "producto alimenticio de larga duración" se refiere, generalmente, a un producto que, ya sea por sus propios ingredientes o por un tratamiento especial, o por ambos, se puede conservar y se puede almacenar durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, dos semanas o más, preferentemente varios meses y más preferentemente varios años, tal como se define más adelante en el presente documento) y más preferentemente en condiciones ambientales, es decir, sin refrigeración.

Con el fin de abordar mejor el deseo mencionado anteriormente, la presente invención da a conocer, en una realización, un producto alimenticio de larga duración que comprende organismos probióticos en estado latente. Esto se refiere a esporas o células latentes de hongos, levaduras o bacterias. La presente invención, en otra realización, da a conocer un producto alimenticio líquido pasteurizado seleccionado del grupo que comprende bebidas lácteas, zumos de frutas y concentrados de los mismos, comprendiendo el producto esporas o células latentes de hongos, levaduras y/o bacterias probióticas. En otra realización más, la presente invención da a conocer la utilización de esporas o células latentes de bacterias, levaduras y/o de hongos probióticos como ingrediente probiótico en productos alimenticios de larga duración, y en particular en un producto alimenticio líquido pasteurizado seleccionado del grupo que comprende bebidas lácteas, zumos de frutas y concentrados de los mismos. La presente invención, en otra realización más, da a conocer un producto alimenticio en forma de un ingrediente alimenticio derivado de la leche (por ejemplo, Deminal 90 y/o GOS y/o lactosa producidos por Friesland Foods DOMO y/o cualquier otro ingrediente derivado lácteo que se pueda utilizar como alimento), leche fermentada que contiene esporas probióticas o células probióticas latentes. En otra realización, la presente invención da a conocer dicha utilización con el fin de conservar el período de validez de un alimento probiótico de larga duración. Es decir, esto permite la obtención de un producto alimenticio probiótico en base a un producto alimenticio de larga duración y aún es posible almacenar el producto de la misma forma que cuando no contiene probióticos. La conservación del período de validez no significa necesariamente que la duración sea exactamente la misma, ya que podría verse afectada (de cualquier manera) por la introducción de esporas o células vegetativas latentes de probióticos. En todo caso, el producto se seguirá reconociendo como un producto alimenticio de larga duración, tal como se definió anteriormente y tal como se define más adelante en el presente documento.

Además de la ventaja de reducir o eliminar el crecimiento microbiano durante el almacenamiento, se logra otra ventaja en el caso de los alimentos relativamente ácidos y particularmente bebidas, tales como zumos de frutas y yogur o bebidas de yogur, en los que los microorganismos probióticos latentes permanecen viables durante un período de tiempo mayor que los probióticos vivos.

Cabe señalar que la solicitud de patente internacional WO 2004/080200 se refiere a la adición de esporas probióticas a productos alimenticios, en particular piensos animales. El documento se refiere a la estabilidad de las bacterias probióticas. El documento no se refiere a la utilización de esporas de bacterias, levaduras y/u hongos probióticos o células latentes de bacterias, hongos o levaduras, o combinaciones de las mismas en productos alimenticios probióticos de larga duración. Entre otras referencias a las esporas de bacterias se incluyen las solicitudes de patentes WO 2007/066108; WO03/039260; Wolken y otros en Trends in Biotechnology, Vol. 21, No. 8, 40 Agosto 1, 2003, pág. 338 – 345; Hong y otros, FEMS Microbiology Reviews, Vol. 29, No. 4, Septiembre 1, 2005, pág. 813 – 835; Casula y otros, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 5, Mayo 2002, pág. 2344 – 2352. Ninguno se refiere a productos alimenticios de larga duración.

La presente invención da a conocer únicamente la posibilidad de que una o más de las numerosas especies de hongos y/o bacterias que habitan nuestro tracto gastrointestinal y/o que se han utilizado durante siglos para el consumo humano o para la producción de alimentos para humanos se utilicen en productos alimenticios probióticos de larga duración. Las especies que se pueden utilizar dentro de este contexto se seleccionan preferentemente de las que están presentes en el tracto gastrointestinal (humano), y más preferentemente de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Desemzia*, *Coprococcus*, *Collinsella*, *Citrobacter*, *Turicibacter*, *Sutterella*, *Subdoligranulum*, *Streptococcus*, *Sporobacter*, *Sporacetigenium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Proteus*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Papillibacter*, *Oscillospira*, *Melissococcus*, *Dorea*, *Dialister*, *Clostridium*, *Cedecea*, *Catenibacterium*, *Butyrivibrio*, *Buttauxella*, *Bulleidia*, *Bilophila*, *Bacteroides*, *Anaerovorax*, *Anaerostipes*, *Anaerofilum*, *Enterobacteriaceae*, *Fermicutes*, *Atopobium*, *Alistipes*, *Akkermansia*, *Acinetobacter*, *Slackie*, *Shigella*, *Shewanella*, *Serratia*, *Mahella*, *Lachnospira*, *Klebsiella*, *Idiomarina*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Eggerthella*. Las especies también pueden provenir de grupos fúngicos tales como levaduras, ascomicetos, zigomicetos y deuteromicetos que son más preferentemente de los grupos *Aspergillus*,

*Torulopsis, Zygosaccharomyces, Hansenula, Candida, Saccharomyces, Clavispora, Bretanomyces, Pichia, Amylomyces, Zygosaccharomyces, Endomyces, Hypopichia, Zygosaccharomyces, Kluyveromyces, Mucor, Rhizopus, Yarrowia, Endomyces, y/o Penicillium.*

- 5 Según la presente invención, se pueden utilizar especies del género o grupo tales como los mencionados anteriormente, en un producto alimenticio probiótico de larga duración en estado latente (es decir, en forma de esporas y/o en forma no activa que puede aparecer cuando las condiciones adecuadas para el crecimiento vegetativo no están en el entorno de las células y por lo tanto la célula se mantiene en reposo o latente). Será evidente para el experto en la materia que un producto alimenticio que comprende probióticos en forma latente, no 10 puede ser excluido de los que también comprenden probióticos que ya no son viables (estos ni obstruyen ni favorecen la presente invención). En una realización alternativa, es muy posible que los probióticos latentes en la presente invención, tal como se utilizan, se pueden combinar con probióticos habituales, sin cambios, en dependencia del producto alimenticio, el período de validez deseado del mismo y sus condiciones de conservación. 15 Es preferente si, como mínimo, la mitad de los probióticos en el producto se encuentran en estado latente y más preferente si están en una proporción aproximadamente de 50:50 (es decir, de 60:40 a 40:60). Sin embargo, considerando la amplia gama de cantidades de probióticos que pueden ser utilizados en productos alimenticios, es posible combinar los probióticos sin cambios y los probióticos latentes (tales como esporas), en una proporción numérica en el intervalo de 90:10 a 10:90 o incluso de 99:1 a 1:99.
- 20 Las especies de hongos, levaduras o bacterias de los géneros o grupos mencionados anteriormente pueden aplicarse como un producto con esporas o sin esporas, tal como se describe en el presente documento, como un producto probiótico en un producto de larga duración que, por definición, no son patogénicos. Por lo tanto, se cree, básicamente, que todas las especies microbianas no patogénicas de origen fúngico, de levadura y bacteriano que 25 sean capaces de permanecer en estado latente o en forma de esporas pueden ser utilizados en un producto probiótico de larga duración.

Las esporas bacterianas (también conocidas como endoesporas) son una fase de reposo que muestran algunos tipos de bacterias. Las endoesporas se forman dentro de las células vegetativas (esporangios) en respuesta a cambios adversos en el ambiente. La célula bacteriana original replica su material genético y una copia de este es rodeada por un recubrimiento duro. A continuación, el exterior de la célula se desintegra, liberando así una espora que está bien protegida por el recubrimiento contra influencias tales como calor, frío, radiación, o falta de necesidades tales como nutrientes, agua o aire. Esencialmente, las esporas son capaces de germinar y por lo tanto lograr un crecimiento de las bacterias que hasta ese momento hayan formado esporas.

- 35 Las esporas de hongos son una fase en reposo mostrada por levaduras y células fúngicas bajo ciertas condiciones ambientales mostrada por muchas células fúngicas y levaduras. En su medio natural, la reproducción asexual por medio de esporas vegetativas o mediante la fragmentación del micelio permite una dispersión más rápida que la reproducción sexual. Por ejemplo, la esporulación de la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* es una respuesta al agotamiento de los nutrientes. La formación de las esporas se puede dividir en dos etapas. La primera 40 es la generación de nuevos compartimentos de membrana en el citoplasma de la célula que dan lugar a las membranas plasmáticas de la espora. En la segunda etapa, la espora madura es rodeada por una pared multilaminar de esporas que proporciona resistencia al estrés ambiental. Las esporas asexuales colonizan nuevos ambientes tras su germinación dependiendo de las condiciones ambientales tales como por ejemplo, actividad del agua, luz, nutrientes y/o conservantes (ingredientes naturales o sintéticos que se añaden a los alimentos para evitar 45 su descomposición por crecimiento microbiano mediante la limitación del crecimiento vegetativo).

Por lo tanto, las esporas de hongos, levaduras y/o bacterias probióticas, presentes en los productos alimenticios de larga duración de la presente invención son, de hecho, hongos, levaduras o bacterias o combinación de los mismos en una fase "latente". Una forma preferente de la presente invención es la forma en esporas de levaduras, hongos 50 y/o bacterias, pero también hay condiciones ambientales que mantienen las células en esta fase latente. Además, estas células probióticas de origen fúngico, de levaduras o bacteriano, que no están en forma de esporas son parte del producto alimenticio probiótico de larga duración según la presente invención. Despues del consumo del producto alimenticio, las esporas germinan, o las condiciones del ambiente cambiarán el estado "latente" de las células fúngicas, bacterianas o de levadura, en los intestinos, y por tanto producen sus beneficios para la salud 55 donde es necesario, comparable al propio consumo de levaduras, hongos o bacterias. Las esporas o células latentes también pueden ser eficaces en el tracto gastrointestinal mientras se encuentran todavía en su fase latente o de esporas sin llegar a ser vegetativas (por ejemplo, mediante exclusión competitiva de sitios de unión a patógenos o por la estimulación del sistema inmunológico mediante proteínas, glicoproteínas o estructuras de la pared celular).

- 60 Mientras que las esporas de bacterias, de hongos o levaduras probióticas se pueden incorporar a una variedad de productos alimenticios de larga duración, la presente invención se refiere más preferentemente a productos que son ácidos. La acidez del producto conservará las esporas bacterianas en la fase latente. Tras el consumo, esta fase se 65 mantendrá a través del estómago (que obviamente es un medio ácido). Al aumentar el pH en los intestinos, las esporas pueden germinar. Una referencia al respecto es Gabriella Casula y Simon M. Cuttling, *Applied and Environmental Microbiology*, Mayo 2002, pág. 2344 - 2352. La presente invención se refiere también a productos

- que tienen otras condiciones ambientales específicas, tales como por ejemplo, una baja actividad de agua (por ejemplo, en leche condensada), productos que no tienen requerimientos nutricionales específicos para las especies probióticas utilizadas en forma de esporas o en estado latente, sino también la ausencia/presencia de luz y/u oxígeno. Las esporas y/o las células latentes de bacterias, levaduras u hongos, en dependencia de las cepas y de las condiciones utilizadas estarán en su estado latente, pero en caso de abrirse el empaquetamiento y consumo, las células pueden empezar a germinar y convertirse en vegetativas.
- 5 Los productos de la presente invención se almacenan de manera que las esporas y/o células latentes no germinarán o permanecerán latentes, por ejemplo, ambiente con baja actividad de agua y, preferentemente, son productos en los que se evita que las esporas no germinen o las células se mantienen latentes, tales como productos ácidos, condiciones limitadas de nutrientes, productos con conservantes y/o ambientes oscuros o una combinación de dos o más de las condiciones mencionadas anteriormente (por ejemplo, limitación de nutrientes en combinación con pH y conservantes). Los productos preferentes se seleccionan del grupo que comprende bebidas lácteas, productos derivados de productos lácteos tales como yogur por ejemplo, y también ingredientes lácteos (tales como por ejemplo productos que contienen lactosa, suero y/o proteínas de caseína) en forma de polvo, zumos de frutas y concentrados de los mismos. El pH de estos productos se encuentra, generalmente, en el intervalo de 2 a 7 (con zumos de frutas en el extremo inferior, yogur en 4, leche entera de 6 a 7). La presente invención es también aplicable a otros productos alimenticios ácidos que se desean obtener en forma de productos de larga duración (y eventualmente pasteurizados) tales como queso crema (pH 4,88) o requesón (pH 5), quesos duros de diferentes períodos de maduración, quesos que han sido fermentados o que adquieren su sabor típico después de la exposición a bacterias u hongos, ya sea dentro o en la superficie del queso, o preparados de frutas. También se puede aplicar la presente invención a leche condensada con o sin azúcares en la que la actividad del agua es baja. Otra aplicación puede incluir materiales de empaque que dejarán el producto en la oscuridad.
- 10 25 Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a productos alimenticios de larga duración. Estos son productos que se pueden almacenar sin refrigeración y, en particular, zumos de frutas, bebidas de frutas y productos lácteos que se han considerado adecuados para su almacenamiento sin refrigeración. "Almacenamiento" se refiere al período comprendido entre el envasado del producto a prueba de manipulación, particularmente bebida láctea o bebidas que comprenden zumos de frutas, hasta la apertura del envase a prueba de manipulación con el propósito de consumir el producto. Este período de almacenamiento se reconoce, generalmente, por la fecha de "consumir antes de" (o redactado similar en diferentes idiomas) impresa en el envase.
- 30 35 Con referencia a los productos lácteos, por ejemplo, bebidas lácteas tales como leche, leche con chocolate, bebidas de yogur, un producto de larga duración puede tener un período de validez (no refrigerado) de más de 12 días. Particularmente, se refiere a un período de validez (período de almacenamiento no refrigerado) de más de 45 días y particularmente de 45 días a 6 meses, preferentemente de 6 a 12 meses y más preferentemente de 12 a 24 meses. La leche condensada dulce puede tener un período de validez de 5 a 10 años. Un producto de larga duración de zumos de frutas tendrá, generalmente, un período de validez (período de almacenamiento no refrigerado) de 13 a 26 semanas. Las bebidas que comprenden zumos de frutas tienen un período de validez (período de almacenamiento no refrigerado) de 3 a 6 meses o superior. El almacenamiento no refrigerado se refiere al almacenamiento en condiciones ambientales, que pueden ser diferentes según el clima de la región. Por supuesto, ocasionalmente, en el almacenamiento en el exterior de un frigorífico puede suceder que la temperatura ambiente coincida con la temperatura del frigorífico, hasta de 7°C o inferior, por ejemplo, de 0°C. Aunque no está excluido que dichos productos alimenticios de larga duración se almacenen a dichas bajas temperaturas, el experto en la materia entenderá perfectamente que el término "larga duración" se refiere a la capacidad de almacenamiento a temperaturas superiores a las de un frigorífico, generalmente superiores a 8°C, particularmente, como mínimo, de 10°C y generalmente hasta de 50°C, particularmente hasta de 40°C. Cabe señalar que dicho almacenamiento será en el anaquel de un almacén, por ejemplo a temperaturas entre 15°C y 25°C.
- 40 45 50 55 60 65
- Existen varios métodos de preparación de productos alimenticios de "larga duración". Estos tratamientos abarcan desde tratamientos de temperatura, tales como pasteurización y esterilización, hasta la adición de agentes conservantes. En el contexto de la presente invención y según el sentido normal del término, tratamiento de esterilización se refiere a un tratamiento a temperatura tan elevada que elimina toda forma de vida, incluyendo esporas. Es evidente que en la presente invención no se aplica la adición de esporas o células latentes antes de llevar a cabo un proceso, tal como esterilización, en el que se pretende eliminar toda forma de vida microbiana. Un experto en la materia entenderá que a los productos de larga duración sometidos a dichos tratamientos se pueden añadir probióticos latentes, es decir, después de someterlos a tratamientos de calor que pueden abarcar desde pasteurización hasta esterilización.
- Los productos lácteos y de frutas de larga duración se obtienen, generalmente, mediante pasteurización. La pasteurización se refiere a diversas formas de tratamiento a temperaturas elevadas y determinan el resultado la temperatura y el tiempo del tratamiento. Así, la leche "fresca" normal pasteurizada se puede almacenar durante pocas semanas, si se refrigerara, se trata mediante un proceso llamado ETBT ("elevada temperatura/breve tiempo). Esta pasteurización común se refiere, generalmente, al calentamiento aproximadamente hasta 72°C durante 15 a 20 segundos. Más que a dicha leche "fresca", la presente invención se aplica particularmente a productos que se han pasteurizado de forma que son adecuados para almacenar en condiciones no refrigeradas (referidos, en el contexto

de la presente invención, como “pasteurización de larga duración”). Otros motivos por los que los productos alimenticios son adecuados para el almacenamiento de larga duración son debido a un pH bajo y/o baja actividad del agua y/o limitación de nutrientes y/o presencia de conservantes y/o falta de luz en los productos alimenticios.

- 5 La pasteurización se lleva a cabo generalmente en una serie de tratamientos térmicos posteriores o en un tratamiento térmico único, normalmente a una temperatura en el intervalo de 60°C a 110°C. El proceso de tratamiento térmico de pasteurización no sólo depende del material tratado, sino también de otros parámetros de conservación tales como pH, temperatura de almacenamiento y actividad del agua.
- 10 Un ejemplo particular de tratamiento térmico es el tratamiento TUE (Temperatura Ultra Elevada). Generalmente se conoce como ultra-pasteurización. Los tratamientos preferentes son los referidos en el Manual de procesamiento de productos lácteos Tetra Pak (para productos lácteos) y Fruit Juice Processing Technology de Steven Nagy. Son tratamientos TUE particularmente adecuados el calentamiento a 135°C-150°C durante 15 a 40 segundos (productos lácteos) y en el caso de zumos de frutas durante 15 a 60 segundos a 95°C-90°C. Un tratamiento más preferente para productos lácteos es a una temperatura de 138°C ó 143°C durante una fracción de segundo.

Otro tratamiento de “pasteurización de larga duración”, es decir, tratamiento de pasteurización que produce productos de larga duración es MCPMC (mayor calor/plazo más corto) que se encuentra entre el ETBT y el TUE en términos de tiempo y temperatura. Con independencia del tratamiento exacto seleccionado para proporcionar larga duración, la presente invención se refiere a productos que se pueden almacenar fuera de un frigorífico y particularmente a productos que tienen que ser sometidos a tratamientos térmicos para alcanzar este estado.

20 Lo anterior se refiere en concreto a bacterias. Sin embargo, la presente invención no se limita a las mismas. Se pueden utilizar esporas de todos los hongos y levaduras capaces de esporular o de permanecer en un estado latente. Las bacterias probióticas son conocidas por los expertos en la materia y no requieren aclaración en el presente documento. Lo mismo sucede para el conocimiento de que hongos (filamentosos) y bacterias son capaces de esporular. Los ejemplos preferentes comprenden levaduras y hongos *Apergillus oryzae*, *Aspergillus soyae*, *Torulopsis versatilis*, *Zygosaccharomyces solae*, *Hansenula spp.* (Por ejemplo, *anomala*), *Torulopsis spp.*, *Candida etchellsii*, *Candida versatilis*, *Saccharomyces spp.* (*S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *S. uvarum*, *S. elegans*, *S. bayanus*), *Candida krusei*, *Clavispora lusitaniae*, *Bretanomyces spp.* *Pichia saitoi*, *rouxii Amylomyces*, *Zygosaccharomyces importante*, *Endomyces spp.* *Hyphopichia burtonii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces spp.*, *Mucor indicus*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum*, *Penicillium caseicolum*, *Penicillium album*, *Penicillium nalgiovenese*, *Penicillium chrysogenum*, y bacterias como *Bacillus subtilis*, *B. subtilis (natto)*, *Bacillus thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Paenibacillus polymixa*, *B. pumilus*, *B. polifermanticus*, *B. cluasii*, *B. lactosporus*, *Brevibacillus lactosporus*, *Lactobacillus sporogenus*, *B. coagulans*, *Paenibacillus polymixa* o *B. polymixa*, *B. laterosporus*. Las más preferentes son bacterias del género *Bacillus*, de las que las más preferentes incluyen *B. subtilis (natto)*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. coagulans*.

25 40 Se pueden obtener esporas de bacterias probióticas de varias maneras. Para empezar, pueden comprarse por ejemplo, productos que están en el mercado con diferentes nombres tales como Alcare®, Bactisubtil, Bidisubtilus, Bioplus 2B, Biosubtil, Biosporin y muchos otros que comprenden diferentes especies formadoras de esporas de las mencionadas anteriormente. Además, se pueden preparar, generalmente, mediante el crecimiento de bacterias en un medio adecuado y a continuación someter el cultivo crecido a circunstancias que inducen la esporulación. Esto último puede implicar diversas formas de proporcionar algún tipo de choque a las bacterias, por ejemplo, mediante temperatura elevada, mediante el cambio de la concentración salina en el medio que las contiene, mediante cambios en el pH, etc. El medio puede ser sólido o líquido. Un ejemplo de proceso de formación de esporas de un organismo bacteriano modelo *Bacillus cereus*, se puede encontrar en la tesis del Dr. de Vries titulada Formación de esporas, estructura y germinación del *Bacillus cereus* (“*Bacillus cereus* spore formation, structure and germination”) (Tesis de la Universidad de Wageningen, 2006). Un ejemplo del proceso de formación de esporas en hongos se puede encontrar en un artículo escrito por el Dr. Neiman titulado Formación de ascósporas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (“Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”) (Microbiol Mol Biol. Rev. 2005, 69:565-584). Las esporas de hongos y/o levaduras y/o células de hongos, levaduras o bacterianas que permanecen en fase latente pueden ser adquiridas por los proveedores de los productos o preparados después de que se han obtenido sin ningún tipo de restricción de la Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) en los Países Bajos, el Instituto para la Fermentación (Ciudad de Osaka) y el American Type Culture Collection (ATCC) de EE.UU.

30 35 45 50 55 60 65 Después de la preparación o la compra, puede ser deseable purificar el cultivo de esporas o células obtenidas de enzimas no deseadas, restos celulares, medio de cultivo celular y células que no han producido esporas. Esto se puede llevar a cabo mediante la utilización de la alta densidad de las esporas en comparación con las células vegetativas y los restos celulares.

En el caso de un cultivo de esporas, es preferente utilizar una preparación de esporas que sea sustancialmente pura (por ejemplo, más del 90% de esporas en la fase luminosa tal como se determina mediante microscopía de contraste de fases).

Se pueden incluir en los productos de la presente invención una amplia gama de esporas, por lo general suficientes para consumir de  $10^6$  a  $10^9$  UFC (unidades de formación de colonias) por día. Por lo tanto, un producto alimenticio de la presente invención generalmente comprenderá de  $10^6$  a  $10^9$  UFC de esporas probióticas por porción diaria del producto alimenticio, preferentemente de  $10^7$  a  $10^8$  UFC. Preferentemente, este intervalo se consume durante todo el día (por ejemplo, 4 veces la dosis de  $10^7$  UFC hasta alcanzar una dosis total de  $4 \times 10^7$  UFC por día), pero también es posible consumir una dosis de esporas al día en un producto a base de frutas o lácteos. El número de unidades de formación de colonias por cantidad de producto dependerá del tamaño de la porción diaria. Este variará de producto a producto y de consumidor a consumidor. Por lo general, un consumo regular de bebidas lácteas y bebidas alimenticias es de 100 a 800 ml por día, sobre esta base los productos de la presente invención comprenden, preferentemente, de  $10^3$  a  $10^9$  UFC por ml, de  $10^4$  a  $10^8$  UFC por ml, o de  $10^5$  a  $10^7$  UFC por ml.

Las esporas pueden incluirse en el producto alimenticio antes de la pasteurización. También es posible pasteurizar en primer lugar las esporas por separado y a continuación añadirlas al producto alimenticio.

Las esporas de probióticos se utilizan, entre otros, para prevenir, tratar o mejorar la resistencia contra las infecciones humanas de origen viral, bacteriano, fúngico o parasitario. Las infecciones del tracto gastrointestinal comprenden gastroenteritis, que se caracteriza por infecciones y/o inflamaciones de la mucosa del estómago y los intestinos y diarrea aguda y crónica. Los síntomas gastrointestinales se entiende que se refieren también a enfermedades específicas, tal como por ejemplo, infección por *Helicobacter pylori*. Las enfermedades respiratorias comprenden infecciones que se relacionan con la inflamación de las vías respiratorias más pequeñas (bronquitis), que son causadas por infección de bacterias (entre otros) o virus (resfriado común y virus de la influenza entre otros) o una combinación de los mismos. También se entiende que se refieren a: gripe, contagiosa enfermedad viral infecciosa, que a menudo se presenta como una epidemia. Otros ejemplos son inflamaciones severas del tejido pulmonar debido a diversos microorganismos y neumonitis, un término que se suele utilizar en caso de una forma leve de neumonía. Además, estos también comprenden resfriado común, que en realidad es una inflamación de la mucosa de la cavidad nasal y la faringe y/o los senos paranasales de la cabeza (senos maxilares y las cavidades sinusales) y es particularmente causada por los picornavirus y también enfermedades relacionadas con EPCNE (enfermedad pulmonar crónica no específica), tal como el asma, la bronquitis crónica y el enfisema pulmonar. De hecho, lo anterior se refiere a todos los lugares dentro o sobre el cuerpo en los que puede ocurrir un desequilibrio en la microflora inofensiva presente de forma natural. Este desequilibrio puede aparecer como resultado de un cambio en la microflora presente de forma natural o como resultado de contraer una infección del exterior del cuerpo. Esto implica, generalmente, una enfermedad que el cuerpo necesitará resistir inmunológicamente con el fin de recuperar la salud o librarse de la infección o desequilibrio de nuevo.

Las esporas probióticas que se utilizan en los productos de larga duración de la presente invención pueden tener diferentes orígenes. Además, las esporas se pueden combinar en un producto alimenticio probiótico de larga duración. Por ejemplo, una cepa de *Bacillus* en forma de esporas se puede combinar con otra cepa probiótica en forma de esporas en el mismo producto de larga duración. También es posible combinar más de dos cepas probióticas en forma de esporas en un producto probiótico de larga duración (por ejemplo, 3, 4, 5 o más de cinco cepas probióticas diferentes en forma de esporas en un solo producto). Las ventajas de los probióticos (proporcionados en forma de esporas) en los productos de la presente invención pueden ser ampliadas aún más con la adición de sustancias prebióticas. Las sustancias prebióticas son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en los intestinos (especialmente el colon) y así mejorar la salud del huésped. Las sustancias prebióticas más conocidas son oligosacáridos no digeribles. Ejemplos de prebióticos adecuados son fructo y/o galacto oligosacáridos, con cadenas cortas o largas, inulina, oligosacáridos que contienen fucosa, beta glucanos, harina de algarrobo, gomas, pectinas, sialil oligosacáridos, sialil lactosa, galactanos con cadenas cortas o largas y nucleótidos. Cantidad normales de estas sustancias son conocidas por el experto en la materia y serán, preferentemente, de 0,1 a 10 gramos, preferentemente de 1 a 5 gramos o de 2 a 3 gramos por día dependiendo de las sustancias prebióticas.

Los productos lácteos, según la presente invención, se pueden preparar de una manera conocida para estos productos (es decir, la obtención de leche de una vaca, cabra u otro animal de granjas lecheras y someterla a tratamientos habituales para obtener leche u otras bebidas lácteas, tales como bebidas de yogur, leche con chocolate y similares). En general, estos productos pueden o no comprender ingredientes tales como una fuente de proteínas, una fuente de lípidos, una fuente de hidratos de carbono. Los productos pueden ser productos de dieta o no, con un contenido calórico preferentemente entre 0 y 500 kcal por 100 ml de producto. Esto es válido, *mutatis mutandis*, para los productos de frutas según la presente invención. La composición general de los productos lácteos y de frutas, preferentemente bebidas o concentrados, es muy conocida en este sector.

La leche puede ser por ejemplo, de vaca, búfalo, cabra, oveja o camello. El producto o bebida también puede ser sobre la base de alternativas lácteas, tal como la soja.

**Ejemplos****Ejemplo 1**

- 5 Se normalizaron 500 litros de leche desnatada para obtener un líquido lácteo con un contenido de proteína, por ejemplo, de un 35,8% de proteína/sólidos lácteos no grasos con permeado de lactosa o suero. Por separado, se añadieron 6,5 kg de fitoesteroles Cardio Aid de ADM (que contiene más de un 56% de fitoesteroles totales; de un 40% a un 58% de beta-sitosterol; de un 0% a un 5% de beta-sitostanol; de un 20 a un 30% de campesterol; menos de un 5% de campestanol; de un 14% a un 22% de estigmasterol; menos de un 3% de brasicasterol menos de un 3% de otros esteroles o estanoles) a la fracción grasa que comprende aceite de palma a la vez que se mezclaron. Esta mezcla de grasa/esterol se añadió a la leche mediante inyección de grasa tal como se describe a continuación.

10 El líquido lácteo se calentó a 120°C mediante técnicas conocidas, seguido de un calentamiento sostenido durante 3 minutos. La leche caliente se transfirió a continuación al primer efecto de un evaporador de película descendente y se evaporó hasta un contenido de sólidos aproximadamente de un 24%. La mezcla grasa con esteroles se añadió por las tuberías inferiores de segundo efecto a flujo constante uniformemente distribuido durante más de un 80% del tiempo de evaporación requerido. De la misma manera, se incorporó una fracción de lípido polar que comprende esfingolípidos lácteos. La leche con grasa, esteroles y esfingolípidos se homogeneizó en un homogeneizador de dos etapas hasta un tamaño de partícula de grasa entre 0,36 y 0,47 micrómetros (medido con una cuchilla LS13 320) para obtener un concentrado de leche con un efecto reductor de colesterol. Se añaden fosfatos y/o citratos y/o carbonatos dependiendo de la estabilidad del producto obtenido en la evaporación. La leche se transportó a una distancia de 300 km después de la adición de un cultivo latente (por ejemplo, *Bacillus subtilis*) y se estandarizó como bebida láctea con un contenido de materia seca de 12,5%.

**Ejemplo 2**

- 25 Se preparó un yogur según condiciones estándar mediante un procedimiento de fermentación con una selección de cultivos de *Lactobacillus*. Se añadió al yogur un cultivo de *Pichia pastoris* a una concentración de  $2 \times 10^6$  UFC/ml. El recuento de colonias de levadura (UFC/ml) se mantuvo estable durante un período de 4 semanas después del almacenamiento a 15°C.

**Ejemplo 3**

- 30 Las especies *Brevibacillus brevis* y *Bacillus brevis* germinarán en presencia de una mezcla específica de aminoácidos sin vitaminas. Se preparó un zumo de frutas en base a naranja que contiene vitaminas presentes en la naturaleza y que contiene una baja concentración de aminoácidos. Un ejemplo de un aminoácido que presenta baja concentración en el zumo de frutas es el aminoácido tirosina. El zumo de frutas tiene un pH entre 2,5 y 4,5. Se añadieron al zumo de frutas esporas puras de *Brevibacillus brevis* y de *Bacillus brevis* en una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC/ml y posteriormente se utilizó un proceso de pasteurización ligera. Más del 50% de todas las esporas sobrevivieron al proceso de pasteurización. Después de un año de almacenamiento de esta bebida a diferentes temperaturas en el intervalo de 5°C a 50°C, se demostró, con ensayos de sabor y de período de validez, que el producto prácticamente no se afectó. El valor de UFC/ml, bajo ciertas condiciones de almacenamiento, fue aproximadamente de  $5 \times 10^5$  tal como se determinó por recuento de unidades formadoras de colonias en placa de agar de leche.

**Ejemplo 4**

- 45 Se preparó un zumo de fruta en base a naranja a partir de concentrado de zumo de naranja en polvo como es habitual por los fabricantes de zumos de frutas. El zumo se pasteurizó ligeramente y se añadieron esporas de *Aspergillus oryzae* a la bebida de frutas. Las esporas puras del hongo se añadieron al zumo de fruta en una concentración de  $10^6$  UFC/ml. Se demostró, con pruebas sensoriales y de período de validez, que el producto no se afectó después de 3 meses de almacenamiento en la oscuridad (es decir que al envase no le llegó la luz) a diferentes temperaturas de 5, 10 y 20°C. Del mismo modo, se esperaba que después de 1 y 2 años de ensayos de período de validez en la oscuridad, el producto no estaría afectado tal como se demostrará con ensayos sensoriales y de período de validez.

**Ejemplo 5**

- 50 Una bebida de yogur natural sin sabor a un pH aproximadamente de 4 se pasteurizó con diferentes métodos de esterilización, por ejemplo, una pasteurización por lotes de 10 minutos entre 75 y 85°C. La pasteurización por lotes se realizó según perfiles característicos de calentamiento y enfriamiento. Se continuó con otra esterilización en la que se utilizaron diversos métodos con intervalos desde 2 hasta 30 segundos a temperaturas de 110 a 65°C. A continuación, la bebida de yogur se enriqueció con diferentes esporas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus flexus* a una concentración de  $10^7$  UFC/ml. Todas estas esporas tienen una pureza superior a un 99% según se determinó por microscopía de contraste de fase. Las bebidas con diferentes esporas se almacenaron en la oscuridad a temperaturas entre 5 y 40°C durante aproximadamente 2 años y medio. El recuento en placas de agar

leche mostró una ligera disminución del número de esporas presentes en el yogur y los ensayos sensoriales no mostraron ninguna diferencia notable.

Ejemplo 6

- 5 Se enriquecieron 3 bebidas de frutas diferentes con intervalo de pH de 3,0 a 4.5 conocidas por los nombres comerciales Coolbest Acai powerfruit, Appelsientje y Appelsientje appel (levemente turbio) se enriquecieron con esporas de *Bacillus subtilis* hasta una concentración de  $4 \times 10^6$  UFC/ml y se pasteurizaron durante 1 segundo a 95°C. Las bebidas se almacenaron a 7°C y 20°C y después de 22 meses se determinó la supervivencia de las esporas.
- 10 10 Despues de los recuentos de colonias se mostró que más de un 1% de las  $4 \times 10^6$  UFC/ml sobrevivieron a estas condiciones de almacenamiento.

Ejemplo 7

- 15 15 Se aislaron esporas bacterianas que son puras, sin células vegetativas, actividad enzimática y se dejaron crecer en medios de cultivo de fase sólida (se recogieron las esporas mediante lavado de la superficie con agua) y método de cultivo líquido (las esporas se obtuvieron en el medio líquido). La pureza de las esporas es esencial para algunas de las aplicaciones mencionadas tal como se describe en los ejemplos (por ejemplo, ejemplo 5). Las preparaciones de esporas deben prepararse a una pureza superior a un 99% y, en algunos casos, puede ser posible una pureza de un 20 75% a un 90% dependiendo del vehículo, incluso es posible una pureza de un 50% a un 75% tal como se determinó mediante microscopía de contraste de fase. Estos preparados se elaboraron mediante un método basado en la separación basada en la densidad (= masa y volumen) de los componentes individuales que están presentes en el medio de cultivo de las esporas. Normalmente, las esporas se deben lavar, como mínimo, de 4 a 10 veces con agua destilada seguido de una separación basada en la densidad de los tipos de células (por ejemplo, mediante fuerzas 25 centrífugas o técnicas de filtración) para alcanzar la pureza deseada de la suspensión de esporas.

Ejemplo 8

- 30 30 Se preparó un producto de leche condensada a partir de productos lácteos con contenidos bajos y elevados de grasa con un pH aproximadamente de 6 a 7 mediante procedimientos de preparación conocidos y estandarizados. El producto (derivado) de la leche se evaporó mediante un proceso paso a paso en el que la temperatura se disminuyó gradualmente desde 130 hasta 75°C (o viceversa) durante determinados períodos de tiempo hasta alcanzar la concentración de leche deseada. A este producto de leche evaporada se añadió una concentración de 0% hasta una concentración de saturación de azúcar para crear una leche dulce y condensada de larga duración.
- 35 35 Este producto tiene una actividad de agua muy baja, lo que hace que las esporas o células latentes permanezcan en su fase latente del ciclo de vida. Las diferentes leches dulces y condensadas fueron inoculadas con esporas y/o células latentes de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus soyae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus brevis*. Todas las concentraciones de UFC/ml se mantuvieron estables, como mínimo, 16 meses después del almacenamiento a temperatura ambiente.

40 Ejemplo 9

- 45 45 Se mezclaron esporas de *Sacharomyces boulardi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus soyae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Paenibacillus polymixa*, *B. pumilus*, *B. polifermanticus*, *B. cluasii*, *B. lactosporus*, *Brevobacillus lactosporus*, *Lactobacillus sporogenus*, *B. coagulans*, *B. polymixa*, *B. lactosporus* en concentraciones de  $10^7$  UFC/g en polvo en placas diferentes, con lactosa, Vivinal GOS y diferentes preparados de proteínas por ejemplo, los que se conocen por el nombre comercial de Deminal90 e Hiprotal90. Durante un período de un año se realizaron conteos de (UFC/ g) cada 4 meses y en estos productos, que se almacenaron a 20°C, el valor de unidades formadoras de colonias se mantuvo constante (todos por encima de  $10^6$  UFC/g).

## REIVINDICACIONES

1. Producto alimenticio de larga duración seleccionado del grupo que comprende productos lácteos que tienen un período de validez en condiciones no refrigeradas de más de 12 días, zumos de frutas que tienen un período de almacenamiento no refrigerado entre 13 y 26 semanas y bebidas que contienen zumos de frutas que tienen un período de almacenamiento no refrigerado, como mínimo, de 3 meses que comprenden organismos probióticos en estado latente.
2. Producto alimenticio de larga duración, según la reivindicación 1, en el que los organismos probióticos se seleccionan del grupo que comprende hongos, levaduras y bacterias capaces de esporular.
3. Producto alimenticio de larga duración, según la reivindicación 1, que comprende células latentes de hongos, levaduras o bacterias.
4. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un producto lácteo que tiene un período de validez no refrigerado de 12 a 24 meses.
5. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los organismos en estado latente se seleccionan del grupo que comprende *Clostridia* y/o *Bacillus* y preferentemente, *B. subtilis*, *B. subtilis (natto)*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. coagulans*.
6. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los organismos en estado latente se seleccionan del grupo que comprende *Apergillus oryzae*, *Aspergillus soyae*, *Hansenula spp.*, *Torulopsis spp.*, *Candida spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Clavispora spp.*, *Bretanomyces spp.*, *Pichia spp.*, *Endomyces spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Rhizopus spp.*, *Yarrowia lipolytica*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium spp.*, mezclas de los mismos y mezclas con subespecies de *Clostridia* y/o *Bacillus*.
7. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende esporas probióticas o probióticos en una fase latente, en el que las células, al salir de esta fase latente o de esporas, pueden producir, como mínimo, un ingrediente (tal como vitamina K2, antibióticos o AGPICL) que producen beneficios para la salud.
8. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende esporas y células probióticas, siendo seleccionadas las células del grupo que comprende células viables, células no viables y mezclas de las mismas.
9. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto ha sido sometido a un tratamiento de pasteurización de larga duración, particularmente mediante MCPMC o TUE.
10. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende de  $10^4$  a  $10^{10}$  UFC (unidades formadoras de colonias) de esporas probióticas por porción diaria del producto alimenticio, preferentemente de  $10^5$  a  $10^{10}$  UFC, más preferentemente de  $10^6$  a  $10^9$  UFC y más preferentemente entre  $10^8$  y  $10^9$  UFC.
11. Producto alimenticio de larga duración, según la reivindicación 10, en el que el producto es un líquido que comprende de  $10^5$  a  $10^8$  CFU por ml, habitualmente de 12 500 a 50 000 000 CFU por ml y preferentemente de  $10^5$  a  $10^6$  CFU por ml.
12. Producto alimenticio de larga duración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, como mínimo, una sustancia prebiótica, preferentemente seleccionada del grupo que comprende fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, fructo galacto oligosacáridos, inulina, oligosacáridos que contienen fucosa, glucanos beta, harina de algarrobo, gomas, pectinas, sialiloligosacáridos, sialilactosa, galactanos, y nucleótidos.
13. Uso de esporas probióticas, preferentemente seleccionadas del grupo que comprende esporas de bacterias, esporas de levaduras, esporas de hongos, y/o células latentes de bacterias, hongos y/o levaduras y/o mezclas de las mismas, como un ingrediente probiótico en un producto alimenticio de larga duración seleccionado del grupo que comprende productos lácteos que tienen un período de validez no refrigerado de más de 12 días,

zumos de frutas que tienen un período de almacenamiento no refrigerado de 13 a 26 semanas, y bebidas que comprenden zumos de frutas que tienen un período de almacenamiento no refrigerado, como mínimo, de 3 meses.

- 5 14. Uso, según la reivindicación 13, con el propósito de mantener el período de validez de un producto alimenticio de larga duración a la vez que convierte el producto en un producto alimenticio probiótico.