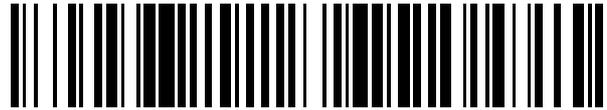


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 680**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008 E 08835162 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2195419**

54 Título: **Procedimientos para el secado de bacteriófagos y composiciones que contienen bacteriófagos**

30 Prioridad:

**01.10.2007 US 976727 P**

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

**23.04.2013**

73 Titular/es:

**OMNILYTICS INCORPORATED (100.0%)  
5450 WEST WILEY POST WAY  
SALT LAKE CITY, UT 84116, US**

72 Inventor/es:

**WALBECK, ALAN, K.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 401 680 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

Procedimientos para el secado de bacteriófagos y composiciones que contienen bacteriófagos.

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere en general a procedimientos para el secado de bacteriófagos y composiciones que incluyen los bacteriófagos. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de los procesos de secado por pulverización por atomización con combustión a pulsos para rociar bacteriófagos secos y composiciones que contienen bacteriófagos.

### Antecedentes de la técnica relacionada

10 Los bacteriófagos pueden ser producidos mediante procesos de fermentación, en los que los medios líquidos de fermentación, hospedadores bacterianos y bacteriófagos se mezclan entre sí y se incuban. De dichos procesos de fermentación se obtienen mezclas líquidas de lisado que incluyen restos de bacterias, medios de fermentación y bacteriófagos en mayor concentración. En la producción de bacteriófagos, hay que considerar la naturaleza del lisado y la interacción con el hospedador lisado. Los bacteriófagos viven en el medio de fermentación y generalmente siguen existiendo dentro de ese lisado durante largos períodos de tiempo (con pocas excepciones). Si el bacteriófago se retira del lisado líquido, o si el ambiente se cambia ligeramente, la viabilidad del bacteriófago podría verse comprometida.

15 Además, los líquidos, tales como el agua, promueven la interacción deseada aleatoria entre el bacteriófago y el hospedador bacteriano específico. En consecuencia, el bacteriófago se aplica normalmente en forma líquida a sustratos (por ejemplo, plantas, carnes, etc.) que pueden estar contaminados o infectados con bacterias diana específicas.

20 Como tales, normalmente, las soluciones líquidas del lisado que resultan de los procesos de fermentación de bacteriófagos se aclaran simplemente para producir un producto bacteriófago final, que se envía entonces sin más modificación.

25 Hay, sin embargo, situaciones en las que sería más deseable suministrar un producto bacteriófago seco o un producto bacteriófago más compacto (por ej., concentrado). Un ejemplo de tal situación es cuando una bacteria hospedadora excreta una enzima particular, proteasa, toxina u otro subproducto que puede dañar al bacteriófago con el tiempo; por ej., cuando se degradan las proteínas (que son los elementos estructurales de los bacteriófagos) dando lugar a la eventual destrucción del bacteriófago que se mantiene dentro de la solución de lisado líquido (aclarado o no). Esta degradación se produce con el tiempo, incluso después de que los hospedadores bacterianos hayan sido destruidos por el bacteriófago y puede ocurrir en tan sólo unas pocas horas o prolongarse varios días o incluso semanas. Como resultado, la producción de productos líquidos de bacteriófago se ha limitado a hospedadores bacterianos con un "buen comportamiento" (aquellos que no excretan subproductos que puedan perjudicar el bacteriófago), los cuales pueden limitar los tipos o concentraciones de ciertos tipos de bacteriófagos que pueden ser efectivamente producidos a escala industrial.

35 Se han hecho varios intentos para producir productos bacteriófagos secos a una escala mayor, incluyendo procesos de liofilización (es decir, secado por congelación), secado por pulverización y secado al vacío (ver, por ej., la Solicitud de publicación de Patente europea EP 0 403 292 (19 de diciembre de 1990) de Microbial Developments Limited, página 4, líneas 42-44 y 52-55). Sin embargo, no está clara la viabilidad y virulencia de las partículas de bacteriófago desecadas. Por otra parte, la susceptibilidad de las partículas de bacteriófago a las condiciones (por ej., temperaturas, fuerzas de cizalladura, etc.) de tales procesos han resultado ser intentos infructuosos por "destruir" o de otro modo disminuir la virulencia de la gran mayoría de las partículas de bacteriófago. De hecho, los procesos convencionales de secado por pulverización suelen dar lugar generalmente a productos con al menos una reducción de cinco log ( $10^5$ ) a ocho log ( $10^8$ ) en la eficacia de bacteriófago, lo que representa una reducción en la eficacia del producto final, en comparación con su forma líquida pre-secado, del 99,999 % al 99,999999 %.

45 Se necesitan bacteriófagos y composiciones que contienen bacteriófagos que estén en forma seca (por ej., polvo, gránulos, etc.), procedimientos de secado de bacteriófagos y composiciones que contienen bacteriófagos y procedimientos para el uso de bacteriófagos secos y composiciones secas que incluyen bacteriófagos.

### Descripción de la invención

50 Los bacteriófagos son sensibles a fuerzas de cizallamiento, a temperaturas extremadamente altas (incluyendo la cantidad de tiempo que se expone el bacteriófago a altas temperaturas) y a otras variables ambientales. Debido a la naturaleza sensible del bacteriófago, hay que procurar evitar daños en la anatomía de este microorganismo. Un problema, en particular, es mantener intactas las partes del bacteriófago necesarias para la adsorción, tales como las fibras de la cola. Si estas partes de la anatomía del bacteriófago no permanecen intactas o viables, el bacteriófago no será capaz de establecer contacto y adsorberse a las paredes de la cepa bacteriana diana.

55

5 La presente invención, en un aspecto, incluye un procedimiento para fabricar una preparación de bacteriófagos seca según la reivindicación 1. En diversas realizaciones, tales procesos pueden incluir someter un líquido a granel a secado por combustión a pulsos. Además del bacteriófago, el líquido a granel puede incluir al menos uno de un medio de fermentación, un lisado y una bacteria hospedadora. En algunas realizaciones, el líquido a granel puede tener un volumen de hasta veinte (20) litros.

En el líquido a granel también puede introducirse un material de soporte para aumentar su contenido de sólidos. Ejemplos de materiales de soporte adecuados incluyen leche en polvo, trehalosa y maltodextrina. En algunas realizaciones, el contenido de sólidos del líquido a granel puede ajustarse al menos al 20 %.

10 Durante el secado por combustión a pulsos, el líquido a granel puede ser sometido a una presión de hasta 0,1 bar. La temperatura de contacto del proceso de combustión de impulsos de secado puede ser 540°C o menos. Una temperatura de salida durante el proceso de secado por combustión a pulsos puede ser 82 °C o menos. El secado por combustión a pulsos puede efectuarse a una velocidad de un litro cada noventa (90) segundos o más rápido.

15 El procesamiento de secado por combustión a pulsos de bacteriófagos puede mantener la eficacia y la virulencia de las partículas de bacteriófagos de una manera que reduce el número de partículas de bacteriófagos viables del producto bacteriófago líquido procesado en el producto bacteriófago seco, en no más de aproximadamente un log (10<sup>1</sup>).

Otros aspectos, así como características y ventajas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica mediante la consideración de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

**Mejor(es) modo(s) de llevar a cabo la invención**

20 La presente invención incluye procedimientos para la formación de productos bacteriófagos secos a partir de productos bacteriófagos líquidos, tales como mezclas de fermentación que incluyen bacteriófagos y, opcionalmente, medios de fermentación, hospedadores bacterianos para el bacteriófago y/o restos de bacterias o "lisado". En un procedimiento de este tipo, una preparación líquida a granel que incluye el bacteriófago (es decir, una cantidad a escala industrial, que se puede medir en galones o litros) se puede secar en menos de diez horas y, en algunas realizaciones, unos pocos litros del producto bacteriófago líquido (por ej., hasta unos veinte litros) pueden secarse tan rápido como en aproximadamente treinta minutos, veinte minutos, o incluso diez minutos o menos. Por lo tanto, el secado se puede efectuar a una velocidad de aproximadamente un litro por minuto y medio, aproximadamente un litro por minuto o incluso dos litros por minuto.

30 Cuando se emplean procedimientos para formar productos bacteriófagos secos de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, la viabilidad de un producto bacteriófago líquido, o su virulencia (es decir, la capacidad del bacteriófago para infectar una bacteria hospedadora), se mantiene sustancialmente durante el proceso de secado. Como ejemplo, en algunas realizaciones, el producto bacteriófago seco que resulta de un proceso de secado de la presente invención puede reducir el número de partículas de bacteriófago viables o virulentas a no menos del diez por ciento (10 %) del número de partículas de bacteriófago viables o virulentas que estaban presentes en el producto bacteriófago líquido inicial, lo que representa una reducción de no más de un log (10<sup>1</sup>) de las partículas de bacteriófago viables o virulentas. En algunas realizaciones, puede ser aceptable una reducción de dos log (10<sup>2</sup>) de partículas de bacteriófago viables o virulentas, incluyendo el producto bacteriófago resultante al menos el uno por ciento (1 %) de las partículas de bacteriófago viables o virulentas que estaban presentes en el producto bacteriófago líquido inicial. En otras realizaciones, la reducción de partículas de fago viables puede ser tan pequeña como de aproximadamente 25 % o menos, conservando aproximadamente el 75 % o más de las partículas de fago su viabilidad durante todo el proceso de secado.

45 Como se señaló anteriormente, debido a la naturaleza delicada del bacteriófago (por ej., las fibras de la cola u otras áreas que necesita el bacteriófago para adsorberse eficazmente a un microorganismo hospedador diana), las condiciones (por ej., fuerzas de cizalladura, temperaturas, etc.) de los procesos convencionales de secado (por ej., liofilización convencional, secado por pulverización convencional, etc.) han frustrado todos los intentos realizados para formar productos bacteriófagos secos con niveles aceptables de partículas de bacteriófago viables o virulentas.

De hecho, los primeros intentos por convertir los productos bacteriófagos líquidos en productos bacteriófagos secos no tuvieron éxito, como lo demuestra el siguiente ejemplo.

**Ejemplo 1**

50 Los procesos de secado por pulverización convierten los líquidos a granel en una pulverización o neblina fina, que finalmente se convierte en un polvo fino mediante el uso combinado de aire a presión y calor. La conversión de un líquido a granel en una pulverización o niebla fina puede efectuarse a través de un proceso llamado "atomización". La atomización se puede realizar a través de una variedad de técnicas conocidas. Ejemplos de tales técnicas incluyen la atomización a través de boquillas de alta presión y atomización rotatoria.

55 Los sistemas de atomización por boquillas generan las fuerzas de cizallamiento más altas, que se inician en una bomba de alimentación de alta presión, a continuación, canalizan el líquido a granel introducido a través de un

orificio de alta precisión. Una vez que la niebla fina se inyecta de forma segura a través del orificio, la niebla se calienta. La mezcla de las gotitas con el calor es un proceso relativamente lento con un sistema de boquilla, como es la transferencia de calor resultante de la gotita.

5 En los sistemas de atomización rotatoria, las presiones que se requieren y las fuerzas de cizallamiento que se aplican a un líquido a granel son considerablemente menores que las utilizadas en los sistemas de atomización por boquilla. Debido al complejo proceso de atomización, el número de piezas móviles se incrementa ligeramente y los costos de reparación son ligeramente superiores. En general, se creía que la atomización rotatoria proporcionaría la mejor solución para el secado de productos bacteriófagos líquidos a granel.

10 Se realizó un estudio de atomización rotatoria usando un secador de pulverización por atomización rotatorio PRODUCTION MINOR™, disponible en GEO Niro de Søborg, Dinamarca. Se usaron productos bacteriófagos líquidos (es decir, productos de fermentación que incluían el bacteriófago, medios de fermentación y residuos bacterianos o lisado) que incluían tres tipos diferentes de bacteriófagos, cada uno eficaz en el control de un huésped bacteriano diferente: (1) bacteriófago eficaz contra *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*, un patógeno vegetal (causante del chancro en las plantas de tomate), (2) bacteriófago eficaz contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, un patógeno vegetal (causante del punteado en plantas de tomate y pimienta) y (3) bacteriófago eficaz contra *Escherichia coli* O157:H7, un patógeno humano (causante de enfermedad y muerte entre los humanos). En un esfuerzo por optimizar la recuperación de bacteriófagos viables o virulentos, el secador de pulverización de atomización rotatorio se ajusta a su nivel más bajo posible de temperatura de entrada y salida.

15

Los parámetros del proceso y los resultados se muestran a continuación:

Nº de análisis	DATOS DE LA PRUEBA NIRO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fecha	5 Dic	5 Dic	5 Dic	5 Dic	5 Dic	5 Dic	6 Dic	6 Dic	6 Dic	6 Dic	6 Dic
<b>Material de alimentación</b>	CMM		CMM + almidón			XCV + leche			EC		EC + almidón
Número de alimentación	1		2			3			4		5
% de sólidos (1)	133 %		296 %			251 %			196 %		452 %
<b>Propiedades del material de alim.</b>											
% N-Lok 1930	-		100 00 %			-			-		100 00 %
Almidón añadido											
Leche desnatada concentrada 25 %						2 5 litros					
Densidad (c/cm <sup>3</sup> )	1,010		1,010			1,010			1,040		1,010
Densidad medida a 0 °C	5,5		11,5			8,4			11,2		12,9
Viscosidad (centipoise), AVG. (5)	-		-			-			-		-
Muestra/Huso	A B		A B			A B			A B		A B
RPM.6	5,0 35,0		15,0 10,0			5,0 0,0			10,0 10,0		0,0 0,0
RPM.12	2,5 22,5		12,5 17,5			12,5 00			15,0 10,0		2,5 5,0
RPM.30	7,5 8,0		8,0 6,0			8,0 3,0			6,0 6,0		6,0 9,0
RPM.60	4,5 4,0		4,0 5,0			5,5 3,5			4,0 4,5		5,5 5,5
Nº de huso	1		1			1			1		1
Viscosidad medida a 0 °C	5,5		11,5			8,4			11,2		12,9
pH	6,20		6,15			7,15			7,40		7,33
pH medido a 0 °C	5,5		11,5			8,4			11,2		12,9
<b>Condiciones de secado</b>											
Procedimiento de atomización											
Velocidad del atomizador (RPM)	30000	30000	30000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	15000
Caudal de aire (kg/h)	438	426	411	406	400	40C	395	385	406	406	411
Temperatura de entrada (°C)	199	201	200	199	220	220	221	221	221	221	222

(continuación)

Nº de análisis	DATOS DE LA PRUEBA NIRO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura de salida (°C)	91	111	121	119	132	130	110	130	119	119	110
Cantidad pulverizada (kg)	19,38	6,57	6,31	354	12,88	7,32	11,62	957	8,11	9,15	9,09
Velocidad de pulverización (kg/h)	15,93	11,94	14,03	9,22	12,26	9,76	14,52	11,48	12,17	18,30	17,59
Tiempo de análisis (h, minutos)	1,33	0,33	0,27	0,23	1,03	0,45	0,48	0,50	0,40	0,30	0,31
<b>Producto</b>											
Kilogramos producidos	"Granda"	0,115	0,080	0,072	0,278	0,143	0,173	0,168	0,155	0,120	0,271
% Fagos	100,00 %	50,00 %	50,00 %	50,00 %	50,00 %	25,00 %	25,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	50,00 %
% Humedad residual (%) 2	-	59,18 %	42,82 %	68,62 %	73,01 %	77,91 %	59,20 %	89,58 %	97,49 %	66,90 %	5,89 %
Distribución del tamaño de partículas (3)											
D 10 (10 % en peso menor que)	-	14,74	8,04	10,45	10,89	13,02	15,60	6,98	7,06	8,26	10,38
D 50 (150 % en peso menor que)	-	52,20	14,41	22,69	20,52	30,67	50,10	13,21	13,14	16,02	21,18
D 90 (90 % en peso menor que)	-	361,24	25,19	67,61	49,98	138,91	123,16	21,02	20,69	25,56	37,02
Densidad a granel (gramos/cm <sup>3</sup> )	-	0,381	0,288	0,344	0,351	0,170	0,160	0,282	0,270	0,297	0,200
Densidad compactada (gramos/cm <sup>3</sup> )	-	0,378	0,369	0,446	0,450	0,237	0,179	0,340	0,334	0,366	0,263

**Notas\***

- (1) Balanza de humedad Sartorius a 95 °C durante 10 minutos, 2 gramos de muestra del material añadido
- (2) Balanza de humedad Sartorius a 95 °C durante 30 minutos, 1 gramo de muestra del producto
- (3) Hortbe LA=910 Analizador del tamaño de las partículas por dispersión de láser
- (4) El material rasquetado era una combinación de múltiples análisis (análisis 6-7 y 8-11)
- (5) Staren N-Lock 1930 añadido en una proporción 1:1 de los sólidos originales añadidos
- (6) Viscosímetro Brookfield LVG

(continuación)

**OL ESPERADOS CALCULADOS**

Títulos calculados del polvo (esperado)											
Muestra de polvo "A"	N/A	1,59E+10	220E+10	1,37E+10	1,29E+10	3,59E+10	4,71E+10	3,11E+09	2,86E+09	4,16+09	1,78E+09
Título 100 % (Max + Aglutinante)											
Título después de la recuperación de fagos %	N/A	9,42E+09	9,41E+09	9,40E+09	9,43E+09	2,80E+10	2,79E+10	2,79E+09	2,79E+09	2,79E+09	1,17E+09
<b>OL REALES</b>											
Muestra de polvo "A" (1/11/07) Prueba 1		1,00E+05	3,60E+04	6,30E+04	120E+04	2,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,20E+02	1,20E+02	1,40E+02
Muestra de polvo "B" (2/07/07) Prueba 1		55,0E+04	3,10E+08	5,50E+04	1,30E+04	2,30E+05	1,10E+05	1,00E+05	1,10E+02	1,63E+02	1,20E+02

- Las tasas de recuperación predichas del producto bacteriófago seco (un polvo) para el control de los dos patógenos vegetales estaban en el intervalo de  $1,29 \times 10^{10}$  ufp/ml (bajo) a  $4,71 \times 10^{10}$  ufp/ml (alto). Los resultados reales se observaron en el intervalo de  $1,20 \times 10^4$  ufp/ml (bajo) a  $3,1 \times 10^6$  ufp/ml, o una reducción logarítmica de 4 a 6 de bacteriófagos viables o virulentos. El bacteriófago eficaz contra patógenos humanos dio resultados aún peores, con
- 5 tasas de recuperación predichas del producto bacteriófago seco en el intervalo de  $1,17 \times 10^9$  ufp/ml (bajo) a  $4,16 \times 10^9$  ufp/ml (alto) y los resultados reales se observaron en el intervalo de  $1,10 \times 10^2$  ufp/ml (bajo) a  $1,80 \times 10^2$  ufp/ml, lo que representa una reducción de  $7 + \log$  de los bacteriófagos viables o virulentos. Debe tenerse en cuenta que se aplicaron las condiciones de proceso más óptimas e incluso así los resultados fueron muy decepcionantes.
- A pesar de las grandes expectativas puestas en los procesos de secado por pulverización rotatorios y su fracaso posterior y significativo, se realizó otro estudio para determinar si se podría producir un producto bacteriófago seco aceptable. En ese estudio se utilizaron los procesos de secado por combustión a pulsos.
- 10 El secado por combustión a pulsos puede efectuarse de una manera que prácticamente elimina cualquier posible cizallamiento.
- En algunas realizaciones, el porcentaje de contenido de sólidos del producto bacteriófago líquido puede aumentarse antes de que el producto bacteriófago líquido se someta a procesos de secado. Por ejemplo, un material de soporte puede ser pre-disuelto o mezclado de otro modo en el producto bacteriófago líquido. Sin limitar el alcance de la presente invención, el material de soporte puede incluir leche en polvo (por ej., leche en polvo sin grasa, etc.), trehalosa, maltodextrina o similar.
- 15 Se pueden utilizar técnicas de atomización dinámicas de gas conocidas con una presión de alimentación extremadamente baja (por ejemplo, aproximadamente 0,0690 bar); es decir, la presión a la que un producto bacteriófago líquido se introduce en un aparato de secado por combustión a pulsos. En algunas realizaciones, la baja presión de alimentación se puede lograr mediante la introducción del producto bacteriófago líquido en el aparato de secado por combustión a pulsos mediante un tubo abierto, en lugar de mediante un orificio de precisión o rueda, en un secador.
- 20 En el proceso de secado, las gotitas del producto bacteriófago líquido se expusieron casi instantáneamente a calor.
- Al adaptar uno o más de los tipos de material de soporte, la cantidad de material vehículo, velocidad/presión de la bomba de alimentación, presión de combustión (por ej., de aproximadamente 0,10 bar (aproximadamente 1,5 psi), etc.), temperatura de contacto (por ej., aproximadamente 540°C (aproximadamente 1020 °F) o menos, etc.), temperatura de salida (por ej., aproximadamente 82°C (aproximadamente 180 °F) o menos, etc.) y la cantidad de
- 30 tiempo que un producto bacteriófago líquido y/o un producto bacteriófago seco se expone a una temperatura aumentada, se puede crear un ambiente donde los porcentajes de recuperación de bacteriófagos (es decir, viabilidad, virulencia, etc.) son extremadamente altos.

## Ejemplo 2

- En un estudio en el que se utiliza secado por combustión a pulsos, se hizo un fantástico descubrimiento: los
- 35 porcentajes de recuperación de bacteriófagos fueron extremadamente altos en comparación con otras técnicas, incluyendo porcentajes de recuperación de aproximadamente el 1 % o más, porcentajes de recuperación de alrededor 10 % o más y, observándose en algunos casos, una recuperación de hasta el 100 %, lo que pone de manifiesto la viabilidad del secado por combustión a pulsos como una técnica para obtener productos bacteriófagos secos.
- 40 Una vez más, en este estudio, dos de los tres tipos diferentes de productos bacteriófagos líquidos (es decir, productos de fermentación que incluyen el bacteriófago, medios de fermentación, y residuos bacterianos o lisado) utilizados en el estudio anterior se repitieron aquí: (1) bacteriófago eficaz contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, un patógeno vegetal (provoca el punteado en plantas de tomate y pimiento) y bacteriófagos (2) eficaces contra *Escherichia coli* O157: H7, un patógeno humano (causante de enfermedad y muerte entre los humanos). Los
- 45 contenidos de sólidos de los productos bacteriófagos líquidos aumentó al añadir los materiales de soporte.

Las tablas presentadas a continuación muestran los parámetros del proceso y los resultados de varias pruebas de secado por combustión a pulsos que se efectuaron mediante un secador por combustión a pulsos disponible en Pulse Combustion Systems de Payson, Arizona, en las cuales, los productos bacteriófagos líquidos se convirtieron en productos bacteriófagos secos:



Ensayo Patógeno Humano

Producto Lavado Bac  
Fecha: 23/05/07

Tamaño vent. 1 3/8  
Ubicación vent. 4  
Unidades Kg  
Tipo de boquilla T1 Peristáltica  
Tipo de bolsa Misc Fett  
Config. secador ciónico

Material de alimentación	Alim. 4			Alim. 5			Alim. 6			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Sólidos en el mat. alim. %	15,28%	15,28%	15,28%	15,28%	15,99%	15,99%	15,99%	14,78%	14,78%	14,78%
Ajuste del secador										
Liberación de calor Btu/h	84,000	84,000	84,000	84,000	84,000	84,000	84,000	84,000	84,000	84,000
Válvula de combustible %	68,2%	68,3%	68,5%	68,6%	68,8%	69,0%	69,2%	69,4%	69,6%	69,8%
Temp. de contacto, °F	1,013	1,038	1,048	1,041	1,039	1,041	1,040	1,048	1,048	1,048
Temp. de salida, °F	160	170	180	180	170	180	180	170	180	180
Cámara de filtros, PD	0,98	1,77	1,83	1,05	1,85	2,09	1,75	1,80	1,86	1,86
Aire turbo, psi	71,5	71,1	70,6	69,0	69,4	69,3	69,6	69,4	69,2	69,2
Ajuste RAV	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%
Ajuste aire de salida	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%
Ajuste aire comb.	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%
Ajuste aire neutr.	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%
Ajuste aire trans.	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Velocidad bomba alim.	4,5%	4,4%	4,2%	4,8%	4,8%	4,3%	5,2%	5,4%	4,9%	4,9%
Presión del aire de comb.	1,6	1,55	1,54	1,49	1,48	1,47	1,46	1,45	1,44	1,44
Hora de inicio	9:27	9:47	10:06	9:27	12:13	12:34	12:44	13:26	13:42	13:53
Hora de finalización	9:47	10:06	10:39	10:39	12:34	12:44	12:47	13:42	13:53	14:02
Tiempo de análisis	0:20	0:19	0:33	1:12	0:21	0:10	0:03	0:34	0:13	0:09
Resultados										
Peso inicial alim., kg	18,90	14,80	7,00	18,90	10,15	4,50	2,00	10,15	7,00	3,00
Peso final alim., kg	14,88	7,00	-	4,50	2,00	-	-	7,00	3,00	-
Neto alim. durante análisis, kg	3,94	7,80	7,00	18,90	5,65	2,50	2,00	10,15	3,00	3,00
Sólidos secos añadidos durante análisis, kg	0,60	1,20	1,07	2,87	0,40	0,40	0,32	1,82	0,45	0,44
Recuperación en colector de polvo, kg	0,14	0,25	0,40	0,79	0,45	0,13	0,17	0,75	0,17	0,21
Recuperación rasqueteado, kg			0,53	0,53			0,34	0,34		0,53
Recuperación rasqueteado, kg			0,00	0,00			0,00	0,00		0,00
Rendimiento colector de polvo, %	23,3%	20,8%	37,4%	27,5%	49,6%	32,5%	53,2%	48,2%	37,6%	32,1%
Rendimiento rasqueteado, %	0,0%	0,0%	49,6%	18,4%	0,0%	0,0%	106,3%	20,9%	0,0%	119,5%
Rendimiento rasqueteado, %	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Rendimiento total, %	23,3%	20,8%	86,8%	46,0%	49,6%	32,5%	159,5%	69,2%	37,6%	32,1%
Humedad del polvo en colect. de polvo, %	6,83%	6,41%	6,34%	6,60%	7,58%	6,40%	6,78%	6,99%	7,80%	7,80%
Tasa de evaporación, pph	22,07	46,35	23,70	29,26	29,60	27,77	74,09	33,17	26,53	40,68
Eficiencia térmica	3,045	1,450	2,628	2,297	2,248	2,420	907	2,026	2,533	1,840

Título calculado (esperado)										
Máx. con mat. de soporte añadido	8,24E+08	9,21E+08	2,20E+09	4,17E+08	3,08E+08	5,83E+08	1,15E+09	2,73E+08	5,27E+08	6,17E+08
Max. mat. de soporte y rendimiento	1,62E+08	1,62E+08	1,62E+08	1,62E+08	1,63E+08	1,63E+08	1,63E+08	1,63E+08	1,68E+08	1,68E+08
Título real										
10/7/2007	3,50E+07	3,50E+07	1,90E+08	1,18E+07	2,49E+07	8,80E+07	1,31E+08	1,55E+08	1,23E+08	
% Real respecto calculado	16,26%	28,02%	70,42%	6,19%	13,63%	43,67%	70,24%	78,21%	65,69%	

Notas:

Alimentación 4 – se inició con 1,56%, a continuación, se mezcló 10:1 con trehalosa hasta 15,28%  
 Alimentación 4 – 18,80 kg = 16,26 kg Lavado Bac + 2,54 kg de trehalosa  
 Análisis 4A – Producto vitrificado en cámara y ligeramente adherido al frasco de recogida – Se intentó con frascos de recogida calientes y fríos con una pequeña diferencia, el polvo recuperado tenía buen aspecto  
 Análisis 4B – El polvo se extrajo del frasco más fácilmente que en 4A  
 Análisis 4C – Los mismos resultados que en 4B

Alimentación 5 – se inició con 1,54%, a continuación se mezcló 10:1 con maltodextrina hasta 15,99%  
 Alimentación 5 – 10,15 kg = 8,80 kg de Lavado Bac + 1,35 kg de maltodextrina  
 Análisis 5A a 5C – Sin problemas ni nada que notificar

Alimentación 6 – se inició con 1,54%, a continuación se mezcló 10:1 con leche en polvo desnatada hasta 14,78%  
 Alimentación 6 – 10,00 kg = 8,72 kg de Lavado Bac + 1,34 kg de maltodextrina  
 Análisis 6A a 6C – Sin problemas y sin depósitos significativos en la cámara después del rasqueteado



Ensayo Patógeno Vegetal

Tamaño vent.	1.5E
Ubicación vent.	4
Unidades	kg

Tipo de boquilla peristáltica  
 Tipo de bolsa Misc Fett después anal.1D  
 Config. secador

Material de alimentación	Alim. 1			Alim. 2			Alim. 3			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Sólidos en el mat. alim., %	21.69%	21.69%	21.69%	21.69%	21.69%	21.69%	21.69%	21.69%	21.69%	
Ajuste del secador	34,000	84,000	84,000	34,000	84,000	84,000	34,000	84,000	84,000	
Libera. de calor Btu/h	66.6%	66.7%	66.6%	66.6%	66.7%	66.6%	66.6%	66.6%	66.6%	
Válvula de combustible %	1.032	1.033	1.032	1.021	1.021	1.027	1.028	1.024	1.021	
Temp. de contacto, °F	180	180	180	180	180	180	180	180	180	
Temp. de salida, °F	0.15	0.24	0.43	0.13	0.11	0.56	1.05	1.16	1.22	
Cámara de filtros, PD	75.7	78.4	75.7	78.4	68.5	68.5	68.5	68.5	68.5	
Aire turbo, psi	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	85%	
Ajuste RAV	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	
Ajuste aire de salida	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	
Ajuste aire neutr.	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	
Ajuste aire trans.	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	
Velocidad bomba alim.	4.35	1.54	1.52	1.5	1.49	1.1	5.0	5.0	5.0	
Presión del aire de comb.	9.24	9.42	9.55	11.26	11.19	12.68	14.28	14.38	14.47	
Hora de inicio	9:42	9:55	10:00	11:19	12:56	13:23	14:38	14:47	13:59	
Hora de finalización	0:18	0:13	0:08	0:10	1:37	0:27	0:12	0:09	0:33	
Tempo de análisis										
<b>Resultados</b>										
Peso inicial alim., kg	25.67			19.37	15.20		19.50	16.00	21.67	17.00
Peso final alim., kg				15.20	7.68		10.20	5.08	17.00	15.00
Neto alim. durante análisis, kg				4.17	7.68		9.30	4.67	7.00	10.00
Sólidos secos añadidos durante análisis, kg				0.00	1.65		2.43	0.81	1.26	1.64
Recuperación en colector de polvo, kg	0.22	0.15	0.04	0.15	0.45		0.27	0.38	0.60	0.27
Recuperación rasquetado, kg				0.09	0.36			1.18		1.16
Recuperación rasquetado, %				0.20	0.00					
Rendimiento colector de polvo, %				16.6%	27.6%		55.1%	41.5%	44.2%	34.5%
Rendimiento rasquetado, %				10.0%	21.8%		49.5%	0.0%	0.0%	75.2%
Rendimiento rasquetado, %				0.0%	0.0%		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Rendimiento total, %				26.6%	29.0%		100.5%	41.5%	44.2%	109.7%
Humedad del polvo en colect. de polvo, %	4.40%	5.75%	6.64%		3.69%		5.16%	6.15%	6.19%	7.29%
Tasa de evaporación, pph				49.18	29.24		39.19	16.19	32.44	44.41
Eficiencia térmica				1.566	2.599		2.231	2.266	2.072	1.513

<b>Título calculado (esperado)</b>										
Máx. con mat. de soporte añadido	3.31E+09	2.11E+09	1.23E+09	4.19E+08	1.37E+09	1.30E+09	6.22E+08	6.22E+08	6.22E+08	
Máx. mat. de soporte y rendimiento	6.42E+08	4.32E+08	1.62E+08	4.25E+08	3.72E+08	3.72E+08	3.72E+08	3.72E+08	3.72E+08	
<b>Título real</b>										
10/7/2007	7.35E+08	5.85E+08	1.22E+08	3.12E+08	3.01E+08	3.01E+08	3.01E+08	3.01E+08	3.01E+08	
% Real respecto calculado	36.04%	30.70%	37.68%	27.51%	11.00%	7.70%	7.70%	148.10%	95.67%	58.22%

**Notas:**

Alimentación 1 - se inició con 2.32%<sub>s</sub>, a continuación, se mezcló 10:1 con trehalosa hasta 21.69%  
 Alimentación 1 - 21.45 kg = 17.41 kg de punteado de tomate + 4.04 g de trehalosa  
 Análisis 1A - polvo óptimo  
 Análisis 1B - polvo óptimo  
 Análisis 1C - polvo atascado en "ilegible"  
 Análisis 1D - cámara de filtros con PD elevada, polvo adherido en el frasco, segundo frasco sin ningún contenido  
 Análisis 1E - se limpiaron cámaras, conductos y secador ciclónico y se cambiaron las bolsas  
 Análisis 1D - el acero inoxidable del secador provocó que el polvo se fundiera y vitrificase: se lavaron las cámaras, los conductos y el secador ciclónico, se cambiaron las bolsas por Misc Fett ya que las bolsas Misc Fett estaban caramelizadas  
 Análisis 1E - polvo recuperado adherido al frasco de recogida. Frasco calentado antes de la instalación en el secador ciclónico.

Alimentación 2 - se inició con 2.34%<sub>s</sub>, a continuación, se mezcló 10:1 con maltodextrina hasta 22.44%  
 Alimentación 2 - 18.55 kg = 15.13 de punteado de tomate + 3.54 kg de maltodextrina  
 Análisis 2A, B, C - análisis sin problemas con buena recuperación  
 Análisis 2 - humedad del rasquetado 3.79%, producto no adherido a la cámara

Alimentación 3 - se inició con 2.06%<sub>s</sub>, a continuación se mezcló 10:1 con leche en polvo desnatada hasta 19.41%  
 Alimentación 3 - 21.67 kg = 18.05 kg de punteado de tomate + 3.62 kg de leche en polvo desnatada  
 Análisis 3A, B y C - análisis sin problemas, muy sencillos, polvo óptimo, la recogida en el análisis C no parece tan sencilla como en A y B

- 5 Las tasas de recuperación predichas del polvo seco (del bacteriófago utilizado para controlar el patógeno vegetal) estaban en el intervalo de  $4,55 \times 10^8$  ufp/ml (bajo) a  $6,52 \times 10^8$  ufp/ml (alto). Se observó que los resultados reales estaban en el intervalo de  $3,50 \times 10^7$  ufp/ml (bajo) a  $8,50 \times 10^8$  ufp/ml, o una reducción de menos de un log ( $10^1$ ) de bacteriófagos viables o virulentos, en todos los casos y dentro del error de titulación (dentro del 50 %) en la mayoría de los casos. El bacteriófago eficaz contra patógenos humanos produjo resultados similares con tasas de recuperación predichas del polvo seco en el intervalo de  $1,83 \times 10^8$  ufp/ml (bajo) a  $1,98 \times 10^8$  ufp/ml (alto), observándose los resultados reales en el intervalo de  $1,50 \times 10^7$  ufp/ml (bajo) a  $1,40 \times 10^8$  ufp/ml, de nuevo una reducción de un log ( $10^1$ ) o menos en los bacteriófagos viables en todos los casos y dentro del error de titulación (dentro del 50 %) en muchos casos.
- 10 En diversas realizaciones, la presente invención incluye la producción de un producto bacteriófago seco altamente eficaz (por ej., en forma de polvo) a partir de un producto bacteriófago líquido, que puede comprender cualquier combinación de medios de fermentación, sulfato de magnesio, lisado, bacterias, agua desionizada, destilada o del grifo filtrada, lisozima, ADNasa, ARNasa y agentes antiespumantes o a través de la manipulación del bacteriófago líquido descrito mediante la adición de productos químicos tales como KOH o NaOH a efectos de ajustar el pH.
- 15 En algunas realizaciones, se puede incluir un material de soporte opcional (tal como leche en polvo, trehalosa, maltodextrina o similares) con el fin de aumentar el porcentaje de contenido de sólidos del material de alimentación original, manteniendo al mismo tiempo la viabilidad del polvo final. Potencialmente, esto puede aumentar el porcentaje de sólidos en la alimentación de un bajo porcentaje (por ej., 5 % o menos) a un porcentaje mucho más alto (por ej., 20 % o más). Realizaciones en las que no se utiliza ningún material de soporte, o en las que se utilizan diferentes tipos de materiales de soporte, están, por supuesto, también dentro del alcance de la presente invención.
- 20 Una amplia variedad de diferentes tipos de bacteriófagos se pueden secar de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, incluyendo, sin limitación, bacteriófagos que son eficaces contra patógenos humanos, patógenos de origen animal, patógenos vegetales o cepas no patógenas de bacterias. Esto incluye, pero no está limitado a, bacteriófagos que son eficaces contra uno o más de los siguientes patógenos vegetales: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, etc. También
- 25

incluye, pero no está limitado a bacteriófagos que son eficaces contra uno o más de los siguientes patógenos humanos: *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Propionibacterium*, etc.

- 5 En algunas formas de realización, se pueden utilizar procesos de secado por pulverización incluyendo procesos de secado por combustión a pulsos. Un proceso de secado por combustión a pulsos efectivo puede emplear, en algunas realizaciones, fuerzas de cizallamiento mínimas, emplear temperaturas globales relativamente bajas y/o minimizar la cantidad de tiempo de exposición de un producto bacteriófago líquido a una temperatura aumentada. Estos procesos pueden llevarse a cabo en períodos de tiempo relativamente cortos (por ej., menos de diez horas, aproximadamente dos horas o menos, alrededor de una hora o menos) manteniéndose sustancialmente la
- 10 viabilidad, o la virulencia de las partículas de bacteriófago del producto bacteriófago líquido a granel (por ej., el producto bacteriófago seco tiene al menos uno por ciento, al menos el diez por ciento, etc., de la viabilidad, o la virulencia, del producto bacteriófago líquido a granel).

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para fabricar una preparación de bacteriófagos secos, que comprende someter un líquido a granel que incluye un bacteriófago a un secado por combustión a pulsos.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que someter comprende someter un líquido a granel que incluye el bacteriófago y al menos uno de un medio de fermentación, un lisado y una bacteria hospedadora al secado por combustión a pulsos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además:  
10        introducir un material de soporte en el líquido a granel para aumentar el contenido de sólidos del líquido a granel,  
      en el que someter comprende someter un líquido a granel que incluye el material de soporte al secado por combustión a pulsos.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la introducción del material de soporte comprende ajustar un contenido de sólidos del líquido a granel de al menos el 20 %.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que la introducción del material de soporte comprende la introducción de al menos uno de leche en polvo, trehalosa y maltodextrina en el líquido a granel.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que someter comprende someter el líquido a granel a una presión máxima de 0,1 bar.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que someter comprende someter el líquido a granel a una temperatura de contacto de 540°C o menos.
- 20 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el proceso de secado por combustión a pulsos emplea una temperatura de salida de 82 °C o menos.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que someter el líquido a granel al secado por combustión a pulsos tiene como resultado, a lo sumo, una reducción de un log en el número de partículas de bacteriófagos viables desde el líquido a granel a un producto bacteriófago seco.
- 25 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el secado por combustión a pulsos se efectúa a una velocidad de un litro cada noventa segundos, o más rápido.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el líquido a granel tiene un volumen de hasta veinte litros.