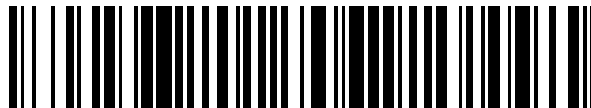


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 858**

51 Int. Cl.:

**A23K 1/00** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2007 E 07785782 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2124607**

54 Título: **Comida para mascotas, recubierta a vacío**

30 Prioridad:

**21.02.2007 EE 200700008**

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

**06.03.2015**

73 Titular/es:

**BACTERFIELD GMBH (100.0%)  
Hamburg Fleethof, Stadthausbruecke 1-3  
20355 Hamburg, DE**

72 Inventor/es:

**KIREJEVAS, VYGANTAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 530 858 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

Comida para mascotas, recubierta a vacío

### Campo técnico

- 5 Esta invención se refiere a la combinación de una composición de comida para mascotas y al proceso de fabricación de la línea de productos de comidas para mascotas *super premium*. Más específicamente, la invención se refiere en un primer y segundo aspectos a croquetas para mascotas y en un tercer aspecto a un método para producir las croquetas para mascotas del primer y segundo aspectos. La invención se define en las reivindicaciones.

### TÉCNICA ANTERIOR

#### La microflora

- 10 Todos los animales nacen con un intestino relativamente estéril. Por lo tanto, el animal recién nacido será más fácilmente colonizado por microorganismos patógenos ya que no tiene microflora protectora para reducir la colonización de patógenos en esta etapa de la vida.

- 15 Poco después del nacimiento, el animal recién nacido adquiere una colección compleja de microorganismos que pueblan su tracto intestinal. Esta colección de microorganismos se denomina microflora. La microflora intestinal contiene una variedad de diferentes bacterias y hongos de los cuales hay típicamente ~400 tipos diferentes de microorganismos con una población total de  $\sim 10^{14}$  a lo largo de todo el tracto intestinal.

#### Ubicación en el sistema digestivo

Esta colección compleja de microorganismos intestinales está distribuida a lo largo de todo el intestino. Dentro de regiones particulares los organismos se pueden encontrar en tres nichos:

- 20 (a) asociados a la pared intestinal. Pueden estar unidos directamente al epitelio como en el caso de los lactobacilos en el cultivo o atrapados en la capa mucosal del epitelio como sucede en el intestino ciego,
- (b) unidos a las partículas alimenticias,
- (c) en suspensión en la fase líquida del contenido intestinal.

#### Composición

- 25 La composición de la flora varía en las diferentes regiones del intestino y depende de factores tales como el pH. El intestino delgado tiende a estar dominado por lactobacilos con un número menor de otros microorganismos anaerobios opcionales, tales como bacterias coliformes y estreptococos. Las regiones posteriores del intestino tienen gran número de bacterias anaerobias restringidas (capaces de existir solo bajo un conjunto de condiciones ambientales). El intestino ciego, en particular, favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios, tales como
- 30 clostridios y bacteroides.

La microflora que se desarrolla en el tracto intestinal del perro es característica de dicha especie, habiendo desarrollado una asociación simbiótica con el hospedante. Esto se aplica en particular a la microflora cecal.

#### Papel de la flora intestinal en la digestión

- 35 La microflora establece una relación simbiótica con el hospedante y este se beneficia por su ayuda a la digestión produciendo diversas enzimas, que están implicadas en la digestión/descomposición de las grandes partículas/polisacáridos alimenticios, tal como celulosa.

Las bacterias en el intestino también pueden estimular una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los animales libres de gérmenes tienen menores niveles de gamma-globulina que los animales convencionales con una flora intestinal completa.

- 40 El uso de antibióticos puede afectar adversamente a la flora intestinal. Cuando se utilizan antibióticos, como un tratamiento para una enfermedad clínica, se elimina una proporción de los microorganismos beneficiosos lo que puede conducir a un aumento de la sensibilidad del intestino a la colonización de bacterias patógenas. La consiguiente reducción de la resistencia a las enfermedades se manifiesta por un aumento de la vulnerabilidad a la salmonella y otras colonizaciones por agentes patógenos del intestino, lo que puede conducir a diarrea.

- 45 Un factor que debe ser considerado cuando se trata de animales es el estrés. Existen pruebas convincentes de que el estrés puede afectar a la composición de la microflora intestinal. El estrés puede ser descrito como un factor que estimula las respuestas homeostáticas, fisiológicas y conductuales por encima de los valores normales. La única medida aceptada de la presencia o ausencia de estrés es el nivel en sangre de corticosteroides suprarrenales que llegan a aumentar durante el estrés, afectando al movimiento peristáltico del intestino y a la producción de mucosidad en el intestino. El estrés también afecta a la microflora intestinal reduciendo la concentración de
- 50

lactobacilos y otras bacterias del ácido láctico (BAL) y aumentando las concentraciones de coliformes, tal como *E. coli*.

5 Todas las situaciones de estrés a las que está expuesto un animal contribuyen a un aumento del pH del intestino (más alcalino) y por lo tanto en el tracto gastrointestinal es probable que se favorezca el desarrollo de especies patógenas, tales como *E. coli*, en detrimento de especies beneficiosas.

La vacunación, la terapia con antibióticos, el destete, los viajes, el realojamiento o las enfermedades son algunos de los factores que se consideran estresantes y que pueden dar como resultado un cambio de equilibrio de la flora intestinal en favor de especies patógenas.

10 También se sabe que el estrés altera el contenido de proteasa en la saliva. Como resultado, en los individuos estresados se pierden de la superficie bucofaringea la fibronectina y la población de bacterianas autóctonas (comensales). Esta población autóctona es entonces rápidamente sustituida por una biopelícula compuesta en gran parte de *Pseudomonas aeruginosa*.

15 El estrés puede debilitar la respuesta inmunitaria de los animales y seres humanos y se ha demostrado que algunos antibióticos debilitan la respuesta inmunitaria conduciendo significativamente a una reducción del peso del bazo y el timo. En estos casos, la retirada de los antibióticos puede conducir a la restauración de la flora intestinal y al retorno de la función inmunitaria. Los antibióticos también pueden reducir con frecuencia la población de lactobacilos. De ahí que los animales que superan el estrés presenten alteraciones y descomposición del mecanismo regulador en el ecosistema del tracto gastrointestinal, permitiendo un establecimiento más fácil de patógenos en el tracto.

20 El Dr. Roy Fuller definió un probiótico como un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal hospedante mejorando su equilibrio microbiano intestinal (Fuller, 1989). Esta definición resalta la importancia de las células vivas como componentes esenciales de los probióticos.

25 La palabra probiosis viene del griego: pro (para) y biosis (vida) y por lo tanto tiene un significado opuesto a antibiosis, que promueve la proliferación de especies bacterianas en el tracto gastrointestinal. La probiosis se define como "la propiedad de la flora normal del adulto para resistir el sobrecrecimiento de cepas propias y el establecimiento de cepas extrañas" y es reforzada o re-establecida por los probióticos.

El concepto de probióticos aplicado a la medicina preventiva se atribuye a Metchnikoff. Dicho microbiólogo postuló que la longevidad observada en los pueblos balcánicos se debía al consumo regular de leche agria que contiene *Lactobacillus bulgaricus*.

30 El intestino del animal recién nacido es relativamente estéril y por lo tanto es deficiente en los microorganismos que pueblan normalmente el intestino y proporcionan resistencia a las enfermedades. La intervención de un suplemento probiótico establece la microflora intestinal.

Se ha demostrado que los probióticos actúan con los siguientes mecanismos:

#### **Competencia por los nutrientes**

35 En el intestino, tanto los microorganismos beneficiosos como los patógenos utilizan los mismos tipos de nutrientes. Por lo tanto, habrá una competencia general por estos nutrientes para crecer y reproducirse. Por lo tanto, cuantos más microorganismos beneficiosos se encuentren en el intestino, mayor competencia se creará entre los microorganismos beneficiosos y los patógenos.

#### **Competencia por los sitios de adherencia**

40 La adherencia a los sitios de adherencia a lo largo de la pared del intestino es un factor de colonización importante y muchos patógenos intestinales dependen de la adherencia a la pared intestinal para evitar que sean arrastrados por los movimientos peristálticos de la comida a lo largo del tracto intestinal.

Estimulación de la inmunidad

Estimulación de la producción de anticuerpos (local y sistémica)

Aumento de la actividad de los macrófagos

45 Aumento de los niveles de gamma-interferón

Efecto antimicrobiano directo

Estos efectos se pueden conseguir por las bacteriocinas, que son conocidas por ser producidas por numerosas especies de bacterias del ácido láctico o por la producción de ácidos orgánicos, que pueden tener un efecto directo o actuar reduciendo el pH.

50

## Mejora de la digestión

Los microorganismos probióticos actúan de forma similar a la microflora sana y se incorporan a ella produciendo enzimas, que ayudan a la descomposición de las moléculas de polisacáridos y por lo tanto utilizan más nutrientes de la dieta. La microflora también produce vitaminas, que suministran al hospedante una fuente secundaria.

- 5 Para producir el efecto deseable una concentración mínima de microorganismos debe ser capaz de sobrevivir a la ingestión y crecer en el intestino. Sin embargo, la dosis eficaz mínima de bacterias vivas no se puede identificar fácilmente. Se ha sugerido que una vez que la concentración de un microorganismo particular cae hasta  $10^7$  por gramo de heces, este no desempeña ningún papel en el ecosistema, siempre que se mantenga por debajo de este nivel en todo momento. Esto es apoyado por las observaciones de que el animal hospedante puede tolerar poblaciones inferiores a  $10^7$  clostridios o enterobacterias por gramo de contenido intestinal. Por tanto, se postula que un probiótico será eficaz si proporciona al menos  $10^7$  UFC y por tanto estos niveles se han adoptado como dosis mínima.

Seguridad - los microorganismos elegidos como componentes de un probiótico deben ser no patógenos y no tóxicos.

- 15 Viabilidad - un probiótico sólo puede actuar si los microorganismos contenidos en el probiótico permanecen viables durante el almacenamiento del producto y a través del intestino para asegurar la colonización de estos microorganismos.

Dosis mínima - la concentración de un probiótico debe ser tal que las tasas de inclusión proporcionen  $10^7$ - $10^8$  UFC por animal.

- 20 Garantía de calidad - es esencial que un probiótico no haya sido contaminado por cualquier otro microorganismo distinto de los microorganismos probióticos particulares elegidos en cualquier etapa, por ejemplo, la fermentación, del proceso de fabricación o durante el almacenamiento.

- 25 Protexin es un probiótico altamente concentrado, que contiene millones de microorganismos beneficiosos, que existen de forma natural en el intestino de las aves y animales sanos. Estos microorganismos colonizan el intestino inmaduro o se restablecen en el intestino alterado, promoviendo así el mecanismo de exclusión competitiva contra las potenciales bacterias patógenas.

- 30 El microorganismo probiótico, *Enterococcus faecium*, descrito en esta invención se obtuvo de la colección de cultivos NCIMB (National Collections of Industrial and Marine Bacteria) reconocida internacionalmente. La cepa se cultivó en una cámara de fermentación con una capacidad de 5000 L. A continuación se protegió utilizando crioprotectores de recubrimiento y se liofilizó formando un polvo antes de ser mezclada con la comida para mascotas y otros componentes del concentrado de Protexin en concentraciones exactas.

Las instalaciones de fermentación deben cumplir los estándares muy altos de control de calidad (GMP) e higiene, ya que han sido autorizados también para producir microorganismos probióticos de calidad humana.

El *Enterococcus faecium* se selecciona por su capacidad para realizar funciones específicas dentro del tracto digestivo del hospedante. La justificación de su inclusión en comidas para mascotas se enumera a continuación:

- 35 *Enterococcus faecium*

Protege contra la diarrea por *E. coli* enterotoxigénica (Jin *et al.*, 2000; Underdahl *et al.*, 1982; Wadstrom, 1984).

Inhibe la *Salmonella* spp. incluyendo *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum* (Audisio *et al.*, 1999; Carina *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2001; Roach and Tannock, 1980) y la *Listeria* (Audisio *et al.*, 1999 y 2001).

- 40 Previene o acorta la duración de la diarrea asociada a antibióticos (Bergogre-Berezin, 2000; Elmer, 2001; Marteau *et al.*, 2001).

Activa la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas y ácido láctico) contra los patógenos intestinales (Audisio *et al.*, 1999 y 2001; Carina *et al.*, 2000).

Produce un efecto inmunoestimulante en los seres humanos (Agerholm-Larsen, 2000; Ferencik *et al.*, 1999 y 2000).

- 45 Crece en presencia de sales biliares y supervive en condiciones gástricas (pH ácido) (Canganella *et al.*, 1997; Nikoskelainen *et al.*, 2000; Zacconi *et al.*, 1992).

Coloniza el intestino (Nikoskelainen *et al.*, 2000; Zacconi *et al.*, 1992).

Previene la diarrea infantil aguda y otras enfermedades diarreicas (Elmer *et al.*, Proven efficacy in treatment of irritable bowel syndrome in humans (Gardiner *et al.*, 1999)).

Aumenta la actividad celulítica en el intestino ciego del pollo (Kumprecht *et al.*, 1984)

Reduce el colesterol en los seres humanos (Agerholm-Larsen, 2000; De Roos and Katan, 2000) y ratones (Zacconi *et al.*, 1992).

Algunos de los modos por los que los alimentos probióticos para mascotas pueden beneficiar al animal hospedante son:

- 5
  - reducción de los efectos del estrés
  - reducción de la diarrea y otros trastornos digestivos
  - mejora de la inmunidad y de la resistencia a las enfermedades
  - reducción de los niveles de *Salmonella*
  - mejora de la digestión.

10 Algunos de los modos por los que los probióticos pueden beneficiar al animal hospedante son:

- reducción de los efectos del estrés
- reducción de la diarrea y otros trastornos digestivos
- mejora de la inmunidad y de la resistencia a las enfermedades
- reducción de los niveles de *Salmonella*

15

- mejora de la digestión

No hay ningún inconveniente en utilizar alimento probiótico para mascotas en cualquier momento. No existen restricciones para el uso de Protexin. Este producto puede ser utilizado como comida en cualquier etapa de producción.

20 Esta invención contiene microorganismos que se encuentran comúnmente en todas las aves y animales sanos los cuales están considerados generalmente como seguros (GRAS, del inglés *Generally Regarded As Safe*).

Nunca se ha encontrado que el Protexin sea tóxico. Incluso más de 100 veces el nivel recomendado no causa ningún problema. Ninguno de los ingredientes utilizados en la fabricación de Protexin causará irritaciones ni reacciones alérgicas. Todos ellos cumplen las regulaciones alimentarias y están aprobados por la Food and Drug Administration de EE.UU.

25 Puesto que las bacterias de esta invención (Protexin) son inactivas e inertes en los excrementos no hay persistencia del aditivo ni de sus residuos en las heces. No se han encontrado efectos conocidos del Protexin sobre la metanogénesis. El Protexin es un material inerte que no persistirá en el medio ambiente. No se han encontrado efectos adversos conocidos del Protexin sobre la vida acuática, sobre la fauna ni las plantas terrestres.

Además tiene un gran número de ventajas:

- 30
  - es completamente seguro y está exento de riesgo de sobredosis
  - potencia los mecanismos naturales de defensa propios del animal y lo hace más capaz de luchar contra las infecciones oportunistas
  - es muy eficaz en una amplia variedad de condiciones.

35 El tracto digestivo de cualquier animal o ave será colonizado por muchos millones de microorganismos. Cuando el animal está sano y libre de enfermedades, la mayoría de estos microorganismos serán microorganismos beneficiosos. Sin embargo, aun cuando el animal esté sano, estará incluso colonizado de patógenos que causan potencialmente enfermedades en el intestino "sano". Estos patógenos están en una concentración tan baja que no se desarrollará la enfermedad hasta que se vean afectados la salud general de los animales y su estado inmunológico.

40 Esta invención y otros probióticos han demostrado que estimulan y mantienen un estado altamente inmunitario del animal o ave y por lo tanto ayudarán a prevenir enfermedades en un animal.

45 Por otra parte, los microorganismos probióticos beneficiosos contenidos en la presente invención actuarán para excluir competitivamente en el intestino microorganismos potencialmente patógenos. El Protexin, que contiene bacterias del ácido láctico y está incluido en la comida para mascotas, cuando coloniza el intestino, produce ácido láctico, que tiene un pH bajo, creando eficazmente las condiciones óptimas necesarias para el crecimiento de microorganismos beneficiosos. Esta acción ayuda a prevenir la colonización de bacterias coliformes, tal como *E. coli*, que prefieren un pH más alcalino.

El pH bajo muy ácido del estómago en la mayoría de los animales es la manera natural de intentar eliminar algo de la carga de infección presente en los os. Sin embargo, no es un proceso completamente eficaz como parece aparentemente debido a que la vía bucal/intestino es el modo más común de que entren los agentes infecciosos en el cuerpo.

5 El microorganismo contenido en esta invención es una bacteria del ácido láctico (BAL). Por definición estas bacterias producen ácido láctico que es ácido. Esto asegura el crecimiento de las bacterias en un medio ácido óptimo. Creando este ambiente ácido las BAL son capaces de evitar el crecimiento de bacterias coliformes, tal como *E. coli*, ya que estas prefieren para su crecimiento un pH más alcalino.

10 La comida para mascotas Protexin es también capaz de superar el problema de la esterilización del estómago al contener miles de millones de microorganismos, de modo que siempre habrá alguno que sorteará el píloro y podrá colonizar el intestino. También, el proceso de recubrimiento a vacío y liofilización, que se utiliza para conservar los microorganismos presentes en esta invención, incluye una encapsulación, que protege contra los ácidos del estómago.

15 Las cepas de microorganismos contenidas en la comida para mascotas son fermentadas en condiciones estrictamente controladas. Cada cepa tiene requisitos específicos para el crecimiento y parámetros tales como los medios, el pH, el oxígeno, la temperatura, etc., utilizados. Estos requisitos son controlados por ordenador y por muestreo. Además, se realizan análisis para determinar los contaminantes en todas las etapas de producción y fabricación.

20 Se ha prestado especial atención a la selección de las cepas de microorganismos contenidas en las comidas para mascotas con relación a la capacidad de resistir la acción de la bilis, enzimas y acidez, cuya acción pueda afectar significativamente a la viabilidad.

25 Es importante la protección de los microorganismos contra las condiciones ambientales adversas, tanto durante como después de la producción de bacterias. Se aplican crioprotectores antes de la liofilización. Esto proporciona una protección adicional contra la humedad, el oxígeno y el calor y aumenta sustancialmente la vida útil del producto final. Así, cuando se utiliza tecnología de recubrimiento a vacío es posible mantener dicha estabilidad en el producto final.

Durante un período de tres años, Probiotics International Ltd. realizó un trabajo definitivo en la Universidad de Birmingham investigando mejores métodos para proteger microorganismos. Este trabajo se ha aplicado en la práctica pero está bajo revisión constante a medida que se obtienen otros resultados de la investigación.

30 Este método describe la enumeración de *Streptococcus* y *Enterococcus* spp. por una técnica de inoculación superficial.

El método es aplicable a un suplemento alimenticio en polvo, pelet y a base de aceite (incluyendo pasta), tales como los probióticos.

35 Para los fines de este ensayo, las especies de estreptococos (incluyendo enterococos) se definen como bacterias formadoras de colonias típicas bajo las condiciones del ensayo, son cocos Gram-positivos y dan una reacción negativa en el ensayo de catalasa.

Aparato:

- Pipeta automática, 0,02 mL
- Cuentas de vidrio, estériles
- 40 - Incubadora ajustada a 30 +/- 1°C (o 37 +/- 1°C o 22 +/- 1°C)
- Microscopio
- Pipeta calibrada para suministrar 20 µL, 1,0 mL y 9,0 ml con puntas/pipetas graduada estériles asociadas
- Placas de agar-agar para métodos estándar (SMA) (recuento de placas)
- Tubos de ensayo tapados estériles
- 45 - Recipientes de boca ancha y tapón de rosca, estériles
- Homogeneizador Stomacher y bolsas para Stomacher, estériles
- Balanza de carga superior con equipo de tara, sensibilidad 0,01 g
- Mezclador de vórtice

## ES 2 530 858 T3

### Medios y Reactivos:

- solución acuosa de citrato sódico al 2% (p/v) (para ciertos productos lácteos)
- solución de peróxido de hidrógeno al 3%
- placas de agar-agar sangre (AS)

- 5 - miristato de isopropilo (éster isopropílico del ácido mirístico)
- agar-agar estreptocócico KF (KF)
  - diluyente de máxima recuperación (DMR) - contiene 0,1% de peptona, 0,85% de NaCl.

### Método:

- 10 Preparar una muestra de homogeneizado diluido 1/10 y otras diluciones decimales como se describe en los métodos A:1a y A:1b siguientes.

A partir de la mayor dilución, aplicar dos volúmenes de 0,02 de cada dilución a la superficie de un segmento marcado apropiadamente de una placa de KF y una placa de AS (véase A:2c).

- 15 Dejar que se sequen los inóculos. Invertir las placas e incubar a 37°C durante 48 +/- 2 horas. Examinar las placas después de 48 horas y contar. Las colonias con el mayor número de estreptococos aparecerán normalmente como colonias discretas pequeñas a medias grises o blancas sobre medio de agar-agar sangre. Las colonias de enterococos serán de color marrón/rosa oscuro sobre agar-agar estreptocócico KF y aparecerán después de un día de incubación. Los estreptococos que no sea enterococos crecerán en el medio de agar-agar sangre, pero no podrán crecer en agar-agar KF.

Contar las colonias de estreptococos/enterococos en ambos medios al final del periodo de incubación y registrarlas.

- 20 Confirmar la presencia de estreptococos por el aspecto de las colonias y por la realización de una tinción de Gram de diferentes formas coloniales si es necesario. Confirmar aún más la identidad realizando el ensayo de catalasa. Los cocos gram positivos que dan una reacción negativa en el ensayo de catalasa se consideran estreptococos/enterococos.

### Presentación de los resultados

- 25 Para obtener el número de microorganismos por gramo, se multiplica el número total de colonias contadas por la fracción de 5 colonias confirmadas como estreptococos (enterococos) y se divide por la dilución utilizada.

Si se ha utilizado una placa para goteo superficial, calcular el número de microorganismos por gramo (g) a partir del recuento de colonias confirmado como se describe en el Método A:2c anterior.

- 30 Documentar el número de estreptococos (enterococos) por g (o mL) de la muestra. Si el número es inferior a 100, expresar el número con una aproximación de 5. Si el número es 10 o más, expresar el número como dos cifras significativas multiplicadas por la potencia de 10 correspondiente, con una cifra antes y una cifra después de la coma decimal.

Si no se detectan colonias a la dilución  $10^{-1}$ , expresar el Recuento Viable Total (RVT) como  $<2,5 \times 10^2/g$ .

Límite de detección:  $2,5 \times 10^2/g$

- 35 Método A:1a Preparación de muestras de homogeneizados

Este método describe la preparación de muestras para producir un homogeneizado adecuado con fines de enumeración. El homogeneizado se puede utilizar para la preparación de otras diluciones.

- 40 La preparación y dilución inicial de las muestras varían en función de la naturaleza de la muestra que se vaya a examinar y el protocolo de cada cliente individual. En general, se pesa con exactitud una muestra de 10-25 g usando técnicas asépticas y se homogeneiza en suficiente diluyente para obtener una dilución 1/10.

### Preparaciones en polvo y en pelets

1. Agitar o mezclar perfectamente la muestra, si es posible en su envase, antes de tomar la parte alícuota para el laboratorio.
2. Pesar con exactitud asépticamente al menos 10 g en una bolsa tarada para el homogeneizador Stomacher.
- 45 3. Añadir aproximadamente el doble del peso de miristato de isopropilo.

4. Añadir un peso del diluyente de máxima recuperación (DMR) numéricamente igual a nueve veces el peso de la muestra para preparar una dilución 1/10. Registrar el peso final de la muestra más el diluyente, que debería ser 10 veces el peso de la muestra  $\pm$  5%, por ejemplo si se han pesado 10,5 g de la muestra el peso final debe ser 105 mL  $\pm$  5% o en el intervalo 100,3-110,2 mL.
- 5 5. Permitir la rehidratación durante 30 minutos antes de la homogeneización.
6. Colocar la bolsa en el homogeneizador Stomacher y hacer funcionar la máquina durante 1-2 minutos.
7. Transferir a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca.
8. Utilizar este homogeneizado diluido  $10^{-1}$  para preparar otras diluciones decimales como se describe a continuación. El tiempo transcurrido entre la preparación del homogeneizado diluido  $10^{-1}$  y la inoculación de los medios de cultivo no debe superar 45 minutos.

Método A:1b Preparación de diluciones decimales

Todas las diluciones preparadas a partir del homogeneizado diluido  $10^{-1}$  se deben preparar antes de que transcurran 15 minutos desde la preparación del homogeneizado. La naturaleza de la muestra analizada determinará el número de diluciones requeridas con el fin de obtener un recuento (RVT) por gramo.

15 Método

1. Usando la DMR, preparar para cada muestra una serie de blancos a una dilución de  $9 \pm 0,1$  mL en tubos de ensayo estériles.
2. Etiquetar las series con el número de muestra del laboratorio e identificar los tubos de dilución.
3. Mezclar la muestra de homogeneizado en un mezclador de vórtice y dejar que se sedimenten las partículas grandes antes de retirar una parte alícuota. Si hay una capa de grasa, tomar la parte alícuota de la capa acuosa.
- 20 4. El tiempo transcurrido entre la preparación de la muestra de homogeneizado y la inoculación de los medios de cultivo no superará 45 minutos.

Dilución a partir de un homogeneizado diluido 1/10

- 25 (i) Añadir 1 mL del homogeneizado diluido 1/10 a 9 mL de la primera dilución del blanco. Volver a tapar el tubo de ensayo.
- (ii) Mezclar con vórtice el contenido. Este tubo contiene la dilución  $10^{-2}$ .
- (iii) Usando una punta nueva cada vez, repetir el proceso para obtener más diluciones decimales.

Método A:2c Recuento de placas aeróbicas - Método de goteo superficial

30 Este método describe la enumeración de organismos mesófilos aerobios por una técnica de goteo superficial. El método describe la incubación a 30°C, pero se puede aplicar a otras temperaturas, por ejemplo, 22°C, 37°C. Se utiliza preferiblemente un método de enumeración superficial mejor que un método de vertido en placa para obtener la máxima recuperación de los organismos estrictamente aerobios y evitar la posibilidad de tensión térmica que pueda ser producida utilizando agar-agar fundido en los métodos de vertido en placa. El método de goteo en placa minimiza la fatiga del operador y por lo tanto las inexactitudes en la enumeración, reduce los problemas encontrados debido a la propagación de colonias producida por algunas cepas de *Bacillus* spp., y facilita la diferenciación entre las colonias y partículas de alimentos. Sin embargo, debido a los pequeños volúmenes de las diluciones de las muestras utilizadas, es más adecuado para el uso cuando se espera que los niveles de organismos superen 3.000 UFC por gramo.

Método

- 40 1. Preparar la muestra de homogeneizado y realizar más diluciones decimales como se ha descrito en los métodos A:1a y A:1b anteriores.
2. Etiquetar las placas en la parte inferior con el número de muestra del laboratorio. Dividir la placa en segmentos (como máximo cuatro por placa) y marcar cada segmento con la dilución con la que se utilizará. Usar placas de SMA.
- 45 3. Inocular los medios de las placas antes de que transcurran 45 minutos de la preparación de la muestra de homogeneizado. Usar un pipeteador de 20  $\mu$ L con punta estéril y la técnica de pipeteo inverso. Comenzar con la mayor dilución y aplicar dos gotas separadas sobre la superficie del segmento correspondiente de la placa. Repetir con la dilución inmediatamente inferior hasta que todas las diluciones se hayan aplicado a las placas.



## ES 2 530 858 T3

4. Si se espera que los recuentos sean bajos, se pueden aplicar 5 o 10 gotas de homogeneizado del alimento (dilución  $10^{-1}$ ) o muestra líquida a media placa o a su totalidad para disminuir el límite de detección.

5. Volver a colocar las tapas y dejar que se sequen las gotas a la temperatura ambiente.

5 6. Invertir las placas y colocarlas en una incubadora ajustada a 30°C durante 72 +/- 3 horas (o a 22°C durante 72 +/- 3 horas, 37°C durante 24 +/- 2 horas o 48°C +/- 2 horas según lo requiera el cliente).

7. Al final del período de incubación contar y marcar las colonias en todas las diluciones que presenten colonias contables. Registrar los recuentos. El número de colonias contables por cada gota será normalmente inferior a 20, pero para algunos organismos que forman pequeñas colonias es fácilmente posible contar más (por ejemplo, las bacterias del ácido láctico).

10 Cálculos y expresión de los resultados

Si sólo una dilución tiene colonias contables, el recuento por gramo viene dado por la fórmula:

$$N = \text{Número medio por gota} \times 1/d \times 50$$

en donde: N = recuento/g

d = dilución

15 Si están presentes dos o más colonias en dos diluciones sucesivas con colonias contables, utilizar la fórmula media ponderada siguiente para obtener el recuento por gramo. Incluir los recuentos de todas las gotas en las diluciones elegidas incluyendo las gotas sin colonias.

$$N = \frac{\sum c}{(v_1 + 0.1v_2)d}$$

en donde:  $\sum C$  = suma de las colonias en todas las gotas contadas

20  $v_1$  = volumen total de gotas contadas en la primera dilución

$v_2$  = volumen total de gotas contadas en la segunda dilución

d = dilución a la que se realizó el primer recuento

25 NOTA: Cuando existan pruebas de inhibición, contar sólo las colonias de la mayor dilución que proporcione 2 o más colonias por gota.

Presentación de los resultados

30 Registrar el recuento por gramo (g) o por mL de muestra con dos cifras significativas. Registrar también las condiciones de realización del ensayo, por ejemplo: 30°C/72 h. Redondear por encima si el tercer dígito del recuento es 5 o más, redondear por abajo si el tercer dígito es 4 o menos. Si el recuento es mayor que 100, registrar el recuento hasta la potencia de 10, con un número a cada lado de la coma decimal.

Si no está presente ninguna colonia incluso a la menor dilución de la muestra, registrar un valor inferior al límite de detección por gramo (g) o por mL.

Si las gotas a la mayor dilución contienen demasiadas colonias para contarlas, registrar el recuento como mayor que el número contable de colonias a la potencia apropiada de 10.

35 NOTA: Es útil indicar al cliente un intervalo dentro del cual se encuentra el recuento.

Límite de detección

Usando 2 gotas de  $10^{-1}$ :  $2,5 \times 10^2$ /g o mL

Usando 5 gotas de  $10^{-1}$ :  $1,0 \times 10^2$ /g o mL

Usando 10 gotas de  $10^{-1}$ : 50/g o mL

40 A:16a Metodología para la enumeración de *Streptococci* y *Enterococci* spp. 1

Preparado por Probiotics International, Matts Lane, Stoke sub Hamdon, Somerset, TA14 6QE

Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio Microcheck Technical Services Ltd, 10 Sandown Centre, White Horse Business Park, Trowbridge, Wiltshire BA14 OXD.

Referencias:

5 BS 4285: Microbiological examination for dairy purposes. Section 2.1 Enumeration of microorganisms by pour plate technique for colony count. BSI, 1989.

BS 5763: Microbiological examination of food and animal feeding stuffs. Part 5. Enumeration of microorganisms - Colony count at 30°C (surface plate technique). BSI. 1981.

BS 5763: Part 6: 1983. Microbiological examination of food and animal feeding stuffs. Preparation of dilutions.

10 BS EN ISO 6887-1: 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions. General rule for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organisation for Standardisation (ISO).

D. Roberts, W. Hooper and M. Greenwood. Practical Food Microbiology, page 101 method 5.6 Public Health Service. 1995.

15 ICMFS Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration. 2<sup>nd</sup> edition. University of Toronto Press, London. 1988.

ISO 8261: 2001. Milk and milk products – Preparation of samples and dilutions for microbiological examination. International Organisation for Standardisation (IS).

20 El documento WO 2006/041903 A2 describe un pienso para alimentar a animales acuáticos, tales como peces, con el fin de mejorar el color de la carne del animal. El pienso comprende bacterias que producen carotenoides, tales como *Rhodopseudomonas* o *Rhodospirillum*. En una realización, el pienso se obtiene mezclando la preparación de bacterias con polietilenglicol y aceite de hígado de bacalao utilizando un mezclador. Posteriormente, se recubren pelets de pienso comerciales para peces con esta mezcla en una cantidad de 1 kg de líquido por 10 kg de pelets de pienso. La adición del líquido se realiza añadiendo lentamente el líquido a los pelets de pienso, mientras se les hace girar en un mezclador de cemento. Los pelets recubiertos se almacenan en bolsas de plástico y se dejan durante la noche antes de su uso. El producto se reivindica para aumentar la tasa de crecimiento de los animales alimentados.

25 El documento WO 2006/041903 A2 no describe el uso de probióticos, tales como bacterias del ácido láctico o *Saccharomyces cerevisiae*. Por otra parte, el documento WO 2006/041903 A2 no describe el recubrimiento de pelets de pienso utilizando una técnica de vacío.

30 La patente GB 2.232.573 A describe una comida para mascotas en forma de pelets que comprende pelets sólidos de pienso comestibles y un líquido comestible. El líquido comestible se puede aplicar a los pelets sólidos bajo presión reducida, dando como resultado la absorción por los pelets del líquido comestible. La aplicación del líquido comestible mejora las características físicas y nutricionales. El líquido comestible puede ser aceite de pescado. La patente GB 2.232.573 A no describe la adición de ninguna sustancia probiótica al líquido comestible antes de su aplicación a los pelets sólidos.

35 La patente US 5.968.569 describe una croqueta para mascotas que comprende una matriz de almidón gelatinizado, un recubrimiento lipídico alrededor de la matriz de almidón gelatinizado y un recubrimiento aromatizante que incluye un hidrolizado de proteínas, en el que dicha matriz de almidón gelatinizado incluye microorganismos probióticos. Los microorganismos probióticos pueden ser *Saccharomyces cerevisiae*. No se describe el uso de aceite de pescado como vehículo para los microorganismos probióticos. No se describe que el recubrimiento de la matriz de almidón gelatinizado use recubrimiento a vacío.

40

Aunque la patente US 5.968.569 se refería a la vida útil de almacenamiento de comidas para mascotas y sugería un modo de proporcionarla, todavía existe la necesidad de mejorarla.

#### Breve resumen de la invención

45 Esta necesidad se satisface con la croqueta para mascotas de acuerdo con el primero y segundo aspectos de la presente invención y con el método para producir dicha croqueta para mascotas de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una croqueta para mascotas recubierta a vacío que comprende dentro de la estructura de la croqueta una mezcla de microorganismos probióticos viables y un aceite de pescado, en donde dichos microorganismos probióticos viables son bacterias del ácido láctico.

50 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una croqueta para mascotas recubierta a vacío que comprende dentro de la estructura de la croqueta una mezcla de microorganismos probióticos viables y un aceite de pescado, en donde dicho microorganismo probiótico viable es *Saccharomyces cerevisiae*.

La presente invención se refiere en un tercer aspecto a un método para producir una croqueta para mascotas de acuerdo con el primero o segundo aspecto, respectivamente, que comprende las etapas de

- mezclar los microorganismos probióticos con un aceite de pescado,
- recubrir el componente principal de la comida para mascotas convencional con la mezcla de los microorganismos probióticos y dicho aceite de pescado utilizando la técnica de recubrimiento a vacío.

El aceite se extenderá a vacío sobre las croquetas, dejando así las bacterias dentro de la estructura de las croquetas. De este modo las bacterias están protegidas y tienen un gran potencial de supervivencia y recuperación.

Esta comida para mascotas es útil para mejorar el estado del tracto digestivo y el desarrollo general del sistema inmunitario de las mascotas. Este efecto es generado por la inclusión de bacterias probióticas de marca Protexin, así como otros probióticos en la comida para mascotas, utilizando la tecnología de recubrimiento a vacío.

Generalmente, los probióticos son piensos complementarios que contienen bacterias potencialmente beneficiosas.

El término aceite de pescado como se usa en este documento incluye aceite de caballa, trucha, arenque, sardinas, salmón y atún blanco.

Se pretende que los cultivos de bacterias probióticas ayuden a la flora existente de forma natural en el cuerpo dentro del tracto digestivo para que vuelvan a establecerse, produciendo por tanto un efecto positivo en la salud general de los animales, ayudando a la recuperación de los problemas digestivos y construyendo y estimulando el sistema inmunitario por medio de la multiplicación y habitación de la microflora intestinal, mejorando así la eficacia de la ingesta de alimentos y la exclusión competitiva de bacterias hostiles. Actúan como bacterias que compiten por los sitios y sustratos de adherencia.

La microflora intestinal normal puede ser alterada de varios modos, por ejemplo, por enfermedades gastroentéricas, terapias con antibióticos, cambios de dieta, deficiencias dietéticas, viajes, vejez, estrés, etc.

El sistema inmunitario del hospedante es mejorado por los probióticos debido al aumento en la producción de citoquinas, la actividad fagocítica, la producción de anticuerpos y los niveles de gamma-interferón.

Los probióticos y las tasas de inclusión mínimas usados en esta invención serán los siguientes. Las cepas probióticas son clasificadas como aditivos alimentarios por el Reglamento de la Comunidad Europea (CE) N° 183/2003.

Comida para perros

Cepa probiótica registrada para su uso en perros:

*Enterococcus faecium* NCIMB 10415 CE No. 13

Fecha de la primera entrada en el registro: 7/11/05

UFC min/kg de pienso completo:  $1,0 \times 10^9$

UFC min/kg de pienso completo:  $1,0 \times 10^{10}$

Comida para conejos

Cepa probiótica registrada para su uso en conejos:

*Saccharomyces cerevisiae* NCYC SC47 CE E1702

Fecha de la primera entrada en el registro: 7/11/05

UFC min/kg de pienso completo:  $2,5 \times 10^9$

UFC min/kg de pienso completo:  $7,5 \times 10^{10}$

Se utilizarán probióticos actualmente y en el futuro comercialmente disponibles, particularmente Protexin (Probiotics International). Los probióticos de cepas no registrados son una categoría de alimentos funcionales, definida como: ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al hospedante estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una bacteria o un número limitado de ellas en el colon y por tanto mejorando la salud del hospedante (Gibson and Roberfroid, 1995).

Esta invención incluye también la tecnología particular que se usa para incluir las bacterias en cada una y todas las croquetas del producto. La tecnología de multirrecubrimiento a vacío que está disponible en las instalaciones de fabricación de United Petfood Ltd (Bélgica) es el método para incluir aceites, polvos, olores y cualesquiera otros ingredientes beneficiosos que sean necesarios para el producto final suficiente.

- 5 Puesto que las bacterias han de estar protegidas de la humedad, el calor y la luz solar, el método de producción incluirá bacterias liofilizadas que han sido mezcladas con el aceite a una concentración requerida. Agitando constantemente el aceite se mantendrá líquido para el dispositivo de recubrimiento a vacío. Esto se consigue calentando el aceite hasta una temperatura que sea tolerada por las bacterias. El aceite se extenderá a vacío sobre la croqueta manteniendo las bacterias dentro de la estructura de la croqueta. De este modo las bacterias están protegidas y tienen un gran potencial de supervivencia y recuperación.

10 La comida para mascotas de esta invención sólo puede estar en forma seca puesto que es un factor esencial para mantener la estabilidad de las bacterias. Sin embargo, esta comida para mascotas puede basarse en cualesquiera comidas para mascotas convencionales y sus ingredientes, con la condición de que las bacterias probióticas incluidas sean estables.

- 15 Estos ingredientes pueden incluir:

- Proteínas en bruto
- Grasas en bruto
- Extracto exento de nitrógeno (EEN) - carbohidrato
- Fibras en bruto

- 20 - Cenizas y minerales

- Vitaminas

- Todos los demás ingredientes beneficiosos que se utilizan en comidas para mascotas comercialmente disponibles.

- 25 Los componentes usuales que proporcionan estos ingredientes son carne de aves de corral, carne de animales, pescado, aceites beneficiosos, arroz, cereales, grasas animales, sal marina, huevo entero, maíz y todos los demás ingredientes no perjudiciales que son beneficiosos y se utiliza convencionalmente en comidas para mascotas.

En conclusión, la invención es una combinación de los ingredientes especiales incluidos (Protexin de Probiotics) y de la tecnología utilizada (recubrimiento a vacío) que se ha descrito anteriormente.

#### **Descripción detallada de la invención**

- 30 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una croqueta recubierta a vacío para mascotas que comprende dentro de la estructura de la croqueta una mezcla de microorganismos probióticos viables y un aceite de pescado, en donde dichos microorganismos probióticos viables son bacterias del ácido láctico.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una croqueta recubierta a vacío para mascotas que comprende dentro de la estructura de la croqueta una mezcla de microorganismos probióticos viables y un aceite de pescado, en donde dicho microorganismo probiótico viable es *Saccharomyces cerevisiae*.

- 35 En una realización del primer aspecto y del segundo aspecto de la presente invención, los microorganismos viables incluidos en la mezcla son microorganismos probióticos liofilizados.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, los microorganismos probióticos son *Enterococcus faecium*.

- 40 En una realización de la realización anterior, la cantidad mínima de *Enterococcus faecium* en la comida completa es desde  $1,0 \times 10^7$  UFC/kg hasta  $1,0 \times 10^{14}$  UFC/kg.

En una realización de la realización anterior, la cantidad mínima de *Enterococcus faecium* en la comida completa es desde  $1,0 \times 10^9$  UFC/kg hasta  $1,0 \times 10^{11}$  UFC/kg.

En una realización del segundo aspecto de la presente invención, la cantidad mínima de *Saccharomyces cerevisiae* en la comida completa es desde  $2,5 \times 10^7$  UFC/kg hasta  $7,5 \times 10^{14}$  UFC/kg.

- 45 En una realización de la realización anterior, la cantidad mínima de *Saccharomyces cerevisiae* en la comida completa es preferiblemente desde  $2,5 \times 10^9$  UFC/kg hasta  $7,5 \times 10^{11}$  UFC/kg.

En una realización del primer aspecto y del segundo aspecto de la presente invención, el aceite de pescado se selecciona de los aceites siguientes: aceite de caballa, trucha, arenque, sardinas, salmón o atún blanco.

En una realización de la realización anterior, el aceite de pescado es aceite de salmón.

En una realización del primer aspecto y del segundo aspecto de la presente invención, dicha croqueta para mascotas es una croqueta para mascotas para perros, una croqueta para mascotas para gatos, una croqueta para mascotas para conejos u otros roedores o una croqueta para mascotas para caballos de compañía.

- 5 La presente invención se refiere en un tercer aspecto a un método para producir una croqueta para mascotas de acuerdo con el primer aspecto o el segundo aspecto, que comprende las etapas de:

- mezclar los microorganismos probióticos con un aceite de pescado,
- recubrir el componente principal de la comida para mascotas convencional con la mezcla de los microorganismos probióticos y dicho aceite de pescado, utilizando un recubrimiento a vacío.

- 10 En una realización del tercer aspecto de la presente invención, el aceite de pescado se calienta hasta 20-25°C antes del mezclamiento.

En una realización de la realización anterior, el aceite de pescado se calienta hasta 22°C antes del mezclamiento.

En una realización del tercer aspecto de la presente invención, el recubrimiento se realiza en un ambiente cerrado bajo la presión de 100 kPa o menor (1 bar o menor).

- 15 En una realización del tercer aspecto de la presente invención, dicho aceite de pescado se selecciona de los aceites siguientes: aceite de caballa, trucha, arenque, sardinas, salmón o atún blanco.

El término mascota como se usa en este documento incluye perros, gatos, conejos, otros roedores y caballos de compañía, incluyendo todas las edades y razas de estos animales.

- 20 Protexin - Marca del producto probiótico utilizado en esta invención debido a sus métodos de fabricación específicos. Marca comercial propiedad y producto disponible de Probiotics International Ltd.

El Protexin es un probiótico muy concentrado, que contiene millones de microorganismos beneficiosos, que existen de forma natural en el intestino de aves y animales sanos. Estos microorganismos colonizan el intestino inmaduro o se restablecen el intestino deteriorado, promoviendo así el mecanismo de exclusión competitiva contra las potenciales bacterias patógenas.

- 25 Los probióticos y las tasas de inclusión mínimas usados en esta invención serán los siguientes.

Las cepas probióticas son clasificadas como aditivos alimentarios por el Reglamento de la CE N° 183/2003.

Comida para perros

Cepa probiótica registrada para su uso en perros:

*Enterococcus faecium* NCIMB 10415 CE No. 13

- 30 Fecha de la primera entrada en el registro: 7/11/05

UFC min/kg de pienso completo:  $1,0 \times 10^9$

UFC min/kg de pienso completo:  $1,0 \times 10^{10}$

Comida para conejos

Cepa probiótica registrada para su uso en conejos:

- 35 *Saccharomyces cerevisiae* NCYC SC47 CE E1702

Fecha de la primera entrada en el registro: 7/11/05

UFC min/kg de pienso completo:  $2,5 \times 10^9$

UFC min/kg de pienso completo:  $7,5 \times 10^{10}$

- 40 Los probióticos son una categoría de alimentos funcionales, definida como: ingredientes alimenticios no digeribles, que afectan beneficiosamente al hospedante, estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una bacteria o un número limitado de ellas en el colon y por tanto mejorando la salud del hospedante (Gibson and Roberfroid, 1995).

La comida para mascotas de esta invención sólo puede estar en forma seca puesto que es un factor esencial para mantener la estabilidad de las bacterias. Sin embargo, esta comida para mascotas puede basarse en cualesquiera

alimentos para mascotas convencionales y sus ingredientes, con la condición de que las bacterias probióticas incluidas sean estables.

5 La tecnología de multirrecubrimiento a vacío que está disponible en las instalaciones de fabricación de United Petfood Ltd es el método para incluir aceites, polvos, olores y cualesquiera otros ingredientes que sean necesarios para el producto final suficiente.

10 Puesto que las bacterias han de estar protegidas de la humedad, el calor y la luz solar, el proceso de producción se realiza en un ambiente cerrado desde el principio hasta el final. El método de producción incluirá bacterias liofilizadas que han sido mezcladas con el aceite de pescado a una concentración requerida. Agitando constantemente el aceite se mantendrá líquido para el dispositivo de recubrimiento a vacío. Esto se consigue calentando el aceite hasta una temperatura de 20°C a 25°C, siendo la temperatura óptima 22°C, que sea todavía tolerada por las bacterias. El aceite se extenderá a vacío sobre la croqueta manteniendo las bacterias dentro de la estructura de la croqueta. De este modo, las bacterias están protegidas y tienen un gran potencial de supervivencia y recuperación.

15 El microorganismo probiótico, *Enterococcus faecium*, contenido en esta invención se obtuvo de la colección de cultivos NCIMB (National Collections of Industrial and Marine Bacteria) reconocida internacionalmente. La cepa se cultivó en una cámara de fermentación con una capacidad de 5000 L. A continuación se protegió utilizando crioprotectores y se liofilizó formando un polvo antes de ser mezclada con la comida para mascotas y otros componentes del concentrado de Protexin en concentraciones exactas.

20 El microorganismo contenido en esta invención es una bacteria del ácido láctico (BAL). Por definición, estas bacterias producen ácido láctico que es ácido. Esto asegura el crecimiento de las bacterias en un medio ácido óptimo. Creando este ambiente ácido las BAL son capaces de evitar el crecimiento de bacterias coliformes, tal como *E. coli*, ya que estas prefieren para su crecimiento un pH más alcalino.

25 Es importante la protección de los microorganismos contra las condiciones ambientales adversas, tanto durante como después de la producción de bacterias. Se aplican crioprotectores antes de la liofilización. Esto proporciona una protección adicional contra la humedad, el oxígeno y el calor y aumenta sustancialmente la vida útil del producto final. Así, cuando se utiliza tecnología de recubrimiento a vacío es posible mantener dicha estabilidad en el producto final.

### Breve descripción del dibujo

30 A continuación se describe la comida para mascotas correspondiente a la invención con referencia al dibujo, en donde:

La Fig. 1 describe la estabilidad del producto.

#### Ensayo de longevidad

La estabilidad del producto debe ser analizada por el Recuento Viable Total (RVT) para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de producto bajo las siguientes condiciones:

- 35
- Refrigeración (6-8°C)
  - Temperatura ambiente (21 +/- 3°C)
  - Temperatura acelerada (37 +/- 1°C)

La humedad relativa también debe ser registrada. Por ejemplo, la humedad relativa del laboratorio del Reino Unido es la siguiente:

- 40
- Refrigeración con 39% de humedad relativa
  - Temperatura ambiente con 52% de humedad relativa
  - Temperatura acelerada con 54% de humedad relativa

#### Detalles de la muestra:

45 Para cada ensayo mensual se debe disponer de 40 gramos de producto sellado en el tipo final de envasado del producto (es decir, bolsa de papel de aluminio) como sigue.

Refrigeración	Mes 0, Meses 1-24 inclusivos
Temperatura ambiente	Mes 0, Meses 1-24 inclusivos
Temperatura acelerada	Mes 0, Meses 1-12 inclusivos

Bajo la temperatura acelerada, los resultados de un mes de estabilidad acelerada equivalen a los de 4 meses de estabilidad en tiempo real.

- 5 Cada mes se debe realizar 4 veces el recuento viable total (y hacer la media) utilizando la metodología adjunta o similar. (Lo importante es utilizar el ácido mirístico como diluyente, puesto que este diluyente garantiza que los microorganismos contenidos en el componente oleoso del pelet se “disuelvan” suficientemente en la muestra del producto final).

Detalles adicionales – Deben registrarse todos los detalles del ensayo incluyendo:

- El envase del producto
- 10 - Las condiciones de almacenamiento: refrigeración (6-8°C)
- La temperatura ambiente 21°C +/- 1°C
- Los ensayos acelerados 37 +/- 1°C
- Los meses: refrigeración - 24 meses
- temperatura ambiente - 24 meses
- 15                   ensayos acelerados - 12 meses
- Todos los requisitos de la especificación (incluyendo el análisis microbiológico, el aspecto y las propiedades físicas)

### Ejemplo 1 Descripción del Procedimiento

- 20 El procedimiento es el recubrimiento a vacío del núcleo con un líquido, que se utiliza para mantener las bacterias dentro de la estructura de croqueta/porosa.

El proceso de fabricación se realiza en un ambiente cerrado.

- 25 En primer lugar el producto no recubierto se retira de una secadora (sistema de secado vertical con 2 niveles) a una temperatura de 45°C a 60°C (dependiendo de los datos recibidos del extrusor). A continuación, el producto no recubierto se introduce en el tambor del dispositivo de recubrimiento a vacío de núcleos. Se cierra el dispositivo de recubrimiento y se comienza a agitar (presión interna 100 kPa (1 bar)) el producto creando así una atmósfera de vacío. Durante el procedimiento de recubrimiento a vacío con un líquido, las grasas se evaporan del producto bajo condiciones de vacío (50 kPa (0,5 bar)). La temperatura del líquido durante el procedimiento es de 20°C a 25°C, siendo la temperatura óptima 22°C, y la conservación en el recipiente es a 22°C. Se restablece la condición de presión normal, es decir, 100 kPa (1 bar) en el interior del dispositivo de recubrimiento. El producto se pulveriza con el aceite de pescado mezclado con el ingrediente producto probiótico (*Enterococcus faecium* u otros) bajo una nueva condición de vacío (70 kPa (0,7 bar)). Se restablece la condición de presión normal (100 kPa (1 bar)) en el interior del dispositivo de recubrimiento. El producto se pulveriza con el hidrolizado bajo la última condición de vacío (80 kPa (0,8 bar)). Se restablece la presión normal (100 kPa (1 bar)) en el interior del dispositivo de recubrimiento. Finalmente, se abre el dispositivo y se introduce el producto en un refrigerador.

- 35 La materia objeto de la presente invención no está limitada por el ejemplo dado anteriormente.

**REIVINDICACIONES**

1. Una croqueta recubierta a vacío para mascotas que comprende dentro de la estructura de la croqueta una mezcla de microorganismos probióticos viables y un aceite de pescado, en donde dichos microorganismos probióticos viables son bacterias del ácido láctico.
- 5 2. Una croqueta recubierta a vacío para mascotas que comprende dentro de la estructura de la croqueta una mezcla de microorganismos probióticos viables y un aceite de pescado, en donde dicho microorganismo probiótico viable es *Saccharomyces cerevisiae*.
3. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los microorganismos viables incluidos en la mezcla son microorganismos probióticos liofilizados.
- 10 4. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los microorganismos probióticos son *Enterococcus faecium*.
5. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la cantidad mínima de *Enterococcus faecium* en el alimento completo es desde  $1,0 \times 10^7$  UFC/kg hasta  $1,0 \times 10^{14}$  UFC/kg.
- 15 6. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la cantidad mínima de *Enterococcus faecium* en el alimento completo es desde  $1,0 \times 10^9$  UFC/kg hasta  $1,0 \times 10^{11}$  UFC/kg.
7. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la cantidad mínima de *Saccharomyces cerevisiae* en el alimento completo es desde  $2,5 \times 10^7$  UFC/kg hasta  $7,5 \times 10^{14}$  UFC/kg.
8. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la cantidad mínima de *Saccharomyces cerevisiae* en el alimento completo es desde  $2,5 \times 10^9$  UFC/kg hasta  $7,5 \times 10^{11}$  UFC/kg.
- 20 9. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el aceite de pescado se selecciona de los aceites siguientes: aceite de caballa, trucha, arenque, sardinas, salmón o atún blanco.
10. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el aceite de pescado es aceite de salmón.
- 25 11. La croqueta recubierta a vacío para mascotas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha croqueta para mascotas es una croqueta para perros, una croqueta para gatos, una croqueta para conejos u otros roedores o una croqueta para caballos de compañía.
12. Un método para producir una croqueta para mascotas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que contiene las etapas de:
  - mezclar los microorganismos probióticos con un aceite de pescado,
  - 30 - recubrir el componente principal de la comida para mascotas convencional con la mezcla de los microorganismos probióticos y dicho aceite de pescado, utilizando un recubrimiento a vacío.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el aceite de pescado se calienta de 20°C a 25°C antes del mezclado, tal como a 22°C antes del mezclado.
- 35 14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el recubrimiento se realiza en un ambiente cerrado bajo la presión de 100 kPa o menor (1 bar o menor).
15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho aceite de pescado se selecciona de los aceites siguientes: aceite de caballa, trucha, arenque, sardinas, salmón o atún blanco.

40



FIG 1

Estabilidad de la comida para perros

