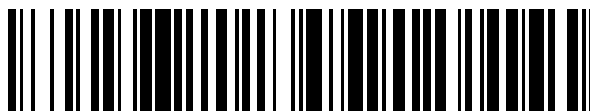


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 831**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2004** **E 04761376 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015** **EP 1667696**

54 Título: **Almacenamiento y liberación de probióticos**

30 Prioridad:

01.10.2003 AU 2003905338

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2016

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (100.0%)
LIMESTONE AVENUE
CAMPBELL, ACT 2601, AU**

72 Inventor/es:

**CRITTENDEN, ROSS;
SANGUANSRI, LUZ y
AUGUSTIN, MARY ANN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 561 831 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

Almacenamiento y liberación de probióticos

- 5 La presente invención se refiere al almacenamiento y liberación de materiales probióticos en lugares seleccionados del sistema gastrointestinal.

Antecedentes de la invención

- 10 Los probióticos son ingredientes alimentarios microbianos que tienen un efecto beneficioso, documentado científicamente, para la salud humana. Los probióticos también se usan en piensos para animales, para mejorar su salud o su productividad. Se usan en alimentos para mascotas, principalmente para disminuir los olores desagradables y mejorar la consistencia del material fecal.

- 15 La mayoría de las cepas globales dominantes de bacterias probióticas comerciales pertenecen a las bifidobacterias y a los lactobacilos. No obstante, en algunas partes del mundo se usan bacterias de otros géneros. Por ejemplo, en China se usa una serie de otros géneros, incluidos *Bacillus* y *Clostridium*. *Enterococcus faecium* también se ha usado en todo el mundo, aunque este género está implicado en la transferencia de la resistencia a antibióticos. En el mundo occidental, tanto las bifidobacterias como los lactobacilos tienen un fuerte registro como géneros seguros y
20 aceptables para usar como probióticos. Otros ejemplos se tratan en:

- 25 Mogensen, G., Salminen, S., O'Brien, J., Ouwehand, A., Holzapfel, W., Shortt, C., Fonden, R., Miller, GD., Donohue, D., Playne, M., Crittenden, R., Bianchi-Salvadori, B. y R. Zink (2002). Food microorganisms – health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods Internat, Dairy Federation Bulletin No: 377: 4–9 y Mogensen, G., Salminen, S., O'Brien, J., Ouwehand, A., Holzapfel, W., Shortt, C., Fonden, R., Miller, GD., Donohue, D., Playne, M., Crittenden, R., Bianchi-Salvadori, B. y R. Zink (2002) Inventory of microorganisms with a documented history of use in food Internat, Dairy Federation Bulletin No: 377: 10–19.

- 30 Los investigadores y médicos científicos han reconocido ampliamente que la mayoría de los efectos para la salud son conferidos por una cepa específica, y principalmente no por la especie en general. Aunque muchos grupos de investigación han seleccionado cepas por sus útiles propiedades probióticas para la fabricación, para la incorporación en alimentos, para la supervivencia en el intestino y por las propiedades para la salud, existe mucha información acerca de su funcionamiento en seres humanos, publicada en revistas revisadas por expertos.

- 35 Cada vez hay más pruebas de que un alimento probiótico debe contener cepas seleccionadas tanto de lactobacilos como de bifidobacterias. El concepto es que los lactobacilos probióticos son útiles en los jóvenes (en los que la microflora intestinal de los lactantes ya es rica de forma natural en bifidobacterias) y que la adición de bifidobacterias probióticas se hace más importante en los ancianos. El número de bifidobacterias indígenas disminuye con el envejecimiento si no se usan probióticos. Las bifidobacterias confieren alguna protección contra patógenos que no
40 proporciona con eficacia los lactobacilos solos. Un número viable adecuado de la cepa de bacterias probióticas en el segmento adecuado del intestino es esencial si van a ser eficaces en un sentido relacionado con la salud. La mayoría de las autoridades consideran 10 millones de bacterias por gramo de alimento una dosis adecuada en la dieta. Técnicamente, esto se puede conseguir con bastante facilidad. No obstante, no se han producido curvas de respuesta a la dosis para ninguna cepa probiótica contra ningún estado de salud.

- 45 Durante la fabricación, liofilización y almacenamiento se producen pérdidas de bacterias. No obstante, se producen más pérdidas durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal. Los cultivos de probióticos encontrarán jugos gástricos en el estómago que varían de pH 1,2 (con un estómago vacío) a pH 5,0. Los cultivos estarán presentes en el estómago de aproximadamente 40 minutos hasta 5 horas. También se encontrarán en el estómago y el intestino delgado sales biliares, enzimas lipolíticas, hidrolíticas y proteolíticas que también pueden matar bacterias. Hasta que las bacterias probióticas alcanzan regiones de pH más alto del gastrointestinal no pueden crecer ni sobrevivir. Dichas regiones son el íleon y el intestino. Durante este tránsito, las bacterias también tienen que competir con bacterias residentes por el espacio y por los nutrientes. También tienen que evitar su eliminación del tracto por la acción peristáltica normal y tienen que evitar que las maten los antimicrobianos producidos por otros organismos. Las
50 bacterias tienen sus condiciones más favorables en el primer tercio del intestino grueso (el intestino proximal).

- La capacidad para adherirse a superficies, tales como la capa mucosa intestinal, y las paredes de las células epiteliales del intestino son características importantes para un probiótico. Se usa el término "colonización" y significa que las bacterias tienen mecanismos que las permiten sobrevivir en una región del gastrointestinal de forma
60 continua. Generalmente se cree que la microflora del gastrointestinal es relativamente estable en adultos y no se ve alterada fácilmente por cambios en las condiciones del ecosistema intestinal. Las excepciones de esto son la administración de antibióticos, pero incluso entonces, la flora intestinal suele restablecerse después de algún tiempo con una composición similar de especies. Los mecanismos de acción de las bacterias probióticas incluyen:

- 65
- exclusión competitiva (ocupación de nichos en la superficie de la mucosa intestinal para prevenir la colonización por especies infecciosas)

- producción de condiciones ácidas (fermentación de ácido láctico por las bacterias, lo que conduce a un pH intestinal disminuido)
- efectos sobre la respuesta mediada por el sistema inmunológico
- reducción de las reacciones intestinales de putrefacción y genotóxicas (que producen niveles de precarcinógeno)
- liberación de antimicrobianos, tales como bacteriocinas. Muchas enfermedades diarreicas se originan por la alteración de la función en el intestino delgado, aunque las bacterias probióticas normalmente no se encuentran en un número elevado en dicha región, con la excepción de algunos lactobacilos. Hay pocas pruebas directas disponibles en seres humanos sanos sobre la composición microbiana de la región del intestino delgado. No obstante, la eficacia de las bacterias probióticas en la reducción de la enfermedad diarreica está bastante bien establecida. Funcionan en el tránsito a través del intestino delgado o actúan a través de un efecto inmunitario. La mayoría de las reacciones inmunitarias se producirán en las paredes de la mucosa del intestino delgado y no en el intestino grueso, por lo que, si se cree que el mecanismo de acción es la modulación inmunitaria, el probiótico debe estar presente en el intestino delgado. La otra región de alteración diarreica es el intestino grueso. Las bacterias probióticas pueden establecerse en dicha región con bastante facilidad.

Además de los trastornos diarreicos, las bacterias probióticas son eficaces en la disminución de la intolerancia a la lactosa, siempre que se elijan bacterias que tienen una importante función de la enzima beta galactosidasa. Los efectos de la intolerancia a la lactosa se manifiestan en el intestino. Existe un gran número de otras reclamaciones emergentes para la salud sobre los probióticos. Estos se centran en particular alrededor del intestino, por ejemplo cáncer intestinal, síndrome del intestino irritable y enfermedades intestinales inflamatorias (como la enfermedad de Crohn). De acuerdo con lo anterior, se prefiere la liberación de lactobacilos probióticos en la última mitad del intestino delgado. La liberación de bifidobacterias normalmente se pretende que se produzca en el intestino grueso. Tienden a producirse respuestas inmunitarias mayores con las bifidobacterias que con lactobacilos, existe un argumento de que las bifidobacterias en las regiones del intestino delgado son de gran importancia.

El consume diario del probiótico es necesario si el sitio diana está en el intestino delgado, ya que es poco probable que las bacterias se puedan adherir a la pared del intestino en un número suficiente (a excepción de, quizá, algunos lactobacilos). No obstante, el consumo diario puede no ser necesario si el lugar diana es el intestino grueso, ya que se puede producir crecimiento de las bacterias y colonización.

Las bacterias probióticas con buenas características de eficacia contra enfermedades y otras afecciones pueden no tener buenas características de supervivencia (por ejemplo, resistencia a pH bajo, sales biliares, enzimas proteolíticas e hidrolíticas, resistencia a antibióticos, adherencia a las paredes celulares). La protección de las bacterias durante el tránsito al sitio diana suele ser necesaria.

La protección se puede conseguir de varias formas: encapsulación de un compuesto farmacéutico de liberación lenta; encapsulación en una goma o en alginato; encapsulación en un almidón resistente o en inulina en combinación con una goma; protección mediante incorporación en un alimento que contiene almidón resistente; o en un alimento lácteo en el que las proteínas y las grasas pueden conferir alguna protección.

La patente de Estados Unidos 5422121 divulga un recubrimiento que incorpora un polímero formador de película que tiene grupos hidrófilos y un polisacárido que se puede descomponer en el colon, que es útil en la liberación de dosis en el colon.

La patente de Estados Unidos 5840860 divulga la liberación en el colon de ácidos grasos de cadena corta mediante su unión covalente a un vehículo de hidrato de carbono.

La patente de Estados Unidos 6060050 divulga una combinación de una bacteria probiótica, tal como bifidobacteria rica en almidón amilosa como vehículo que también actúa como medio de crecimiento o de mantenimiento en el intestino grueso o en otras regiones del tracto gastrointestinal.

La solicitud de patente de Estados Unidos 20030096002 divulga una matriz para usar en la liberación controlada de microorganismos. La matriz está formada por una cera hidrófoba y un agente modificador de la liberación seleccionado de polisacáridos, almidón, un derivado de alga o un polímero.

La patente de Estados Unidos 6413494 divulga un vehículo de liberación del fármaco en el colon que consiste en un polisacárido, tal como pectina.

Algunos probióticos necesitan protección durante el procesamiento, así como durante la liberación en el tracto gastrointestinal. Pueden ser sensibles al agua o al oxígeno y necesitan protección para mantener la viabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y transporte. La patente europea 1213347 divulga un método de secado y conservación de levaduras y microorganismos mezclándolos con un material de matriz que absorbe agua.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un medio de encapsular probióticos para protegerlos del deterioro durante el procesamiento y el almacenamiento, y permitir su liberación en lugares específicos del tracto gastrointestinal.

5 Breve descripción de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona un método de encapsular probióticos en los que uno o más microorganismos probióticos están encapsulados en una mezcla de proteínas e hidratos de carbono mediante dispersión.

- a) en una suspensión acuosa de una proteína y un hidrato de carbono,
- b) en una emulsión de aceite en agua de una proteína formadora de película y un hidrato de carbono y una grasa, o
- c) en un aceite que después se dispersa en una proteína formadora de película y un hidrato de carbono.

La presente invención también proporciona un microorganismo probiótico encapsulado obtenible mediante el método descrito anteriormente, que se puede liofilizar para formar un polvo.

La suspensión, dispersión o emulsión se puede secar para formar un polvo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polvo probiótico obtenible mediante el método descrito anteriormente que consiste en una bacteria probiótica seleccionada de bifidobacterias, lactobacilos, Saccharomyces, lactococos, estreptococos y propionibacterias encapsuladas en una mezcla formadora de película de caseína o proteína de suero de leche y un oligosacárido.

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entiende que el término probiótico incluye microorganismos tales como bacterias u hongos individualmente o en combinación que exhiben un efecto beneficioso sobre la salud humana si se liberan, preferentemente vivos, en la región diana del intestino. Los ejemplos incluyen bifidobacterias, lactobacilos, Saccharomyces, lactococos, estreptococos, propionibacterias y cualquier otro microorganismo que se puede demostrar que tienen efectos beneficiosos sobre el huésped.

Los probióticos pueden mezclarse con un material prebiótico o ser parte de un simbiótico o material simbiótico.

A lo largo de esta memoria descriptiva, el término prebiótico significa una sustancia tal como una proteína, péptido o hidratos de carbono, que proporcionan nutrientes para el probiótico o ayudan al probiótico. Por ejemplo, la lactoferrina puede potenciar el crecimiento de bacterias deseables. Normalmente, los prebióticos no se pueden digerir en el tracto intestinal superior. Los hidratos de carbono prebióticos incluyen almidón resistente, almidón de patata o almidón rico en amilosa tal como Starplus, almidones modificados (incluidos almidones carboxilados, almidones acetilados, propionados y butirados), oligosacáridos no digeribles tales como fructo-, gluco-, xilo-, soja-, galacto-, leche-, inulina-, arabinosilanos, arabinogalactanos, galactomananos o productos de la digestión de estos, pero sin excluir otros oligosacáridos capaces de ejercer efectos prebióticos.

A lo largo de esta memoria descriptiva, el término simbiótico o sinbiótico significa una combinación de un probiótico y un prebiótico que juntos tienen un efecto beneficioso sinérgico sobre la salud humana.

Las bacterias probióticas se pueden introducir en el medio de encapsulación como un concentrado líquido o en forma liofilizada. Las bacterias probióticas se pueden dispersar en aceite y después emulsionar con la suspensión acuosa y, después, secar para producir un aceite encapsulado portador del probiótico. Este también se puede secar para producir un polvo. Se puede usar cualquier tecnología de secado adecuada, tal como secado por pulverización, secado por congelación o secado con ventanas refractivas. Se pueden preferir los probióticos suspendidos en aceite, en los que el probiótico es sensible a la humedad. El aceite es, preferentemente, un aceite comestible y la emulsión o el polvo obtenidos mediante secado de la emulsión se pueden usar como un ingrediente alimentario, así como en suplementos de piensos.

La suspensión acuosa del hidrato de carbono y la proteína formadora de película o una emulsión de una mezcla de proteína formadora de película, hidrato de carbono y aceite se puede calentar antes de la etapa de encapsulación para hacer reaccionar los componentes sacárido y proteico. Si el sacárido tiene grupos de azúcar reductores, la etapa de calentamiento producirá productos de la reacción de Maillard. Se prefieren las suspensiones acuosas calentadas cuando el probiótico es sensible al oxígeno.

Los encapsuladores de la presente invención forman películas o matrices sólidas y estables que incluyen el probiótico o forman películas alrededor del probiótico o las gotas de aceite.

Cualquier proteína útil en la encapsulación de aceites se puede usar como el componente proteico de la presente invención. Un hidrato de carbono se combina con la proteína. En una suspensión acuosa, la proteína no tiene que ser una proteína formadora de película, ya que forma una matriz de encapsulación alrededor del probiótico. No

obstante, con los sistemas basados en aceite se requiere una proteína formadora de película.

Preferentemente, la proteína es soluble y, preferentemente, es estable en el intervalo de calentamiento de la reacción de Maillard e incluye caseína, soja y proteínas del suero de la leche, gelatina, albúmina de huevo y proteínas hidrolizadas con más grupos de aminoácido, incluyendo hidrolizado de proteína de soja. Se deben tomar precauciones en la reacción de la proteína y el hidrato de carbono para garantizar que las condiciones no den lugar a la gelificación o a la coagulación de la proteína, ya que esto daría lugar a una proteína incapaz de formar una película eficaz. La proteína preferida es una proteína de la leche, especialmente caseína o aislado de proteínas del suero de leche. La caseína es una proteína preferida en muchas aplicaciones por su bajo coste y su mayor resistencia a la gelificación durante cualquier tratamiento con calor, por ejemplo: para formar productos de la reacción de Maillard. Para aplicaciones en alimentos para lactantes, las proteínas del suero de la leche son la fuente de proteínas preferida. La cantidad de producto de la reacción de Maillard en la mezcla proteínas-hidratos de carbono es una cantidad suficiente para proporcionar actividad secuestrante de oxígeno durante el periodo de la vida de almacenamiento del producto. La reacción mínima requerida entre la proteína y el hidrato de carbono antes de la encapsulación dependerá de la tolerancia al oxígeno de la cepa probiótica específica que se encapsula. La extensión del producto de la reacción de Maillard se puede controlar, para una combinación proteína/hidrato de carbono concreta, mediante el grado de cambio de color que se produce. Una medida alternativa es analizar el azúcar sin reaccionar.

No es esencial que el hidrato de carbono y la proteína sufran una reacción de Maillard para que sean un encapsulador eficaz para las bacterias probióticas. Al mezclar la proteína y el almidón se ha encontrado que la microfluidificación de los materiales, en particular el hidrato de carbono, potencia la eficacia de la formulación.

Un hidrato de carbono preferido es un azúcar con un grupo reductor seleccionado preferentemente del grupo que consiste en monosacáridos (por ejemplo, glucosa, fructosa), disacáridos (por ejemplo: maltosa, lactosa), trisacáridos, oligosacáridos y jarabes de glucosa. Se puede usar cualquier fuente de azúcar reductor, incluida la miel. También se pueden usar hidratos de carbono que no sufren una reacción de Maillard con la proteína.

Está dentro del ámbito de la presente invención usar un oligosacárido o un almidón, incluyendo un almidón resistente para mejorar la liberación y el crecimiento del probiótico en el intestino y el colon. Algunos de estos materiales normalmente no se difieren en el tracto intestinal superior y pueden ayudar al crecimiento del probiótico.

Descripción detallada de la invención

Se describirán realizaciones preferidas de la invención.

En las figuras

La figura 1 ilustra gráficamente la supervivencia de *Bifidobacterium infantis* durante el secado por pulverización;
La figura 2 ilustra gráficamente la supervivencia de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 durante el secado por pulverización;
La figura 3 ilustra gráficamente la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* La-5 durante el secado por pulverización;
La figura 4 ilustra gráficamente la supervivencia de *Bifidobacterium infantis* durante el tránsito gastrointestinal simulado;
La figura 5 ilustra gráficamente la supervivencia de *Bifidobacterium infantis* tras el almacenamiento durante 2 semanas a 25 °C y con una humedad relativa al 50 %;
La figura 6 ilustra gráficamente la supervivencia de *Bifidobacterium infantis* durante el almacenamiento durante 5 semanas a 25 °C y con una humedad relativa al 50 %;
La figura 7 ilustra gráficamente la supervivencia de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 durante el almacenamiento durante 5 semanas a 25 °C y con una humedad relativa al 50 %;
La figura 8 ilustra gráficamente la supervivencia de *Bifidobacterium infantis* tras incubar a pH 4,0 durante 2 horas.

Materiales

Las bacterias probióticas usadas en los ejemplos son bifidobacterias y lactobacilos, aunque mediante el mismo proceso también se pueden encapsular otras cepas de bacterias probióticas y mezclas.

Se usaron un *Lactobacillus acidophilus* La-5 probiótico (Chr. Hansen, Dinamarca) y dos cepas de bifidobacterias probióticas con resiliencias inherentemente diferentes frente a las condiciones ambientales con objeto de investigar las ventajas de las técnicas de microencapsulación. *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (Chr. Hansen, Dinamarca) es una cepa probiótica relativamente sólida con una resiliencia relativamente alta frente a las condiciones ambientales, incluyendo un pH bajo, y una aerotolerancia relativamente alta. *Bifidobacterium infantis* (Chr. Hansen, Dinamarca) es relativamente sensible a las condiciones ambientales en comparación con *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

La proteína usada en los ejemplos es principalmente caseína, aunque la proteína en las formulaciones puede sustituirse fácilmente por otras proteínas, tales como proteína del suero de leche, proteína de soja, proteínas hidrolizadas etc.

- 5 Los hidratos de carbono usados en los ejemplos incluyen glucosa, oligosacáridos, jarabe de glucosa desecada, almidones resistentes y almidones preprocesados. Otros hidratos de carbono se pueden usar en las formulaciones, tales como lactosa, polisacáridos, maltodextrinas, almidones nativos, almidones modificados etc.

Lípidos (aceites vegetales y animales, di y triglicéridos, aceites n3- y n6 etc.).

10

Estrategias de microencapsulación usadas

Estrategia 1: Bacterias probióticas en una suspensión acuosa de proteína reaccionada o sin reaccionar y un hidrato de carbono.

15

o Preparar una mezcla de una solución de proteínas-hidratos de carbono a 60 °C (en la que el hidrato de carbono incluye un almidón resistente, el almidón se puede usar como tal o se preprocesa mediante microfluidificación). Calentar la mezcla a 98 °C durante 30 minutos. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas o concentrar en la solución reaccionada usando un mezclador. Secar por pulverización a 120–160 °C T_i y a / 50–70 °C T_o . Temperatura del aire de entrada T_i temperatura del aire de entrada, temperatura del aire de salida T_o).

20

o Preparar una mezcla de una solución de proteínas-hidratos de carbono a 60 °C (en la que el hidrato de carbono incluye un almidón resistente, el almidón se puede usar como tal o se preprocesa mediante microfluidificación). Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas o concentrar en la solución usando un mezclador. Secar por pulverización a 120–160 °C T_i y / 50–70 °C T_o .

25

Estrategia 2: Bacterias probióticas en una emulsión de aceite en agua reaccionada o sin reaccionar de una proteína formadora de película y un hidrato de carbono y una grasa.

30

o Preparar una mezcla de una solución de proteínas-hidratos de carbono a 60 °C (en la que el hidrato de carbono incluye un almidón resistente, el almidón se puede usar como tal o se preprocesa mediante microfluidificación), añadir el aceite y homogeneizar la mezcla a 350 bares. Calentar la mezcla homogeneizada a 98 °C durante 30 minutos. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en la mezcla reaccionada usando un mezclador. Secar por pulverización a 120–160 °C T_i y / 50–70 °C T_o .

35

o Preparar una mezcla de una solución de proteínas-hidratos de carbono a 60 °C (en la que el hidrato de carbono incluye un almidón resistente, el almidón se puede usar como tal o se preprocesa mediante microfluidificación), añadir el aceite y homogeneizar la mezcla a 250 bares. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en la mezcla usando un mezclador. Secar por pulverización a 120–160 °C T_i y / 50–70 °C T_o .

40

Estrategia 3: Bacterias probióticas en un aceite que después se dispersa en una proteína formadora de película y un hidrato de carbono.

45

o Preparar una mezcla de una solución de proteínas-hidratos de carbono a 60 °C (en la que el hidrato de carbono incluye un almidón resistente, el almidón se puede usar como tal o se preprocesa mediante microfluidificación). Calentar la mezcla a 98 °C durante 30 minutos. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en aceite. Añadir la dispersión de bacterias liofilizadas en la solución reaccionada usando un mezclador. Secar por pulverización a 120–160 °C T_i y / 50–70 °C T_o .

50

o Preparar una mezcla de una solución de proteínas-hidratos de carbono a 60 °C (en la que el hidrato de carbono incluye un almidón resistente, el almidón se puede usar como tal o se preprocesa mediante microfluidificación). Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en aceite. Añadir la dispersión de bacterias liofilizadas en la solución usando un mezclador. Secar por pulverización a 120–160 °C T_i y / 50–70 °C T_o .

Ejemplos de procesamiento y formulación

55

Estrategia 1

Ejemplo 1 (Encapsulados: proteína-azúcar)

60

Bacterias probióticas liofilizadas encapsuladas en una matriz de proteína-azúcar

Etapas de procesamiento

65

Preparar una mezcla que contiene solución de caseinato sódico, oligosacárido y jarabe de glucosa desecado (Cas-oligo-DGS) a 60 °C. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en la solución usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

Formulación 1		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	20 %	5,9 %
Mezcla de Cas–Oligo–DGS	80 %	23,5 %
Agua		70,6 %
Total	100 %	100,0 %
Formulación 2		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	11,8 %	2,9 %
Mezcla de Cas–Oligo–DGS	88,2 %	22,1 %
Agua		75 %
Total	100 %	100,0 %

Ejemplo 2 (Encapsulados: proteína-azúcar MRP)

- 5 Bacterias probióticas liofilizadas encapsuladas en una matriz de proteína reaccionada con calor-azúcar Etapas de procesamiento

Preparar una mezcla que contiene solución de caseinato sódico, oligosacárido y jarabe de glucosa desecado (Cas–oligo–DGS) a 60 °C. Calentar la mezcla a 98 °C durante 30 minutos, Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en la solución reaccionada usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

10

Formulación 1		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	20 %	5,9 %
Mezcla de Cas–Oligo–DGS procesada con calor	80 %	23,5 %
Agua		70,6 %
Total	100 %	100,0 %
Formulación 2		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	11,8 %	2,9 %
Mezcla de Cas–Oligo–DGS procesada con calor	88,2 %	22,1 %
Agua		75 %
Total	100 %	100,0 %

Ejemplo 3 (Encapsuladas: proteína-azúcar-RS (bruta))

- 15 Bacterias probióticas liofilizadas encapsuladas en una matriz de proteína-azúcar-almidón rico en amilosa

Etapas de procesamiento

- 20 Preparar una solución al 15 % en peso/peso de caseinato sódico a 60 °C, después añadir el azúcar. Preparar una dispersión al 10 % en peso/peso de Hylon VII a 60 °C. Mezclar la solución de caseinato sódico-azúcar y la dispersión Hylon VII. Enfriar hasta 10 °C. Añadir las bacterias liofilizadas en la mezcla de proteína-azúcar-almidón usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	11,8 %	2,2 %
Caseinato Na	29,4 %	5,4 %
Oligosacárido	29,4 %	5,4 %
Agua		81,5 %
Hylon VII	29,4 %	5,4 %
Total	100,0 %	100,0 %

Ejemplo 4 (Encapsuladas: proteína-azúcar-RS (MF))

Bacterias probióticas liofilizadas encapsuladas en una matriz de proteína-azúcar-almidón rico en amilosa microfluidificado

Etapas de procesamiento

Preparar una solución al 15 % en peso/peso a 60 °C, después añadir el azúcar. Preparar la dispersión al 20 % en peso/peso Hylon VII a 60 °C, calentar a 121 °C durante 60 minutos, enfriar y añadir el resto del agua hasta 10 % en peso/peso de sólidos totales y microfluidificar a 800 bares x 3 pasajes. Mezclar la solución de proteína-azúcar y la dispersión Hylon VII microfluidificada. Enfriar hasta 10 °C. Añadir las bacterias liofilizadas en la mezcla de proteína-azúcar-almidón usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	11,8 %	2,2 %
Caseinato Na	29,4 %	5,4 %
Oligosacárido	29,4 %	5,4 %
Agua		81,5 %
Hylon VII	29,4 %	5,4 %
Total	100,0 %	100,0 %

Estrategia 2**Ejemplo 5** (Encapsuladas: proteína-azúcar-emulsión en aceite)

Bacterias probióticas liofilizadas encapsuladas en una emulsión de proteína-azúcar-aceite Etapas de procesamiento

Preparar una mezcla que contiene solución de caseinato sódico, oligosacárido y jarabe de glucosa desecada (Cas-oligo-DGS) a 60 °C, añadir aceite usando un mezclador y homogeneizar a 250 bares. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en la emulsión usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	20 %	5,9 %
Mezcla de Cas-Oligo-DGS	72 %	21,2 %
Agua		70,6 %
Aceite	8 %	2,3 %
Total	100 %	100,0 %

Ejemplo 6 (Encapsuladas: proteína-azúcar-emulsión en aceite MRP)

Bacterias probióticas liofilizadas encapsuladas en una emulsión de proteína reaccionada con calor-azúcar-aceite

Etapas de procesamiento

Preparar una mezcla que contiene solución de caseinato sódico, oligosacárido y jarabe de glucosa desecada (Cas-oligo-DGS) a 60 °C, añadir el aceite y homogeneizar a 250 bares. Calentar la emulsión a 98 °C durante 30 minutos. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en la emulsión usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

Formulación 1		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	20 %	5,9 %
Mezcla de Cas-Oligo-DGS	72 %	21,2 %
Agua		70,6 %
Aceite	8 %	2,3 %
Total	100 %	100,0 %

Formulación 2		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	8 %	2 %
Mezcla de Cas–Oligo–DGS	60 %	15 %
Agua		75 %
Aceite	32 %	8 %
Total	100 %	100,0 %

Ejemplo 7 (Encapsuladas: proteína-azúcar-RS(MF)-emulsión en aceite)

- 5 Bacterias probióticas liofilizadas encapsuladas en una emulsión de proteína-azúcar-almidón rico en amilosa microfluidificado-aceite

Etapas de procesamiento

- 10 Preparar una solución al 15 % en peso/peso a 60 °C, después añadir el azúcar. Preparar la dispersión al 20 % en peso/peso Hylon VII a 60 °C, calentar a 121 °C durante 60 minutos, enfriar y añadir el resto del agua hasta 10 % en peso/peso de sólidos totales y microfluidificar a 800 bares x 3 pasajes. Mezclar la solución de proteína-azúcar y la dispersión Hylon VII microfluidificada. Añadir el aceite y homogeneizar a 250 bares. Enfriar hasta 10 °C. Añadir las bacterias liofilizadas a la emulsión usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

15

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	8 %	2 %
Caseinato Na	20 %	5 %
Oligosacárido	20 %	5 %
Agua		30 %
Hylon VII	20 %	5 %
Agua		45 %
Aceite de canola	32 %	8 %
Total	100,0 %	100,0 %

Estrategia 3

Ejemplo 8 (Encapsuladas: (en aceite) proteína-azúcar)

20

Bacterias probióticas liofilizadas en aceite y encapsuladas en una matriz de proteína-azúcar Etapas de procesamiento

- 25 Preparar una mezcla que contiene solución de caseinato sódico, oligosacárido y jarabe de glucosa desecado (Cas–oligo–DGS) a 60 °C. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en aceite. Añadir la dispersión de bacterias liofilizadas en la solución usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	10 %	3,0 %
Aceite de canola	40 %	12,0 %
Mezcla de Cas–Oligo–DGS	50 %	15,0 %
Agua		70,0 %
Total	100 %	100,0 %

Ejemplo 9 (Encapsuladas: (en aceite) proteína-azúcar MRP)

30

Bacterias probióticas liofilizadas en aceite y encapsuladas en una matriz de proteína reaccionada con calor-azúcar

Etapas de procesamiento

- 35 Preparar una mezcla que contiene solución de caseinato sódico, oligosacárido y jarabe de glucosa desecado (Cas–oligo–DGS) a 60 °C. Calentar la mezcla a 98 °C durante 30 minutos. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias

lío­filiza­das en acei­te. Añadir la dis­per­sión de bifi­do­bacte­rias Bb12 en la solu­ción usan­do un mez­cla­dor. Secar por pul­ve­ri­za­ción a 160/65 °C T_i/T_o .

Formulación 1		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	10 %	3,0 %
Aceite de canola	40 %	12,0 %
Cas–Oligo–DGS procesado con calor	50 %	15,0 %
Agua		70,0 %
Total	100 %	100,0 %
Formulación 2		
Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	8 %	2,0 %
Aceite de canola	32 %	8,0 %
Cas–Oligo–DGS procesado con calor	60 %	15,0 %
Agua		75,0 %
Total	100 %	100,0 %

5 **Ejemplo 10** (Encapsuladas: (en aceite) proteína-RS (bruta))

Bacterias probióticas liofilizadas en aceite y encapsuladas en una matriz de almidón rico en amilosa-proteína

Etapas de procesamiento

- 10 Preparar una solución al 15 % en peso/peso de caseinato sódico a 60 °C. Preparar una dispersión Hylon VII al 10 % en peso/peso a 60 °C. Mezclar la solución de caseinato sódico y la dispersión Hylon VII. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en aceite. Añadir la dispersión de bacterias liofilizadas en la mezcla de proteína-almidón usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

15

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	5 %	0,8 %
Aceite de canola	20 %	3,1 %
Caseinato Na	37,5 %	5,8 %
Agua		32,7 %
Hylon VII	37,5 %	5,8 %
Agua		51,8 %
Total	100,0 %	100,0 %

Ejemplo 11 (Encapsuladas: (en aceite) proteína-RS (MF))

- 20 Bacterias probióticas liofilizadas en aceite y encapsuladas en una matriz de proteína-almidón rico en amilosa-microfluidificado

Etapas de procesamiento

- 25 Preparar una solución al 15 % en peso/peso de caseinato a 60 °C. Preparar una dispersión al 20 % en peso/peso Hylon VII a 60 °C, calentar a 121 °C durante 60 minutos, enfriar y añadir el agua restante hasta obtener 10 % en peso/peso de sólidos totales y microfluidificar a 800 bares. Mezclar la solución de caseinato sódico y Hylon VII microfluidificada. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en aceite. Añadir la dispersión de bacterias liofilizadas en la mezcla de proteína-almidón usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o .

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	5,0 %	0,8 %
Aceite de canola	20,0 %	3,1 %
Caseinato Na	37,5 %	5,8 %
Agua		32,7 %

Hylon VII	37,5 %	5,8 %
Agua		51,8 %
Total	100,0 %	100,0 %

Ejemplo 12 (Encapsuladas: (en aceite) proteína-azúcar-RS (MF)

Bacterias probióticas liofilizadas en aceite y encapsuladas en una matriz de proteína-azúcar-almidón rico en amilosa-microfluidificado

Etapas de procesamiento

Preparar una solución al 15 % en peso/peso a 60 °C, después añadir el azúcar. Preparar la dispersión al 20 % en peso/peso Hylon VII a 60 °C, calentar a 121 °C durante 60 minutos, enfriar y añadir el resto del agua hasta 10 % en peso/peso de sólidos totales y microfluidificar a 800 bares x 3 pasajes. Mezclar la solución de proteína-azúcar y la dispersión Hylon VII microfluidificada. Enfriar hasta 10 °C. Dispersar las bacterias liofilizadas en aceite. Añadir la dispersión de bacterias liofilizadas en la mezcla de proteína-almidón usando un mezclador. Secar por pulverización a 160/65 °C T_i/T_o.

Ingrediente	% en polvo	% en emulsión
Bacterias liofilizadas	8 %	2 %
Aceite de canola	32 %	8 %
Caseinato Na	20 %	5 %
Oligosacárido	20 %	5 %
Agua		30 %
Hylon VII	20 %	5 %
Agua		45 %
Total	100,0 %	100,0 %

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD BACTERIANA

Con el fin de enumerar las bacterias viables, los probióticos se liberaron de las microcápsulas disolviendo el material de la cápsula en fluido intestinal simulado (FIS) (descrito más adelante) o agua desionizada (DI). Muestras duplicadas de 1,0 g de material encapsulado secado por pulverización se mezclaron con 10 ml de FIS o DI y las muestras se incubaron durante 1 – 2 horas a 37 °C en mezcla continua a 100 rpm. La enumeración de las bacterias viables liberadas se realizó usando métodos de siembra microbiológica tradicionales. Se realizaron diluciones en serie por diez de las bacterias en 0,1 % de peptona (pH 6,9 - 7,0). Para facilitar la dispersión de las bacterias en aceite en las muestras se añadió Tween 80 (100µl) a la primera dilución de todas las muestras antes de agitar en vórtex. Las bifidobacterias se cultivaron en agar reforzado para clostridios (RCA) y los lactobacilos se cultivaron en agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) Las placas de agar se incubaron en anaerobiosis durante 48 horas a 37 °C y se determinaron las UFC/g de material encapsulado. El porcentaje de supervivencia se calculó como;

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = (\text{UFC/g postratamiento} \div \text{UFC iniciales/g}) \times 100 \%$$

Las ventajas de los tratamientos de microencapsulación sobre la supervivencia de las bacterias probióticas se examinaron en cuatro áreas:

- Supervivencia durante el secado por pulverización
- Supervivencia (y liberación) durante el tránsito gastrointestinal
- Supervivencia durante el almacenamiento no refrigerado
- Supervivencia a pH bajo

Ventaja de la microencapsulación durante el secado por pulverización

Cada una de las tres cepas de bacterias probióticas mencionadas anteriormente se microencapsuló y secó por pulverización usando las técnicas descritas en los ejemplos. El porcentaje de las bacterias probióticas que sobrevivieron al secado por pulverización se determinó para cada técnica de microencapsulación. Para *Bifidobacterium infantis*, fue posible secar por pulverización una muestra de bacterias liofilizada resuspendida para proporcionar una comparación de la supervivencia de las bacterias liofilizadas encapsuladas y resuspendidas durante el secado por pulverización.

La figura 1 muestra que las tres estrategias de microencapsulación protegían al probiótico durante el secado por pulverización en comparación con las bacterias no encapsuladas. ("No encapsulado" en la figura 1 significa que la

muestra probiótica liofilizada se dispersó en agua y se secó por pulverización)

La microencapsulación protegía sustancialmente la viabilidad del *Bifidobacterium* probiótico durante el secado por pulverización.

La estrategia 1 parecía ser la mejor para *Bifidobacterium infantis* durante el secado por pulverización. Con esta cepa sensible se alcanzó una mejora de más de 3 órdenes de magnitud (3 unidades $\log_{10}$) e la viabilidad del probiótico.

La figura 2 muestra que la supervivencia de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 es generalmente mucho mayor que para la cepa de *Bifidobacterium infantis* sensible.

Una serie de tratamientos de microencapsulación permitió conservar la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 en el mismo orden de magnitud (un descenso de menos de 1 $\log_{10}$ en la viabilidad) durante el secado por pulverización.

Se observaron diferencias entre tratamientos en la estrategia 3 en su capacidad para proteger la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

Dado que las *Bifidobacterium lactis* Bb-12 liofilizadas resuspendidas en agua no se pudieron secar por pulverización, no fue posible comparar los efectos de la encapsulación durante el secado por pulverización para esta cepa.

La figura 3 muestra que la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* La-5 se mantenía bien durante el secado por pulverización para una serie de tratamientos de encapsulación.

Muchos tratamientos de encapsulación permitieron el mantenimiento de una viabilidad superior al 50 % durante el secado por pulverización con variación de una cepa a otra en los tratamientos más eficaces.

En general, la figura 1 muestra que las estrategias de encapsulación usadas protegen durante el secado por pulverización y las figuras 2 y 3 muestran que la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5 permanecía en gran medida intacta tras el secado por pulverización.

Ventaja de la microencapsulación durante el tránsito gastrointestinal

Para simular la supervivencia durante el tránsito gastrointestinal, las bacterias probióticas microencapsuladas y no microencapsuladas se pasaron a través de un modelo *in vitro* de dos etapas simulando las condiciones del estómago y el intestino delgado. En la etapa 1, muestras de 1,0 g por duplicado de cada tratamiento encapsulado secado por pulverización se mezclaron en 10 ml de fluido gástrico simulado (FGS) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C con agitación constante a 100 rpm. Tras 2 horas, el pH de las muestras se ajustó a 6,8 usando hidróxido sódico 1M (añadido gota a gota para prevenir los posibles daños a las células vivas), después se añadieron 10 ml de FIS a la muestra de pH ajustado que se incubó durante 3 horas más a 37 °C con agitación constante a 100 rpm. Después se midieron los recuentos viables de las bacterias.

El FGS y el FIS se prepararon del siguiente modo (referencia: Farmacopea de Estados Unidos (2000) y el Formulario Nacional (USP 24NF19, Rockville MD):

Fluido gástrico simulado (FGS) (pH 1,2)

Se disolvieron cloruro sódico (1,0 g), 1,6 g de pepsina y 3,5 ml de HCl concentrado (36 %) en agua desionizada hasta un volumen final de 500 ml. El pH final de la solución fue de 1,2.

Fluido intestinal simulado (FIS) (pH 6,8)

Se preparó hidrógeno fosfato potásico disolviendo 3,4 g en 450 ml de agua desionizada. A esto se añadieron 38,5 ml de hidróxido sódico 0,2 M y 6,25 g de pancreatina (8 x grado USP). La solución se mezcló a 4 °C durante la noche y el pH se ajustó a 6,8 con hidróxido sódico 1 M o con ácido clorhídrico 0,2 M. El volumen se llenó hasta 500 ml con agua desionizada.

La figura 4 muestra que las tres estrategias de microencapsulación mejoraron la viabilidad de la cepa. ("No encapsulado (liofilizado)" significa muestra probiótica liofilizada en la figura 4 y todas las figuras siguientes)

La microencapsulación protegió sustancialmente la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium infantis* en comparación con las bacterias liofilizadas no encapsuladas. Las estrategias 2 y 3 fueron las más protectoras.

Casi el 100 % de la supervivencia de esta cepa probiótica sensible se alcanzó con la encapsulación en comparación con las bacterias no encapsuladas para las que la viabilidad disminuyó en casi 4 órdenes de magnitud (4 unidades $\log_{10}$) en las mismas condiciones.

Ventaja de la microencapsulación durante el almacenamiento no refrigerado

La supervivencia de las bacterias probióticas encapsuladas y no encapsuladas se evaluó durante el almacenamiento en un periodo de 5 semanas a 25 °C y una humedad relativa del 50 %. La supervivencia de las bacterias se evaluó tras 2 semanas y 5 semanas. Los recuentos viables se obtuvieron como se ha descrito anteriormente.

La figura 5 muestra que las tres estrategias de microencapsulación protegían la viabilidad de la cepa en cierta medida tras 2 semanas de almacenamiento a 25 °C-HT del 50 %. La microencapsulación protegía sustancialmente la viabilidad del probiótico. La Figura 4 muestra que las tres estrategias de microencapsulación mejoraron la viabilidad de la cepa. ("No encapsulado (líoofilizado)" significa muestra probiótica liofilizada en la figura 4 y todas las figuras siguientes)

La microencapsulación protegió sustancialmente la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium infantis* en comparación con las bacterias liofilizadas no encapsuladas en comparación con las bacterias no encapsuladas durante el almacenamiento no refrigerado. Las estrategias 2 y 3 fueron las más protectoras.

La viabilidad de esta cepa aprobiótica, de una especie que es sensible a las condiciones ambientales, tales como oxígeno, se mantuvo dentro del mismo orden de magnitud (un descenso de menos de 1 unidad $\log_{10}$) en un periodo de 2 semanas en condiciones no refrigeradas usando algunos tratamientos.

Por el contrario, la viabilidad de las bacterias liofilizadas no encapsuladas se redujo en más de 5 órdenes de magnitud.

La figura 6 muestra que la microencapsulación protegía sustancialmente la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium infantis* en comparación con las bacterias no encapsuladas durante el almacenamiento no refrigerado. Tras 5 semanas de almacenamiento, los tratamientos que abarca la estrategia 2 y la encapsulación en la proteína – RS (MF) (estrategia 1) fueron los que tuvieron más éxito en el mantenimiento de la viabilidad de *Bifidobacterium infantis*.

Tras el almacenamiento a 25 °C y una humedad relativa del 50 % durante 5 semanas, la microencapsulación de las bacterias usando la estrategia 2 permitió mantener la pérdida de recuentos viables en menos de 2 unidades $\log_{10}$ en comparación con un descenso mayor de 8 unidades $\log_{10}$ en los recuentos de viables observados para las bacterias no encapsuladas.

La figura 7 muestra que las tres estrategias de microencapsulación protegía la viabilidad de la cepa durante el almacenamiento durante 5 semanas a 25 °C y una humedad relativa del 50 % en mayor medida que las bacterias no encapsuladas.

La microencapsulación protegió sustancialmente la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium lactis* Bb–12 en comparación con las bacterias liofilizadas no encapsuladas durante el almacenamiento no refrigerado. La viabilidad de las bacterias no encapsuladas a un almacenamiento de 2 semanas fue inferior al límite de detección de 1.000 UFC/g. Por tanto, el porcentaje de supervivencia representado para las bacterias liofilizadas no encapsuladas en este punto represente el porcentaje máximo posible de supervivencia y puede ser una sobreestimación.

El beneficio en términos del porcentaje de supervivencia tras 5 semanas estaba entre 2 y 4 unidades $\log_{10}$.

Ventaja de la microencapsulación en un ambiente de pH bajo

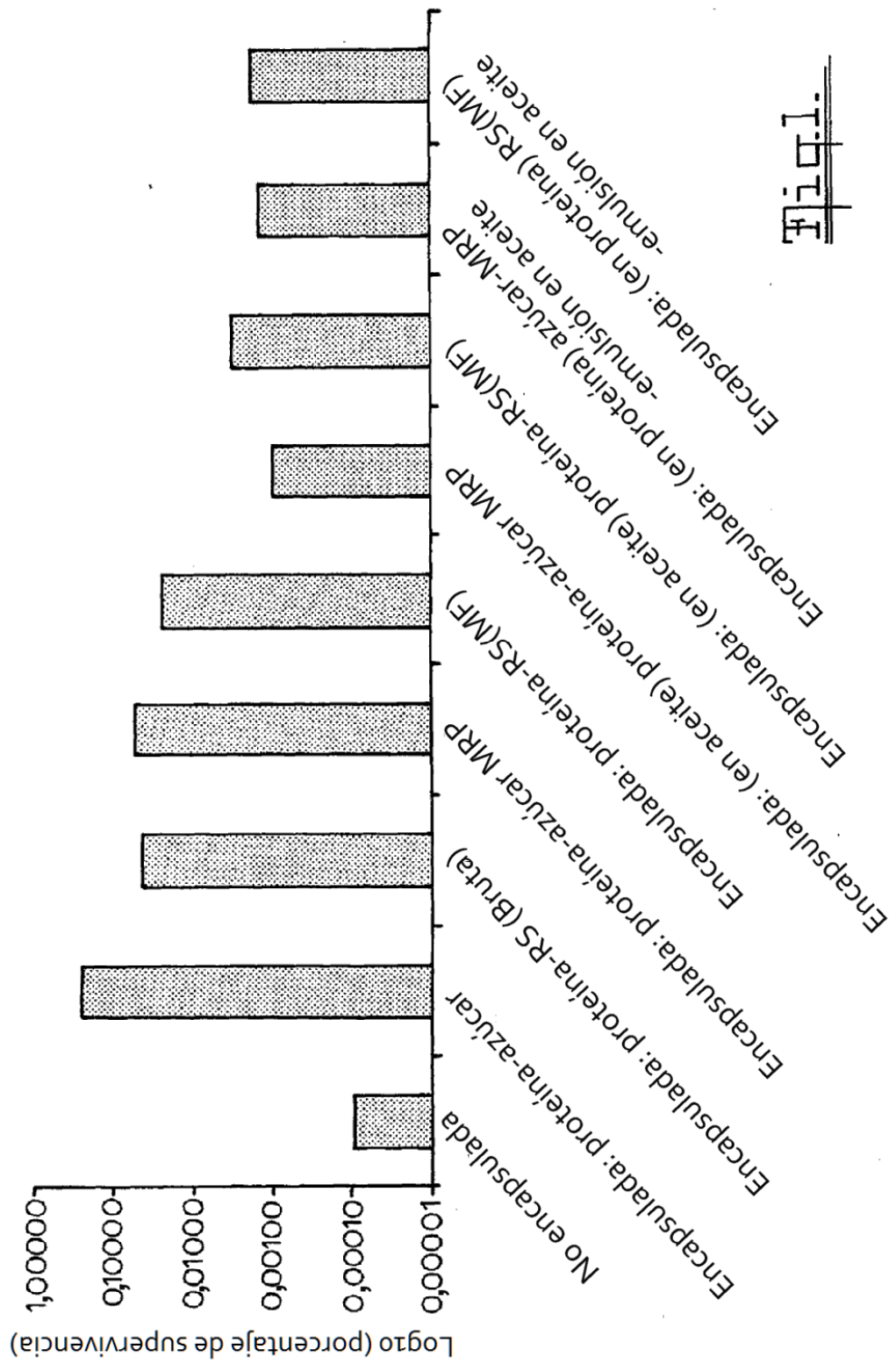
La capacidad de las microcápsulas para proteger las bacterias contra un pH moderadamente bajo se evaluó usando incubación a pH 4,0 como ejemplo. Las bacterias probióticas secadas por pulverización encapsuladas y liofilizadas no encapsuladas (0,12 g de equivalente en polvo liofilizado) se mezclaron en 10 ml de tampón acetato 0,2 M a pH 4,0 y se incubaron durante 2 horas a 37 °C con agitación constante a 100 rpm. Tras las 2 horas de incubación, el pH de las muestras se ajustó a 6,8 usando hidróxido sódico 1M y se incubaron durante 1 hora adicional a 37 °C (temperatura ambiente) para efectuar la liberación de las bacterias de las cápsulas. Los recuentos viables de bacterias en las muestras se determinaron como se ha descrito anteriormente.

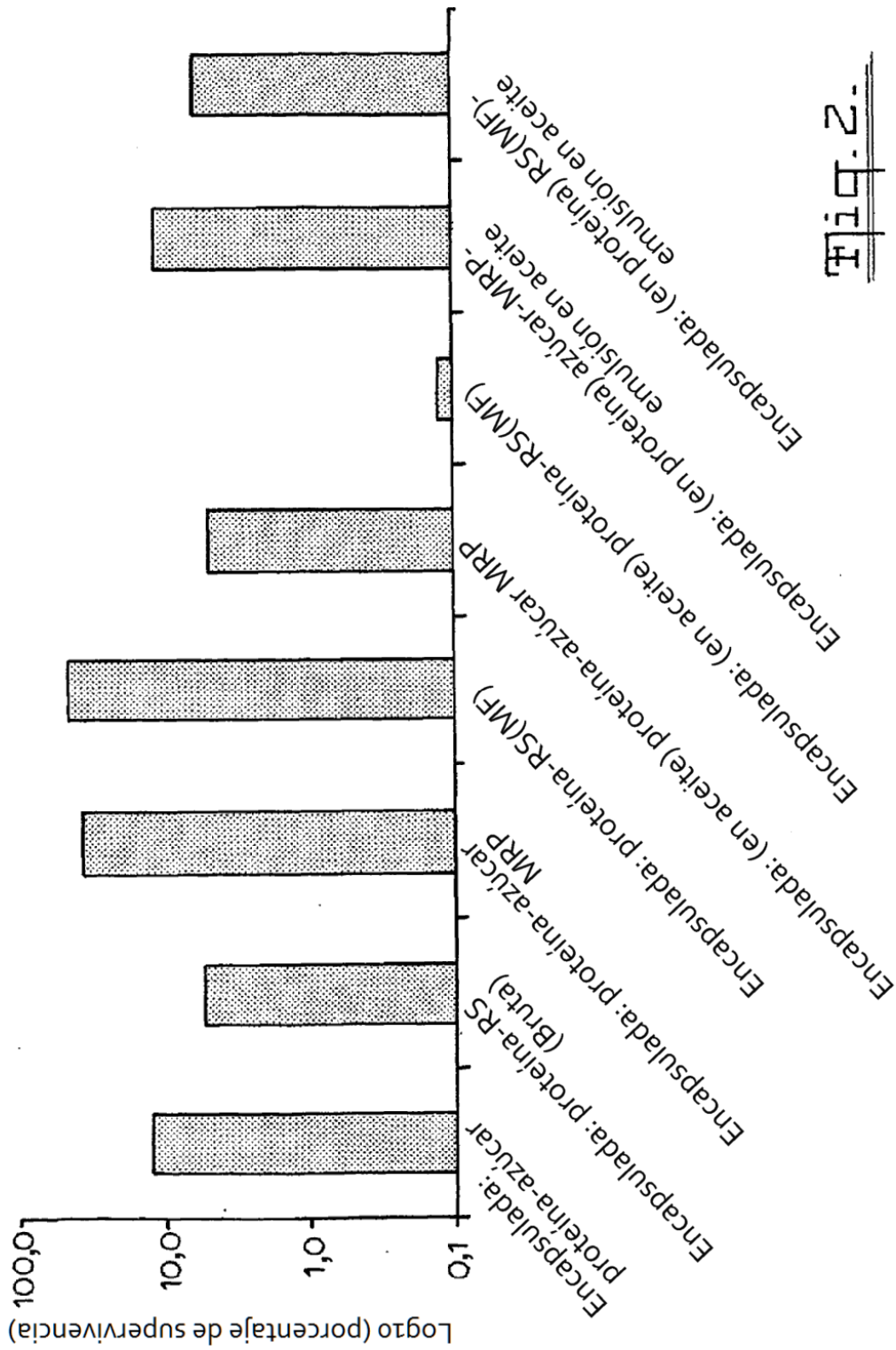
La figura 8 muestra que las tres estrategias de microencapsulación protegían la viabilidad de la cepa en cierta medida, proporcionando, de media, una mejora de 2-3 log en la viabilidad tras la incubación a pH 4,0. ("no encapsuladas: liofilizadas" es la muestra de probiótico liofilizado).

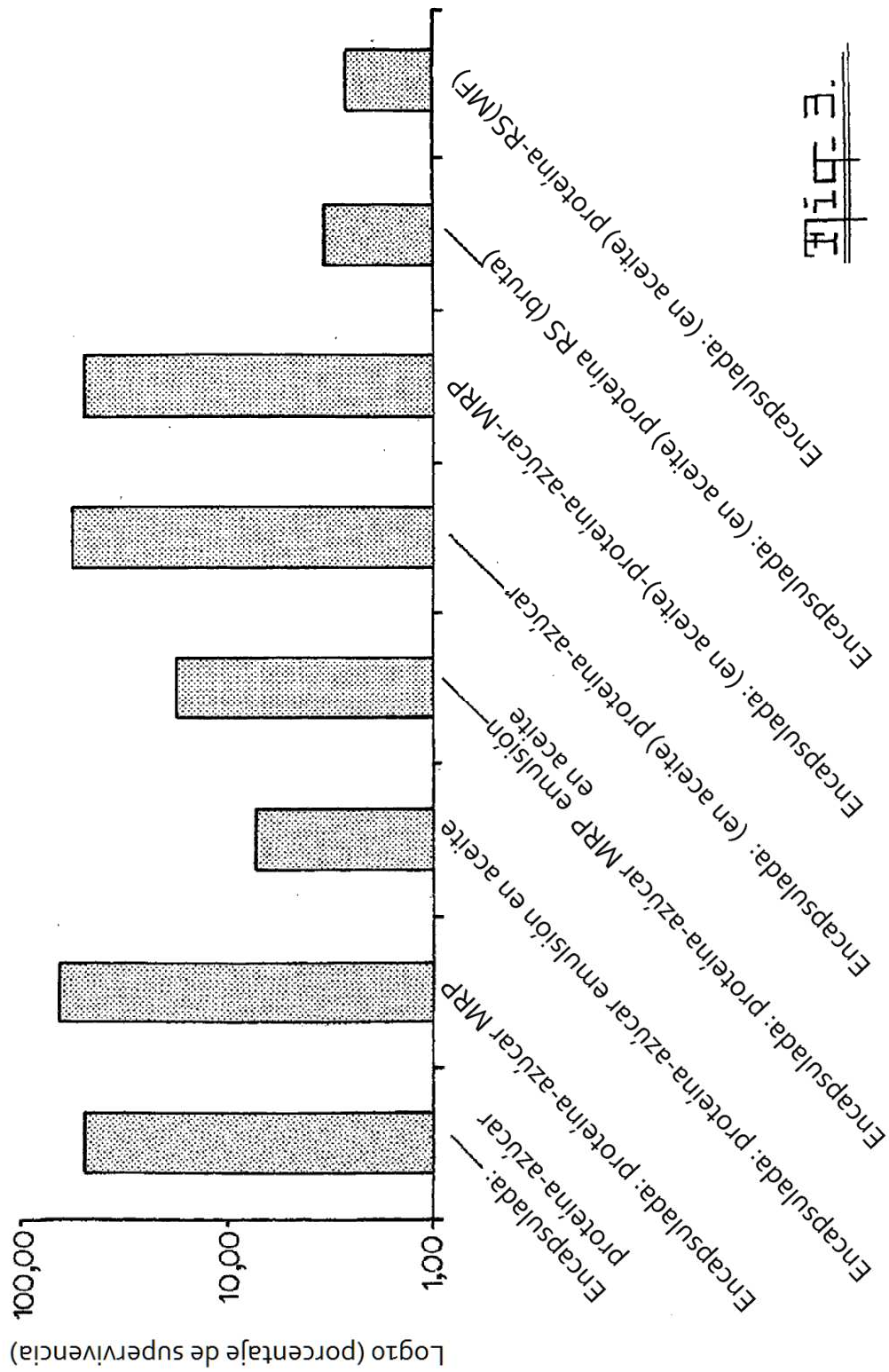
La microencapsulación protegió sustancialmente la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium infantis* en comparación con las bacterias liofilizadas no encapsuladas.

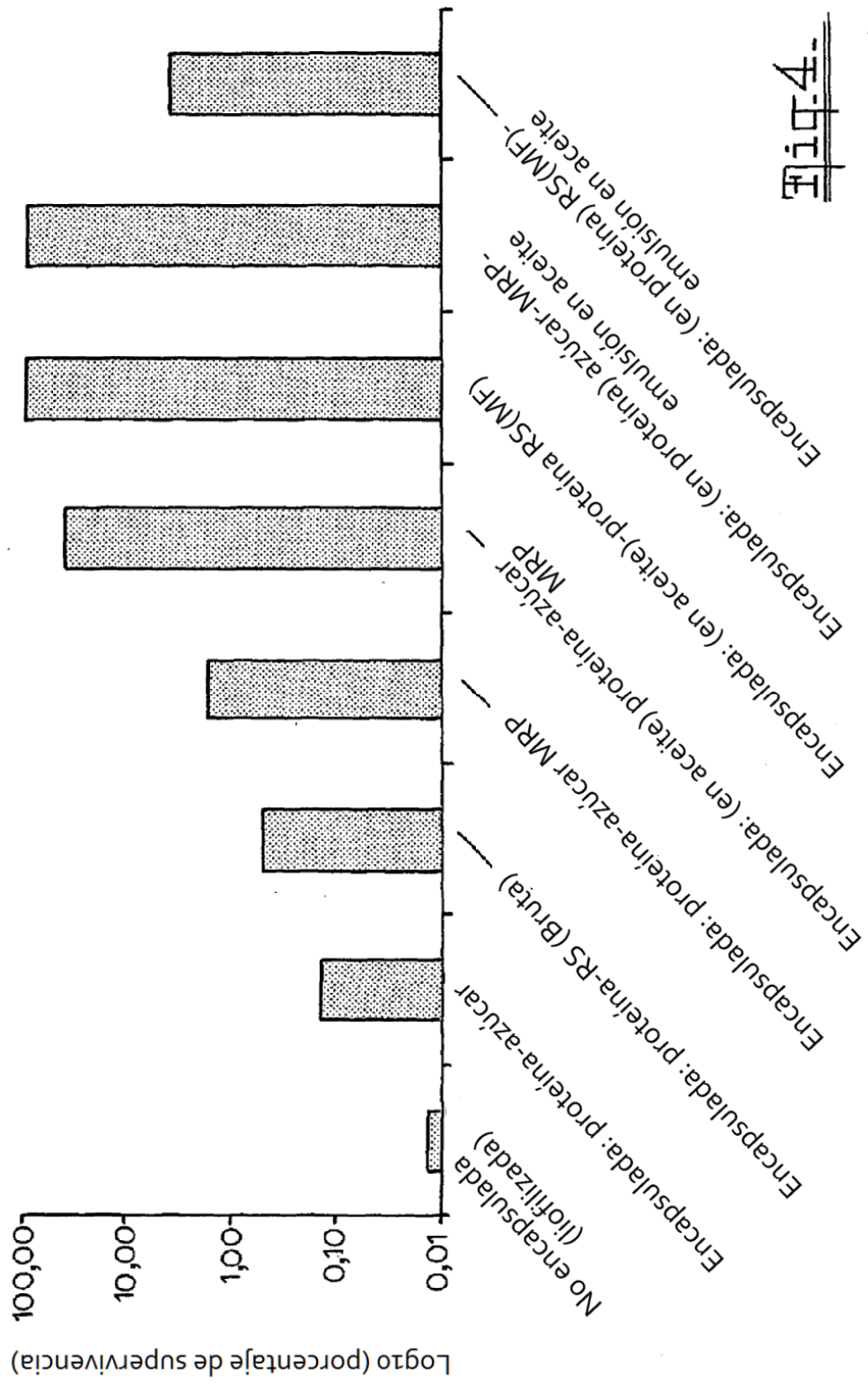
REIVINDICACIONES

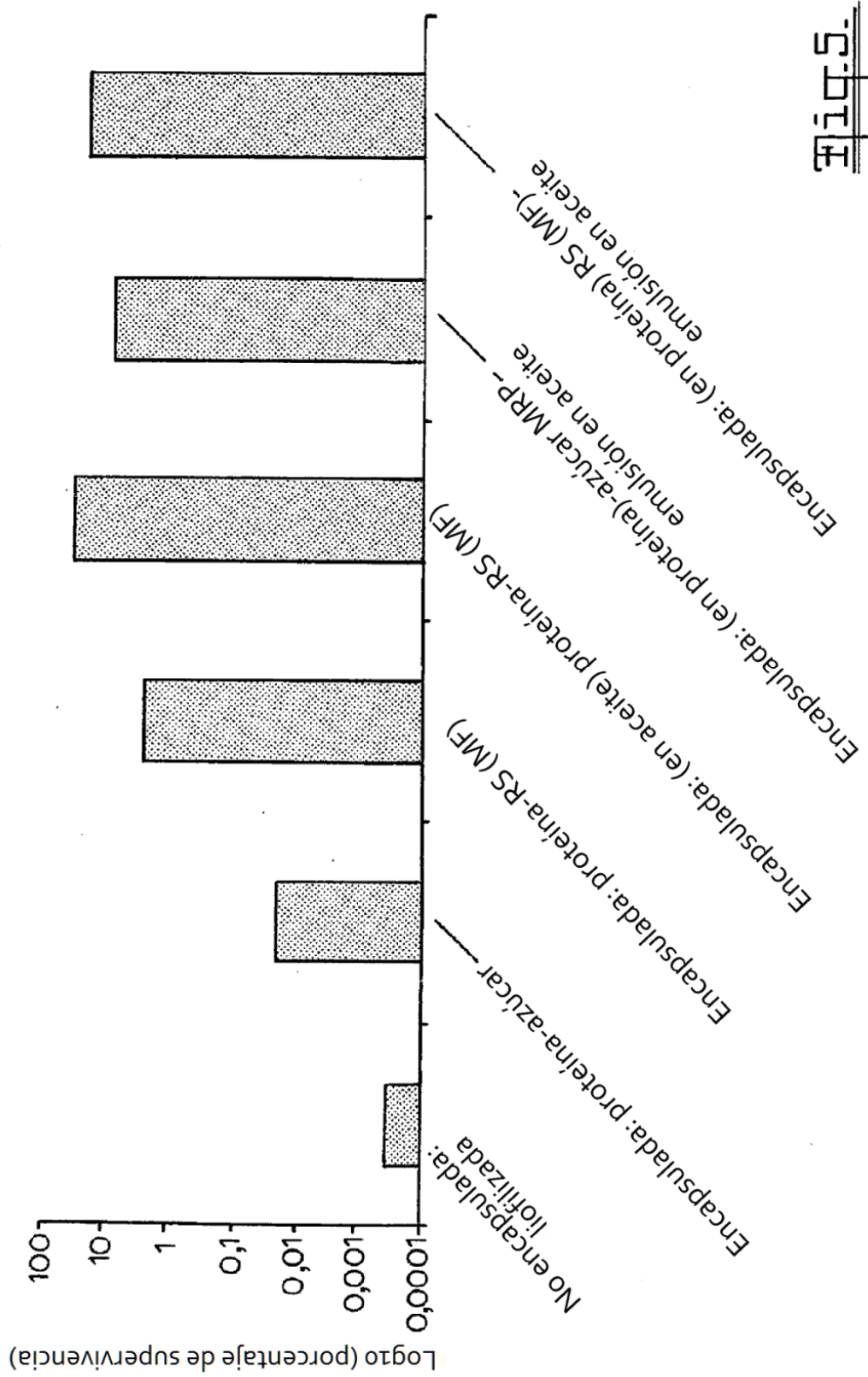
1. Un método de encapsulación de probióticos en el que uno o más microorganismos probióticos se encapsulan en una mezcla de proteínas y de hidratos de carbono mediante dispersión
- 5 a) en una suspensión acuosa de una proteína y un hidrato de carbono
 b) en una emulsión de aceite en agua de una proteína formadora de película y un hidrato de carbono y una grasa, o
 c) en un aceite que después se dispersa en una proteína formadora de película y un hidrato de carbono.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el hidrato de carbono contiene un grupo de azúcar reductor.
- 15 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que uno o más materiales prebióticos se mezclan con los microorganismos probióticos.
4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el hidrato de carbono en la composición formadora de película es un hidrato de carbono prebiótico.
- 20 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína es caseína o proteína del suero de la leche.
6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el hidrato de carbono es un almidón resistente o un almidón rico en amilosa.
- 25 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proteína y el hidrato de carbono se han procesado con calor.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proteína y el hidrato de carbono se procesan con calor en presencia de un aceite o una grasa antes de la adición de las bacterias probióticas.
- 30 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el almidón se procesa mediante calentamiento y/o microfluidificación.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo probiótico se selecciona de bifidobacterias, lactobacilos, Saccharomyces, lactococos, estreptococos y propionibacterias.
- 35 11. Un microorganismo probiótico encapsulado obtenible mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 40 12. Un microorganismo probiótico encapsulado de acuerdo con la reivindicación 11, que se seca por pulverización para formar un polvo.
13. Un polvo probiótico de acuerdo con la reivindicación 12 que consiste en una bacteria probiótica seleccionada de bifidobacterias, lactobacilos, Saccharomyces, lactococos, estreptococos y propionibacterias encapsuladas en una mezcla formadora de película de caseína o proteína del suero de la leche y un oligosacárido.
- 45 14. Un polvo probiótico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la mezcla formadora de película se ha calentado para formar productos de la reacción de Maillard entre el oligosacárido y la caseína o la proteína del suero de la leche.
- 50 15. Un polvo probiótico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las bacterias probióticas son un concentrado probiótico líquido.











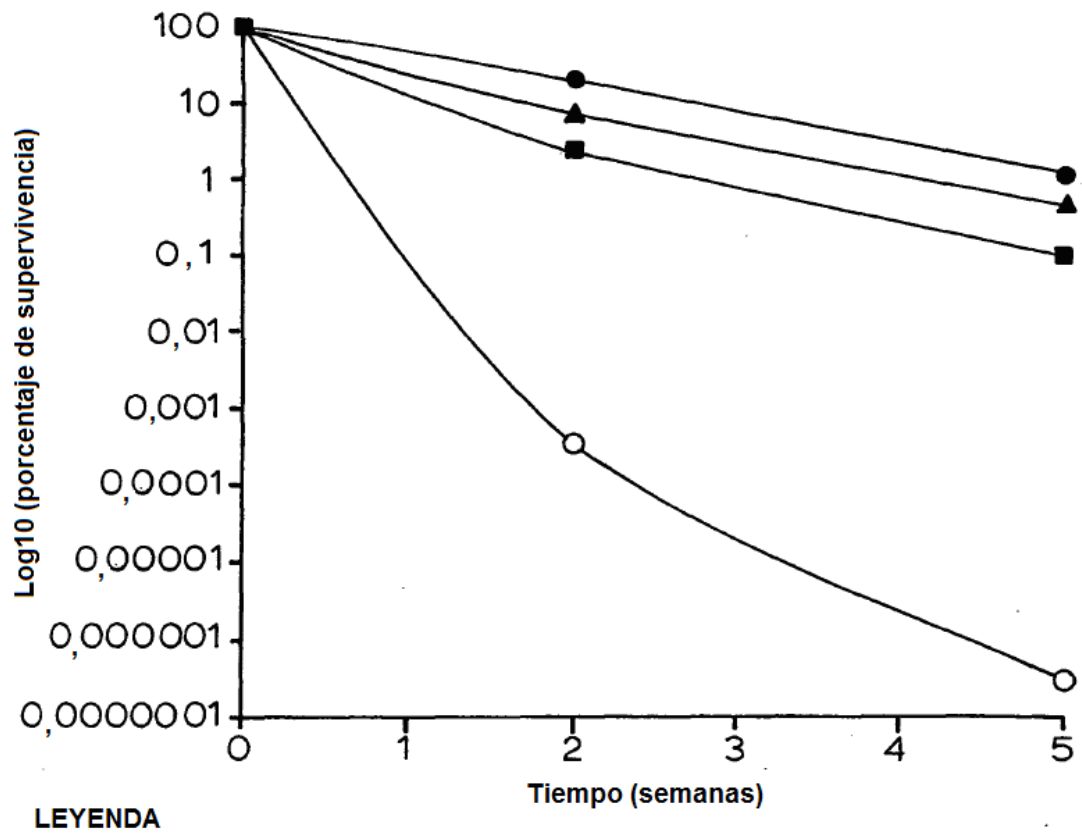
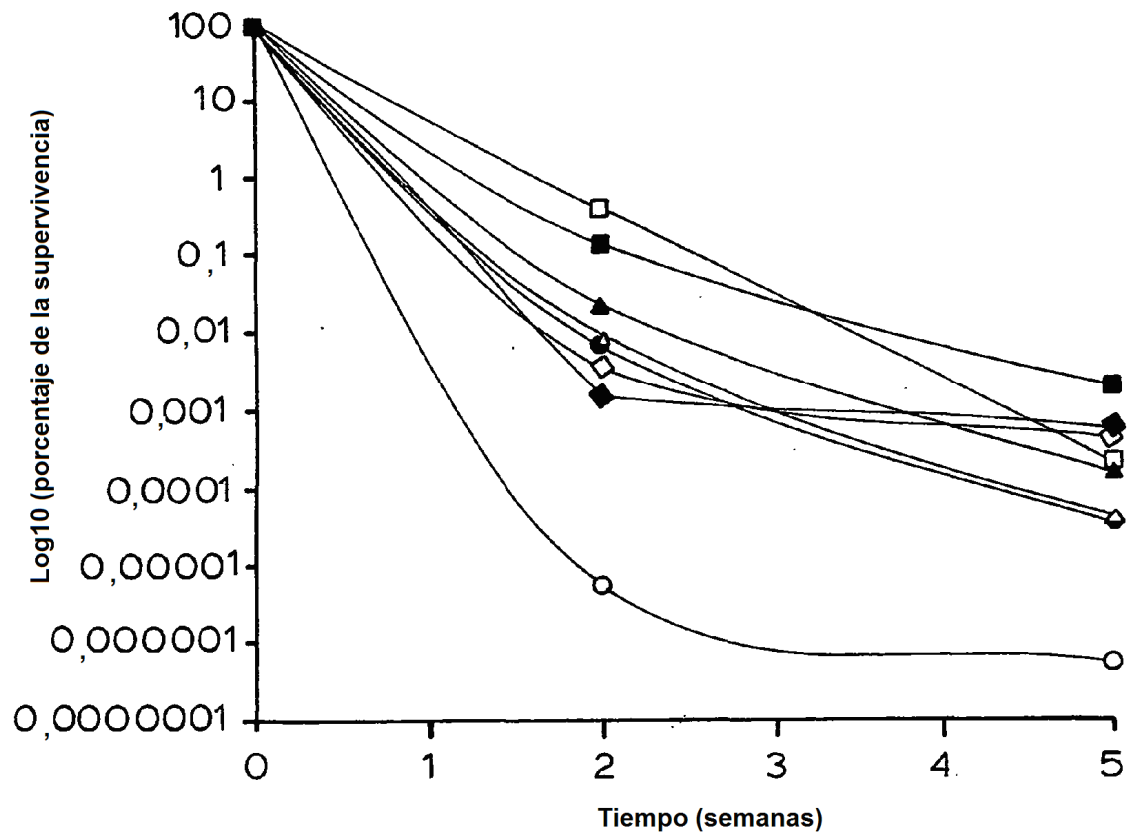


Fig.6.



LEYENDA

- — No encapsulada (muestra probiótica liofilizada)
- — Encapsulada: proteína azúcar
- ▲ — Encapsulada: proteína -RS (Bruta)
- — Encapsulada: proteína -azúcar MRP
- △ — Encapsulada: proteína -RS (MF)
- ◆ — Encapsulada: (en aceite) proteína-azúcar MRP
- ◇ — Encapsulada: (en proteína) azúcar MRP-emulsión en aceite
- — Encapsulada: (en proteína)-RS(MF)-emulsión en aceite

Fig. 7.

