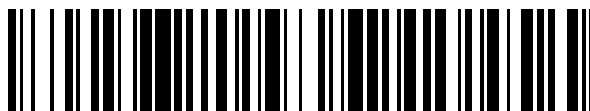


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 733**

51 Int. Cl.:

A23L 7/104 (2006.01)

A23L 7/109 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A23L 23/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2009 PCT/US2009/060983**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010 WO10045541**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09740240 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2348888**

54 Título: **Composiciones probióticas a base de cereales**

30 Prioridad:

16.10.2008 US 106116 P

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

03.01.2017

73 Titular/es:

**GANEDEN BIOTECH, INC. (100.0%)
5915 Landerbrook Drive, Suite 304
Mayfield Heights, OH 44124, US**

72 Inventor/es:

**FARMER, SEAN;
LEFKOWITZ, ANDREW, R.;
BUSH, MICHAEL y
MASKE, DAVID**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 595 733 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones probióticas a base de cereales

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere a composiciones probióticas a base de cereales que comprenden bacterias productoras de ácido láctico.

Antecedentes de la invención

10 La microflora gastrointestinal representa un número de papeles vitales en el mantenimiento de la función del tracto gastrointestinal y la salud fisiológica general. El crecimiento y el metabolismo de las muchas especies bacterianas individuales que habitan en el tracto gastrointestinal dependen principalmente de los sustratos disponibles para ellas, la mayoría de los cuales se derivan de la dieta. Puesto que los probióticos generalmente no colonizan permanentemente el hospedador, necesitan ser ingeridos regularmente para que persistan cualesquiera propiedades promotoras de la salud.

15 Sawatari y cols. "Development of fermented instant Chinese noodle using *Lactobacillus plantarum*" Food Microbiology 22(6):539-546, diciembre de 2005, desarrollaron un nuevo tipo de tallarines chinos instantáneos con la aplicación de fermentación de ácido láctico por *Lactobacilli*.

Sumario de la invención

20 La invención se basa en el descubrimiento de que las bacterias productoras de ácido láctico, particularmente especies de *Bacillus*, siguen siendo viables y retienen sus propiedades probióticas beneficiosas en composiciones alimentarias, tales como las preparadas a altas temperaturas (p. ej., 80, 90, 100, 120 o 150°C) en agua hirviendo. La invención describe composiciones probióticas a base de cereales. Específicamente, la invención proporciona una composición alimentaria que comprende un cereal y una célula vegetativa o espora de *Bacillus coagulans*, en donde dicha composición comprende pasta y en donde dicha *Bacillus coagulans* es la cepa GBI-30 (Número de Denominación de la ATCC PTA-6086).

25 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Pastas adecuadas incluyen pasta al huevo, espagueti (cilindros delgados sólidos), macarrones (tubos o cilindros huecos), fusilli (forma helicoidal), lasaña (hojas), tagliatelle (cintas planas), vermicelli (espagueti fino), ravioli (pasta rellena), spätzle y ñoqui. Otras pastas adecuadas incluyen penne rigate (pasta en forma cilíndrica estriada), penne lisce (pasta en forma cilíndrica lisa), rotini (pasta en forma de sacacorchos) y rigatoni (pasta en forma de tubo).

30 En un aspecto, las *Bacillus coagulans* aisladas comprenden entre 0,01% y 10% en peso de la composición. Preferiblemente, las *Bacillus coagulans* aisladas comprenden entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1% en peso de la composición.

35 Opcionalmente, la *Bacillus coagulans* aislada está en el forma de una espora. En un aspecto, las esporas de *Bacillus coagulans* se activan al entrar en contacto con líquido caliente. Preferiblemente, el líquido caliente es agua o leche. Alternativamente, la *Bacillus coagulans* aislada está en la forma de una célula vegetativa. En otro aspecto, la *Bacillus coagulans* aislada está en la forma de una mezcla de células vegetativas y esporas. Preferiblemente, la *Bacillus coagulans* está predominantemente en forma de esporas, p. ej. aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 99% o aproximadamente 100% de esporas.

40 Las cepas Hammer de *Bacillus coagulans* de la invención son apatógenas y generalmente se consideran seguras para el uso en nutrición humana (es decir, clasificación GRAS) por the U.S. Federal Drug Administration (FDA) y the U.S. Department of Agriculture (USDA) y por los expertos en la técnica. Por otra parte, las cepas Hammer de *Bacillus coagulans* de la invención germinan a o por debajo de la temperatura corporal humana, haciéndolas útiles como probióticos. Muchas cepas de *Bacillus coagulans* fuera del grupo Hammer tienen principalmente aplicaciones industriales, poco o ningún beneficio nutricional y contaminantes medioambientales que no se han evaluado en cuanto a la seguridad. Además, muchas otras cepas distintas a Hammer de *Bacillus coagulans* crecen óptimamente a temperaturas que superan la temperatura corporal humana y, así, no germinan eficazmente en el cuerpo humano. Tales cepas son menos o nada adecuadas como probióticos para el consumo humano.

55 La descripción detallada y los ejemplos siguientes son ejemplares y explicativos solamente y no restrictivos de la invención según se reivindica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que demuestra la supervivencia de BC30 en ñoqui (pasta de patata). La Figura 2 es un diagrama de barras que ilustra la supervivencia de BC30 en relleno de pasta fresca al huevo. Barra izquierda: pasta no tratada con relleno a base de queso (que contiene cultivos bacterianos de queso); barra media: pasta con relleno a base de queso tratado con BC³⁰; barra derecha: pasta con relleno a base de queso tratado con BC³⁰ y pasteurizado a 100°C durante 5 minutos.

Descripción detallada de la invención

Los organismos probióticos son apatógenos, atoxigénicos, retienen la viabilidad durante el almacenamiento y sobreviven al paso a través del estómago y el intestino delgado. Las bacterias productoras de ácido láctico (es decir, "bacterias de ácido láctico") apatógenas, tales como la *Bacillus coagulans* ejemplar, siguen siendo viables y retienen sus propiedades probióticas beneficiosas en composiciones a base de cereales y para sopa, tales como las preparadas en agua hirviendo. Específicamente, los organismos probióticos descritos en la presente memoria, p. ej., *Bacillus coagulans* cepa GBI-30 o BC³⁰, Número de Denominación de la ATCC PTA-6086, sobreviven a los procedimientos rigurosos de fabricación y cocción de las composiciones a base de cereales y para sopa descritas posteriormente.

Bacterias productoras de ácido láctico probióticas

Una bacteria productora de ácido láctico probiótica adecuada para el uso en las composiciones de la invención produce ácido y es apatógena. La propiedad de producción de ácido es importante para la eficacia de las bacterias productoras de ácido láctico probióticas de esta invención.

La invención proporciona el uso de una bacteria productora de ácido láctico, tal como la *Bacillus coagulans* Hammer formadora de esporas, en donde dicha *B. coagulans* es la cepa GBI-30 (número de denominación de la ATCC PTA-6086).

Métodos y composiciones ejemplares se describen en la presente memoria usando *Bacillus coagulans* como un probiótico. *Bacillus coagulans* purificada y/o aislada es particularmente útil como un probiótico en composiciones a base de cereales y para sopa. *B. coagulans* probiótica es apatógena y generalmente se considera segura (es decir, clasificación GRAS) por the U.S. Federal Drug Administration (FDA) y the U.S. Department of Agriculture (USDA), y por los expertos en la técnica.

Bacillus coagulans es una bacteria formadora de esporas grampositiva apatógena que produce ácido L(+)-láctico (dextrogiro) en condiciones de fermentación. Se ha aislado de fuentes naturales, tales como muestras de suelo termotratadas inoculadas en medio nutritivo (Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Vol. 2, Sneath, P.H.A., y cols., eds., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1986). Cepas de *B. coagulans* purificadas han servido como una fuente de enzimas incluyendo endonucleasas (p. ej., Patente de EE. UU. N° 5.200.336); amilasa (Patente de EE. UU. N° 4.980.180); lactasa (Patente de EE. UU. N° 4.323.651); y ciclomaltodextrina glucanotransferasa (Patente de EE. UU. N° 5.102.800). *B. coagulans* se ha usado para producir ácido láctico (Patente de EE. UU. N° 5.079.164). Una cepa de *B. coagulans* (denominada *L. sporogenes*; Sakaguti & Nakayama (ATCC 31284)) se ha combinado con otra bacteria productora de ácido láctico y *B. natto* para producir un producto alimentario fermentado de habas de soja tratadas al vapor de agua (Patente de EE. UU. N° 4.110.477).

Especies bacterianas incluyen *Bacillus coagulans*, p. ej., *Bacillus coagulans* hammer, preferiblemente *Bacillus coagulans* hammer cepa n° de registro ATCC 31284, o una o más cepas derivadas de *Bacillus coagulans* hammer cepa n° de registro ATCC 31284 (p. ej., números de ATCC: GBI-20, número de denominación de la ATCC PTA-6085; GBI-30, Número de Denominación de la ATCC PTA-6086; y GBI-40, Número de Denominación de la ATCC PTA-6087; véase la Patente de EE. UU. N° 6.849.256 de Farmer).

Bacillus coagulans previamente se caracterizó erróneamente como un *Lactobacillus* y se clasificó como *Lactobacillus sporogenes* (Véase Nakamura y cols. 1988. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 63-73). Sin embargo, la clasificación inicial era incorrecta debido a que *Bacillus coagulans* produce esporas y excreta ácido L(+)-láctico a través del metabolismo. Ambas características proporcionan rasgos clave para la utilidad de *Bacillus coagulans*. Estos aspectos de desarrollo y metabólicos requerían que la bacteria se clasificara como una *Bacillus* de ácido láctico. Además, generalmente no se aprecia que las especies clásicas de *Lactobacillus* sean inadecuadas para la colonización del intestino debido a su inestabilidad en el ambiente de pH fuerte (es decir, ácido) de la bilis, particularmente bilis humana. En contraste, *Bacillus coagulans* es capaz de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal en el ambiente biliar e incluso crecer en este intervalo de pH bajo.

Actividad probiótica de *Bacillus coagulans*

Está bien documentado clínicamente que muchas especies de patógenos bacterianos, micóticos y levaduriformes poseen la capacidad de provocar una variedad de trastornos gastrointestinales incluyendo, pero no limitados a: alteración de la función bioquímica gastrointestinal normal, necrosis de tejidos gastrointestinales y alteración de la bioabsorción de nutrientes, y afecciones similares. Las composiciones que contienen microorganismos probióticos descritas en la presente memoria inhiben estos patógenos. Así, las composiciones son útiles en el tratamiento profiláctico o terapéutico de afecciones asociadas con una infección por los susodichos patógenos.

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

Debido a que las esporas de *Bacillus* son resistentes al calor y la presión y se pueden almacenar como un polvo seco, son particularmente útiles para la formulación en y la fabricación de productos tales como las diversas composiciones a base de cereales y para sopa descritas en la presente memoria. Una especie de *Bacillus* es muy adecuada para la presente invención, particularmente especies que tienen la capacidad para formar esporas que son relativamente resistentes al calor y otras condiciones, haciéndolas ideales para el almacenamiento (tiempo de conservación) en formulaciones de productos, p. ej., composiciones a base de cereales y para sopa. Debido a las propiedades de tiempo de conservación de las cepas de *Bacillus coagulans* descritas en la presente memoria, la cepa de *Bacillus coagulans* GBI-30 o BC³⁰, Número de Denominación de la ATCC PTA-6086, las formulaciones de productos de la invención no se conservan en la nevera y se pueden almacenar a temperatura ambiente.

La *Bacillus coagulans* de la invención sobrevive a un almacenamiento (tiempo de conservación) de aproximadamente 12 días a aproximadamente 2 años; de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 18 meses; de aproximadamente 3 meses a aproximadamente 1 año; o de aproximadamente 6 meses a aproximadamente 9 meses.

Actividad probiótica antimicrobiana

Los organismos probióticos descritos en la presente memoria, *Bacillus coagulans* cepa GBI-30 o BC³⁰, Número de Denominación de la ATCC PTA-6086, promueven la salud digestiva y apoyan el sistema inmunitario. La capacidad de *Bacillus coagulans* para inhibir diversos patógenos bacterianos se comprobó cuantitativamente mediante el uso de un ensayo in vitro. Este ensayo es parte de un cribado de patógenos bacterianos estandarizado (desarrollado por the U.S. Food and Drug Administration (FDA)) y está disponible comercialmente sobre discos de soporte sólido (DIFCO® BACTROL® Antibiotic Disks). Para realizar el ensayo, se prepararon inicialmente placas de dextrosa de patata (DIFCO®) usando procedimientos estándar. A continuación las placas se inocularon individualmente con las bacterias (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ CFU) para ser probadas a fin de formar un lecho bacteriano confluyente.

La inhibición de microorganismos (p. ej. patógenos gastrointestinales) por *Bacillus coagulans* se comprobó posteriormente al poner aproximadamente $1,8 \times 10^6$ CFU de *Bacillus coagulans* en 10 µl de caldo o tampón, directamente en el centro de la placa de dextrosa de patata, teniendo un emplazamiento de prueba aproximadamente 8 mm de diámetro por placa. Se usó un mínimo de tres emplazamientos de prueba para cada ensayo. El control negativo consistía en un volumen de 10 µl de una solución salina estéril, mientras que el control positivo consistía en un volumen de 1 µl de glutaraldehído. A continuación, las placas se incubaron durante aproximadamente alrededor de 18 h a 30°C, momento en el que se midieron las zonas de inhibición. Según se indica en la presente memoria, "excelente inhibición" significa que la zona tenía 10 mm o más de diámetro; y "buena inhibición" significa que la zona tenía más de 2 mm de diámetro pero menos de 10 mm de diámetro.

Según se esperaba, no se observaba "inhibición" con el control negativo con solución salina y se observaba una excelente "inhibición" (aproximadamente 16,2 mm de diámetro; media de tres pruebas) con el control positivo de glutaraldehído. Para los microorganismos entéricos probados, se encontró la siguiente inhibición por *Bacillus coagulans*: (i) especies de *Clostridium* - excelente inhibición; (ii) *Escherichia coli* - excelente inhibición; (iii) especies de *Clostridium* - excelente inhibición, donde la zona de inhibición tenía constantemente más de 15 mm de diámetro. De forma similar, también se observaba una excelente inhibición para los patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Bacterias entéricas patógenas que eran inhibidas por *Bacillus coagulans* incluyen, pero no se limitan a: *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Streptococcus pyogenes*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli* (especie enterohemorrágica); numerosas especies de *Clostridium* (p. ej., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tributrycum*, *Clostridium sporogenes* y similares); *Gardnereia vaginalis*; *Propionibacterium aenes*; *Aeromonas hydrophilia*; especies de *Aspergillus*; especies de *Proteus* y especies de *Klebsiella*.

Microencapsulación

En un aspecto, las bacterias productoras de ácido láctico se incorporan en un revestimiento de microcápsulas antes de la adición a la composición a base de cereales, usando cualquier procedimiento de microencapsulación bien conocido en la técnica. Las *Bacillus coagulans* aisladas se empaquetan, o encapsulan, dentro de otro material a fin de proteger a las bacterias del entorno circundante. Las cápsulas de la invención varían en tamaño de una milésima de milímetro a siete milímetros. Los ingredientes internos de la microcápsula se liberan de sus envoltas de diversos modos, incluyendo la ruptura mecánica de la pared de la cápsula, disolución de la pared, fusión de la pared y difusión a través de la pared. Así, la microencapsulación proporciona una protección adicional a la bacteria *Bacillus* aislada durante el procesamiento térmico de las composiciones a base de cereales de la invención. Métodos físicos de microencapsulación incluyen revestimiento en plato, revestimiento por suspensión al aire, extrusión centrífuga, tobera vibratoria y secado por pulverización. Métodos químicos de microencapsulación incluyen polimerización interfacial, polimerización in situ y polimerización matricial.

Alternativamente, la bacteria productora de ácido láctico se añade a la composición a base de cereales sin microencapsulación.

Composiciones probióticas a base de cereales y para sopa

La descripción se dirige al descubrimiento sorprendente de que las bacterias productoras de ácido láctico, particularmente especies de *Bacillus*, siguen siendo viables y retienen sus propiedades probióticas beneficiosas en composiciones a base de cereales y para sopa, tales como las preparadas en agua hirviendo. Las composiciones se preparan al combinar materia seca y un líquido, p. ej., agua o leche. En un aspecto, la composición se prepara al combinar materia seca y un líquido, y calentar la combinación resultante. Opcionalmente, la combinación se calienta (termoprocesa) usando calor aplicado, una llama o un microondas. La composición a base de cereales o para sopa se hierve en agua caliente, p. ej., ebullición en placa, adición de agua hirviendo a un recipiente o tratando con microondas la composición a base de cereales o para sopa junto con agua. Preferiblemente, se añade agua hirviendo (aproximadamente 100°C) a una combinación de composición a base de cereales y bacterias *Bacillus coagulans*.

En un aspecto, al menos aproximadamente 5%-25% de las bacterias son viables después del calentamiento, p. ej., al menos aproximadamente 25%-50%; al menos aproximadamente 50% a 75%; o al menos aproximadamente 75%-99% de las bacterias son viables después del calentamiento. Como las recomendaciones dietéticas (RDA o toma diaria recomendada; RDI) son aproximadamente 1×10^9 bacterias (según las directrices de la UE), preferiblemente, la composición a base de cereales o para sopa comprende al menos aproximadamente 1×10^9 bacterias viables después del calentamiento. En otro aspecto, la composición a base de cereales o para sopa comprende al menos aproximadamente de 1×10^6 a 1×10^7 ; al menos aproximadamente de 1×10^7 a 1×10^8 ; o al menos aproximadamente de 1×10^8 a 1×10^9 bacterias viables después del calentamiento.

Las composiciones se formulan en muchas configuraciones, debido a que la bacteria está presente como una célula vegetativa o como una espora, o ambas, dependiendo de la especie y la forma del organismo probiótico. Las células/esporas se formulan en una variedad de composiciones adecuadas para el uso en una composición a base de cereales o para sopa. En un aspecto, la bacteria está presente como una mezcla de esporas y células vegetativas. En otro aspecto, la bacteria está presente como al menos 90% de esporas, p. ej., 95%, 98% o 99% de esporas. Opcionalmente, antes de la adición a las composiciones a base de cereales y para sopa de la invención, las células de *Bacillus coagulans* se cultivan en líquido en ausencia de o con cantidades limitadas de una fuente alimenticia para inducir la esporulación. En otro aspecto, el secado por pulverización con pistola térmica destruye aproximadamente 50%, aproximadamente 75%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o aproximadamente 99% de células vegetativas antes de la adición a las composiciones a base de cereales y para sopa de la invención.

Las composiciones a base de cereales, tales como las descritas en la presente memoria, se elaboran a partir de una variedad de cereales conocidos por los expertos en la técnica. Cereales adecuados incluyen arroz, trigo, maíz, cebada, centeno, avena, alforfón, sorgo, mijo, triticale, fonio y quínoa. Otros tipos de cereales usados para elaborar las composiciones a base de cereales de la invención incluyen tef, arroz salvaje y trigo duro.

La invención proporciona pasta mejorada con probióticos, p. ej., *Bacillus coagulans* aislada y pasta. Pasta es un nombre genérico para variantes italianas de tallarines, alimento elaborado a partir de una masa de harina, agua y/o huevos. La pasta se cocina en agua caliente/agua hirviendo antes del consumo. Los organismos probióticos descritos en la presente memoria, p. ej., *Bacillus coagulans* cepa GBI-30 o BC³⁰, Número de Denominación de la ATCC PTA-6086, sobreviven singularmente a los procedimientos rigurosos de fabricación y cocción de las composiciones a base de cereales y para sopa. En un aspecto, la pasta es el ingrediente principal, servido con salsa o aderezos. Las variedades comunes de pasta incluyen pasta tubular, pasta cilíndrica redondeada recta, pasta en cinta, micropasta, pasta rellena y pasta de forma irregular. Pastas ejemplares incluyen espagueti (cilindros delgados sólidos), macarrones (tubos o cilindros huecos), fusilli (forma helicoidal), lasaña (hojas), tagliatelle (cintas planas),

vermicelli (espagueti fino) y ravioli (pasta rellena). Otras pastas adecuadas incluyen penne (pasta en forma cilíndrica), rotini (pasta en forma de sacacorchos) y rigatoni (pasta en forma de tubo). En Italia, los penne se producen en dos variantes: "penne lisce" (liso) y "penne rigate" (estriado), teniendo el último rebordes sobre cada tallarín. Otros dos tallarines, ñoqui y spätzle, a veces se consideran pasta debido a que son tradicionales en Italia; sin embargo, sus distribuciones "naturales" (y quizá sus orígenes) están fuera de Italia y estos tallarines tienen más en común con las bolas de masa ("dumplings") que con la pasta típica. Los dos estilos básicos de pasta son deshidratada y fresca. La pasta deshidratada tiene una textura más firme y más densa cuando se cuece y es adecuada para salsas espesas, con carne o aceitosas. La pasta fresca tiene una textura más suave y más absorbente y es adecuada para salsas mantecosas o cremosas o salsas con sabores delicados. También hay variaciones en los ingredientes usados en la pasta. El tiempo durante el que la pasta se puede almacenar varía de días a años dependiendo de si la pasta se elabora con huevo o no, y si es deshidratada o fresca.

Se usan muchos ingredientes para elaborar masa para pasta, que varían de una mezcla simple de harina y agua a los que requieren la adición de huevos, especias y quesos, o incluso tinta de calamar, a la masa. Opcionalmente, la pasta contiene un relleno, p. ej., queso, hortalizas, frutas y/o carne. En un aspecto, la pasta seca se elabora a partir de harina o sémola de trigo duro. La harina de trigo duro tiene un matiz de color amarillo. Alternativamente, la pasta seca se elabora de otros tipos de harina (tales como maicena), que da un producto más suave. Variedades particulares de pasta también pueden usar otros cereales y/o métodos de molienda para elaborar la harina. Algunas variedades de pasta, tales como Pizzoccheri, se elaboran de harina de alforfón. Diversos tipos de pasta incluyen huevos (pasta al huevo). A menudo los ñoqui se consideran platos de pasta, aunque son bastante diferentes en los ingredientes (principalmente patatas molidas).

En un aspecto, bacteria *Bacillus coagulans* en la forma de un polvo secado por pulverización se incluye en o sobre la superficie de la composición probiótica a base de cereales descrita en la presente memoria. Preferiblemente, la *Bacillus coagulans* aislada está en la forma de una espora. Las *Bacillus coagulans* aisladas son al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% esporas puras. Alternativamente, la *Bacillus coagulans* aislada está en la forma de una célula vegetativa. En un aspecto, las *Bacillus coagulans* aisladas son al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de células vegetativas puras. En otro aspecto, la *Bacillus coagulans* aislada está en la forma de una mezcla de células vegetativas y esporas. La mezcla de *Bacillus coagulans* es 90% de esporas, 10% de células vegetativas; 75% de esporas, 25% de células vegetativas; 60% de esporas, 40% de células vegetativas; 50% de esporas, 50% de células vegetativas; 60% de células vegetativas, 40% de esporas; 75% de células vegetativas; 25% de esporas; o 90% de células vegetativas, 10% de esporas.

El agente activo aislado de *Bacillus* y/o *Bacillus coagulans* se aplica usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos incluyendo, por ejemplo, aplicar un polvo, secar por pulverización el probiótico sobre la composición a base de cereales o embeber la composición en una solución que contiene el probiótico. Opcionalmente, la bacteria *Bacillus* se añade a la masa y se seca en el producto (p. ej., pasta). En otro aspecto, la bacteria *Bacillus coagulans* en la forma de un polvo secado por pulverización se añade directamente a la propia composición a base de cereales. En otro aspecto más, maltodextrina junto con la bacteria *Bacillus coagulans* en la forma de un polvo secado por pulverización se añade directamente a la propia composición a base de cereales. Opcionalmente, aproximadamente 5×10^7 CFU de bacteria *Bacillus coagulans* (por gramo de matriz de alimento) en la forma de un polvo secado por pulverización junto con maltodextrina se añade directamente a la propia composición alimentaria.

Se puede usar cualquiera de una variedad de métodos para poner la composición bacteriana en una composición a base de cereales. Sin embargo, métodos preferidos incluyen un método de "secado por pulverización" en el que las composiciones se exponen en una cámara de baja humedad a una mezcla atomizada que contiene una composición líquida, donde la cámara se expone posteriormente a aproximadamente 26,7-43,3°C (80-110°F) para secar el líquido, impregnando de ese modo el material de la composición a base de cereales con los componentes.

Una concentración típica es de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^{12} CFU; 1×10^8 a 1×10^{11} CFU; o 1×10^9 a 1×10^{16} CFU de bacterias viables o esporas/g de matriz de alimento. Después del secado, el alimento está listo para el uso inmediato o para el almacenamiento en un envase estéril, p. ej., un envase de 88,7 ml (3 onzas), un envase de 177,4 ml (6 onzas), un envase de 266,2 ml (9 onzas), un envase de 354,9 ml (12 onzas), un envase de 443,6 ml (15 onzas), un envase de 532,3 ml (18 onzas) o un envase de 709,8 ml (24 onzas).

Los ingredientes activos (es decir, bacterias vivas o componentes extracelulares) comprenden entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 10%; 0,01% y aproximadamente 1%; o aproximadamente 0,05% y aproximadamente 0,1% en peso de la composición probiótica a base de cereales. Opcionalmente las *Bacillus coagulans* aisladas comprenden de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g; de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g; o de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg en peso de la composición probiótica. Lo más preferiblemente, la cantidad de bacterias *Bacillus coagulans* es aproximadamente 5×10^7 unidades formadoras de colonias (CFU) de bacterias por gramo de matriz de alimento.

En un aspecto, la cantidad de bacterias es de aproximadamente 10^4 a 10^{14} unidades formadoras de colonias (CFU) de bacterias por gramo de composición probiótica (es decir, células vegetativas y/o esporas bacterianas), preferiblemente de 10^5 a 10^{13} CFU/g de matriz de alimento. Alternativamente, las concentraciones son de 10^8 a 10^{13}

CFU/g; de 10^9 a 10^{12} CFU/g; o de 10^{10} a 10^{11} CFU/g de matriz de alimento. En un aspecto, la cantidad de bacterias es aproximadamente 1×10^6 CFU por gramo de matriz de alimento. La cantidad real en una composición a base de cereales o para sopa variará dependiendo de las cantidades de composición que se van a dispersar en la composición alimentaria y de las vías de dispersión.

En un aspecto, la invención proporciona el almacenamiento de la composición a base de cereales en un envase estéril a temperatura ambiente antes del consumo. Alternativamente, la composición se consume inmediatamente.

En otro aspecto, la composición comprende al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% de esporas de *Bacillus coagulans* aisladas.

A modo de ejemplo, y no de limitación, se pueden incorporar esporas de *Bacillus coagulans* en cualquier tipo de producto seco o liofilizado que se disuelva o se mezcle con agua caliente, con tal de que la temperatura de la mezcla que contiene esporas de *Bacillus coagulans* se eleve hasta la temperatura de choque térmico requerida (es decir, 80°C durante 5 minutos) necesaria para la germinación de las esporas. Las esporas de *Bacillus coagulans* bien pueden ser incorporadas en el producto seco o liofilizado por el fabricante del producto o bien por el consumidor durante la preparación. Estos productos secos o liofilizados incluyen, pero no se limita a: pasta. Posteriormente, la composición a base de cereales se hierva en agua caliente, p. ej., ebullición en placa, adición de agua hirviendo a un recipiente o tratamiento con microondas de la composición a base de cereales junto con agua.

En un aspecto, las esporas de *Bacillus coagulans* sobreviven al almacenamiento (tiempo de conservación), es decir, retienen la viabilidad o la capacidad para germinar en condiciones fisiológicas (p. ej., ingestión), de aproximadamente 12 días a aproximadamente 2 años; de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 18 meses; de aproximadamente 3 meses a aproximadamente 1 año; o de aproximadamente 6 meses a aproximadamente 9 meses.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de cultivos de *Bacillus coagulans* (Fuera del alcance de las reivindicaciones)

Bacteria *Bacillus coagulans* Hammer (Nº Registro ATCC 31284) se inoculó y se hizo crecer hasta una densidad celular de aproximadamente 10^8 a 10^9 células/ml en caldo nutritivo que contiene 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 10-30 mg de MnSO_4 y 1.000 ml de agua destilada, se ajustó hasta pH 7,0, usando un recipiente de fermentación de extracción por aire estándar a 30°C . El intervalo de MnSO_4 aceptable para la esporulación es 1 mg/l a 1 g/l. Las células vegetativas se pueden reproducir activamente hasta 45°C y las esporas son estables hasta 90°C . Después de la fermentación, las células o esporas bacterianas de *B. coagulans* se recogen usando métodos estándar (p. ej., filtración, centrifugación) y las células y esporas recogidas se pueden liofilizar, secar por pulverización, secar al aire o congelar. Según se describe en la presente memoria, el sobrenadante del cultivo celular se recoge y se usa como un agente extracelular secretado por *B. coagulans*.

Un rendimiento típico del cultivo anterior está en el intervalo de aproximadamente 10^9 a 10^{10} esporas viables y más típicamente aproximadamente 100 a 150 miles de millones de células/esporas por gramo antes de secar. Las esporas mantienen al menos 90% de viabilidad después de secar cuando se almacenan a temperatura ambiente durante hasta diez años y así el tiempo de conservación eficaz de una composición que contiene esporas de *B. coagulans* Hammer a temperatura ambiente es aproximadamente 10 años.

Ejemplo 2: Preparación de esporas de *Bacillus coagulans* (Fuera del alcance de las reivindicaciones)

Un cultivo de esporas de *B. coagulans* deshidratadas se preparó como sigue. Diez millones de esporas se inocularon en un cultivo de un litro que contenía 24 g de caldo de dextrosa de patata, 10 g de material digerido enzimático de tejido de pollo y pescado, 5 g de FOS y 10 g de MnSO_4 . El cultivo se mantuvo durante 72 horas bajo un ambiente alto en oxígeno a 37°C para producir un cultivo que tenía aproximadamente 150 miles de millones de células por gramo de cultivo. Posteriormente, el cultivo se filtró para retirar el líquido del medio de cultivo y la pella bacteriana se resuspendió en agua y se secó por congelación. A continuación, el polvo secado por congelación se tritura hasta un polvo fino usando prácticas correctas de fabricación (GMP).

Ejemplo 3: Las esporas de *Bacillus coagulans* sobreviven en el ambiente gástrico (Fuera del alcance de las reivindicaciones)

Este estudio se realizó a fin de determinar el grado de supervivencia de esporas de *Bacillus coagulans* a medida que traspasan el estómago. Muestras de esporas de *Bacillus coagulans* se sometieron a un ambiente gástrico simulado para variar los espacios de tiempo a fin de obtener su grado de supervivencia. En primer lugar, se preparó una muestra homogénea de materia prima *Bacillus coagulans* de al menos 12 gramos. Se preparó solución salina a pH 1

usando HCl 3 N (150 ml cada una en seis botellas de 250 ml de medio) y se esterilizó. Se prepararon de forma similar soluciones salinas adicionales con pH 2 y 3, dando como resultado 6 botellas de 250 ml estériles, que contenía cada una 150 ml de solución salina con pH ajustado. Se prepararon y se esterizaron seis botellas de 250 ml de medio estéril que contenían cada una 150 ml de solución salina normal. Se preparó tampón de fosfato (□400 ml) a pH 7,2. Se prepararon y esterizaron tubos de ensayo (24), que contenían cada uno 9 ml de tampón de fosfato pH 7,2. Se prepararon tubos de ensayo (120), que contenían cada uno 9 ml de solución salina normal. Se preparó medio GYE (glucosa-extracto de levadura)-agar y se esterilizó y se enfrió hasta 45°C en un baño de agua. Muestras (24) de materia prima se pesaron, cada una □500 miligramos (teóricamente equivalentes 10 mil millones de esporas). Las muestras se añadieron a botellas de medio a 37°C y se incubaron la mitad durante 20 minutos y la otra mitad durante 120 minutos. Después de 20 y 120 minutos de incubación, respectivamente, las muestras se mezclaron hasta uniformidad y se pipeteó 1 ml en 9 ml de tampón de fosfato estéril pH 7,2. Después de que las 12 muestras de cada punto temporal se pusieron en tubos de ensayo que contenían tampón de fosfato estéril, se realizaron diluciones en serie hasta que se hubieron usado 6 tubos para cada muestra. La dilución final para los dos tubos de ensayo finales era 3×10^7 y 3×10^8 , lo que daba un recuento de alrededor de 300 y 30 CFU, respectivamente. Los 2 tubos de ensayo finales de cada muestra se pusieron en un baño de agua a 70°C durante 30 minutos. Después de 30 minutos, se enfriaron inmediatamente hasta 45°C. Se dispusieron tres placas de Petri estériles por tubo. Se añadieron 1,0 ml del tubo termotratado a cada placa de Petri, a continuación se vertieron 15 ml de medio de GYE-agar fundido estéril (a 45°C) en cada una de las placas de Petri y se mezclaron a fondo. Cuando se solidificaban, las placas se incubaban en una posición invertida durante 48 horas a 40°C. Se contaron las colonias individuales. Los resultados se expresaron como CFU por gramo según se muestra en la Tabla 1 posteriormente. $1,0E+10 = 1 \times 10^{10}$.

Tabla 1.

Muestra	20 Minutos de Incubación Recuento de Esporas, CFU/gramo	120 Minutos de Incubación Recuento de Esporas, CFU/gramo
Solución Salina Normal - A	1,90E+10	1,88E+10
Solución Salina Normal - B	2,12E+10	2,00E+10
Solución Salina Normal - C	1,64E+ 10	2,06E+10
Promedio	1,89E+10	1,98E+10
Solución salina pH 1,0 - D	2,08E+09	5,98E+07
Solución salina pH 1,0 - E	1,47E+09	0,00E+00
Solución salina pH 1,0 - F	3,59E+09	0,00E+00
Promedio	2,38E+09	1,99E+07
Solución salina pH 2,0 - G	3,63E+09	3,46E+09
Solución salina pH 2,0 - H	4,47E+09	2,48E+09
Solución salina pH 2,0 - I	3,58E+09	2,82E+09
Promedio	3,89E+09	2,92E+09
Solución salina pH 3,0 - J	1,65E+10	1,13E+10
Solución salina pH 3,0 - K	1,35E+10	1,11E+10
Solución salina pH 3,0 - L	1,80E+10	1,39E+10
Promedio	1,60E+10	1,21E+10

25 Ejemplo 4: *Bacillus coagulans* retienen la viabilidad en ñoqui (pasta de patata)

El propósito del siguiente estudio era determinar el grado de supervivencia de GBI-30 (*Bacillus coagulans*-30; BC³⁰) en ñoqui (pasta de patata) después de la cocción y la pasteurización. BC³⁰ se mezcló en ñoqui (pasta de patata) a la dosis de 5×10^7 CFU/g de matriz de alimento, se secó por pulverización y se hirvió en agua a 100°C durante 1 minuto y 30 segundos. Posteriormente, la pasta de patata se pasteurizó durante 1 hora y 20 minutos a 95°C. Después de la pasteurización, la pasta de patata se coció a 100°C durante 1 minuto y 30 segundos para simular una cocción doméstica. La pasta se almacenó a 4°C durante 30 días (el tiempo de conservación es 60 días), se sometió

a choque térmico a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 5 minutos y se puso en medio de GYE-agar. Los resultados demuestran que aproximadamente $1,3 \times 10^7$ CFU de *Bacillus coagulans* por gramo de matriz de alimento sobrevivían después de un almacenamiento durante aproximadamente 30 días. Se observaron resultados comparables después del choque térmico (termiz.), sugiriendo que, después del procedimiento de cocción, la pasta comprende principalmente esporas y pocas células vegetativas de *Bacillus coagulans*. La pasta de patata se envasó en una atmósfera modificada. La actividad de agua (A_w) de la composición era aproximadamente 0,95%. Los datos de la Figura 1 muestran que, después de la prebullición, la pasteurización y la cocción, la cantidad de BC³⁰ en la pasta de patata era 3×10^6 CFU/g de matriz de alimento, sugiriendo que la dosis diaria aproximada de probióticos en 100 g de ñoqui es aproximadamente $1,3 \times 10^9$ CFU o 100% de RDA (mil millones de células viables es la dosis recomendada en las directrices de la UE).

Ejemplo 5: *Bacillus coagulans* retienen viabilidad en pasta fresca al huevo

Este estudio se realizó a fin de determinar el grado de supervivencia de GBI-30 (*Bacillus coagulans*-30; BC³⁰) en pasta fresca al huevo después de la pasteurización. BC³⁰ se mezcló en la pasta fresca al huevo con relleno de queso, hortalizas y carne a la dosis de 5×10^7 CFU/g de matriz de alimento. Posteriormente, la pasta fresca al huevo se secó por pulverización y se pasteurizó durante aproximadamente 5 minutos a 100°C. El tiempo de conservación de la pasta fresca al huevo era de 50 días. La pasta se envasó en una atmósfera modificada. La actividad de agua (A_w) de la composición era aproximadamente 0,92-0,97%. Los resultados ilustrados en la Figura 2 demuestran que aproximadamente 2×10^7 CFU de BC³⁰ sobrevivían a la pasteurización descrita anteriormente, indicando que *Bacillus coagulans* retienen la viabilidad en la pasta fresca al huevo.

Ejemplo 6: Supervivencia de *Bacillus coagulans* termoactivadas (Fuera del alcance de las reivindicaciones)

Se determinó la capacidad de GBI-30 (*Bacillus coagulans*-30; BC³⁰) en harina de avena para sobrevivir al calentamiento a través de microondas. La Tabla 2 demuestra que aproximadamente 82% de las BC³⁰ solas sobrevivían al tratamiento con microondas durante 1 minuto y 50 segundos. Según se muestra en la Tabla 2, aproximadamente 79% de las bacterias *Bacillus coagulans* iniciales en harina de avena sobrevivían después del tratamiento con microondas durante 1 minuto y 50 segundos, sugiriendo que *Bacillus coagulans* retienen la viabilidad en harina de avena después de la cocción. La Tabla 2 muestra la supervivencia de BC30 después del tratamiento térmico bajo diversas condiciones.

Tabla 2.

Descripción de la Muestra	Método de Prueba	CFU/Espec	Tamaño de Muestra	de	Recuento Total	% de Espec
A: BC30, termoactivación	Recuento de Placa Total	11900000000	1 g		11900000000	100%
B: BC30, microondas	Recuento de Placa Total	11900000000	1 g		9750000000	82%
C: BC30+harina de avena, microondas	Recuento de Placa Total	11900000000	1 g		9350000000	79%

A: 1 g de BC30 + 10 ml de agua, 75°C 30 min, enfriado hasta 45°C, dilución en serie, recuento de placa total.
 B: 1 g de BC30 + 250 ml de agua, microondas 1 min 50 segundos, dilución en serie, recuento de placa total.
 C: 1 g de BC30 + 1 porción de harina de avena (35,6 g) + 250 ml de agua, microondas 1 min 50 segundos, dilución en serie, recuento de placa total.

Ejemplo 7: *Bacillus coagulans* en mezcla seca para sopa Turtle Island (Fuera del alcance de las reivindicaciones)

El probiótico *Bacillus coagulans* de la invención se añadió a mezcla seca para sopa Turtle Island en la cantidad indicada en la Tabla 3. La Tabla 3 es un diagrama que indica el número de unidades formadoras de colonias (CFU) de BC³⁰ por porción de mezcla seca para sopa.

Tabla 3.

	Descripción de la Muestra	Peso/porción	Cantidad de BC 30	CFU/porción
1	Mezcla Seca para Sopa	38,2 gramos	0,02 gramos	$2,81 \times 10^8$
2	Mezcla Seca para Sopa	38,3 gramos	0,02 gramos	$2,26 \times 10^8$
3	Mezcla Seca para Sopa	39,1 gramos	0,5 gramos	$7,05 \times 10^9$

Ejemplo 8: *Bacillus coagulans* retienen viabilidad en pasta de sémola de trigo duro

5 El propósito del siguiente estudio era determinar el grado de supervivencia de GBI-30 (*Bacillus coagulans*-30; BC³⁰) en pasta de sémola de trigo duro después de la cocción. BC³⁰ se mezcló en la pasta de sémola de trigo duro a una
 10 dosis de aproximadamente 4×10^8 CFU/porción (aproximadamente 7×10^6 CFU/g de matriz de alimento (aproximadamente 30 mg de BC³⁰); el tamaño de la porción es aproximadamente 56 gramos). La composición se extruyó a 37-38°C, seguido por 20 horas de secado a 50°C. La Tabla 4 muestra la supervivencia de BC³⁰ después de la fabricación de pasta seca y después de cocer la pasta seca a través de ebullición durante aproximadamente 8 minutos. Los resultados mostrados en la Tabla 4 demuestran que aproximadamente 55% de BC³⁰ sobreviven al procedimiento de fabricación, mientras que aproximadamente 30% de BC³⁰ sobreviven al procedimiento de cocción, indicando que *Bacillus coagulans* BC³⁰ retienen viabilidad en pasta de sémola de trigo duro.

Tabla 4.

Descripción de la Muestra	CFU/Espec	Tamaño de la Muestra	Recuento Total	% de Espec
Pasta seca (no cocida)	4×10^8	56 g	$2,2 \times 10^8$	55%
Pasta seca (cocida)	4×10^8	56 g	$1,2 \times 10^8$	30%

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición alimentaria que comprende un cereal y una célula vegetativa o espora de *Bacillus coagulans*, en donde dicha composición comprende pasta y en donde dicha *Bacillus coagulans* es la cepa GBI-30 (Número de Denominación de la ATCC PTA-6086).
2. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha pasta se selecciona del grupo que consiste en espagueti, lasaña, pasta al huevo, spätzle, penne rigate, rotini, rigatoni y ñoqui.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha *Bacillus coagulans* comprende entre 0,01% y 10% en peso de dicha composición.
4. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición alimentaria es una composición cocida.
- 15 5. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha *Bacillus coagulans* está en la forma de una espora.
6. La composición según la reivindicación 5, en la que dichas esporas de *Bacillus coagulans* se activan al entrar en contacto con líquido caliente.
- 20 7. La composición según la reivindicación 6, en la que dicho líquido caliente es agua o leche.
8. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha *Bacillus coagulans* está en la forma de una célula vegetativa.
- 25 9. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha *Bacillus coagulans* está en la forma de una mezcla de células vegetativas y esporas.

Figura 1.

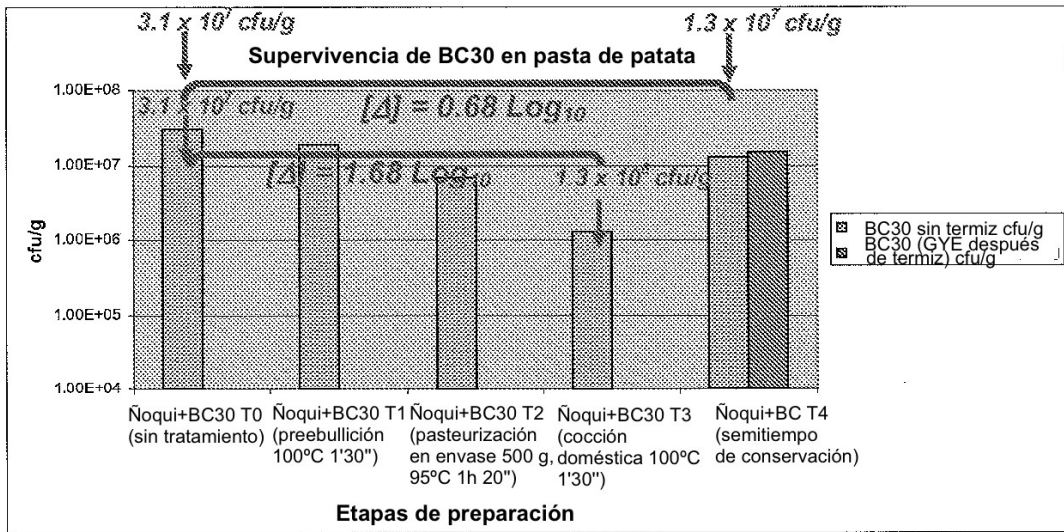


Figura 2

