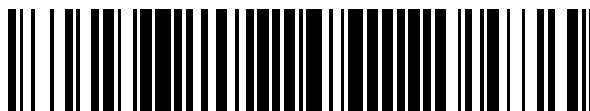


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 837**

51 Int. Cl.:

A23K 10/18 (2006.01)

A23K 50/40 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2011 PCT/EP2011/069209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12059499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2011 E 11781488 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2635132**

54 Título: **Proceso de producción de una preparación alimentaria para animales de compañía que contiene microorganismos probióticos**

30 Prioridad:

05.11.2010 EP 10190118

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**MERCENIER, ANNICK;
PRIOULT, GUÉNOLÉE y
NUTTEN, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 623 837 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

Proceso de producción de una preparación alimentaria para animales de compañía que contiene microorganismos probióticos

5 La presente invención se refiere al campo de los alimentos para animales de compañía. En particular, la presente invención proporciona un método para preparar composiciones alimentarias para animales de compañía que comprenden microorganismos probióticos no replicativos. Estos microorganismos probióticos no replicativos son microorganismos probióticos bioactivos tratados con calor.

10 Los beneficios para la salud de los probióticos son aceptados en la técnica y se resumen, por ejemplo, en Blum *et al.* en Curr. Issues Intest. Microbiol., septiembre 2003, 4(2):53-60. A menudo los probióticos se administran junto con prebióticos en formulaciones simbióticas que pueden tener beneficios para la salud potenciados aún mayores.

15 El bienestar de los animales domésticos está muy relacionado con su alimentación. Una alimentación correcta debería dar como resultado un animal de compañía sano y en forma. Además de proporcionar un valor nutricional, la composición de la alimentación influye en el equilibrio de la microflora intestinal y puede conducir a trastornos gastrointestinales o, por el contrario, a su prevención. Por tanto, el conocimiento de los procesos de la digestión y del tracto gastrointestinal es esencial para la comprensión de una costumbre alimentaria práctica.

20 A menudo, los trastornos gastrointestinales caninos y felinos están relacionados con un sobrecrecimiento bacteriano y con la producción de enterotoxinas producidas por bacterias patógenas.

25 Durante los últimos años, las investigaciones se han centrado en algunas cepas valiosas de bacterias de ácido láctico y su uso potencial como agentes probióticos. Los probióticos se consideran preparaciones microbianas viables que estimulan la salud en mamíferos conservando la microflora natural en el intestino. Se cree que los probióticos se unen a la mucosa intestinal, colonizan el tracto intestinal y, con ello, evitan la unión de microorganismos perjudiciales. Un prerrequisito para su acción reside en el hecho de que deben alcanzar la mucosa del intestino en una forma adecuada y viable y, en especial, en que no sean destruidos por la influencia del pH bajo que predomina en el estómago. En particular, la fisiología del tracto digestivo de gatos y perros se diferencia de la de los seres humanos. Por ejemplo, el pH promedio en el estómago es de 3,4 en perros y 4,2 en gatos.

35 La patente de EE. UU. 7189390 describe nuevos microorganismos bacterianos de ácido láctico que se han aislado y seleccionado por su potencial probiótico, y su uso para la preparación de composiciones alimentarias para animales de compañía previstas para mejorar la salud de los animales de compañía.

40 El documento US 2005/180962 describe formulaciones que comprenden bacterias probióticas inactivadas y métodos de tratamiento que emplean las formulaciones, en las que se ha descubierto que las bacterias probióticas inactivadas por irradiación son eficaces para tratar enfermedades infecciosas.

El documento US 2005/175598 describe el uso de una bifidobacteria probiótica para la preparación de composiciones previstas para mantener o mejorar la salud de los animales de compañía.

45 El documento US 2009/274661 describe el uso de una cepa probiótica específica de *B. longum*, concretamente *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, para el tratamiento o la prevención o la reducción de la inflamación en un mamífero.

50 Puesto que hasta 70% del sistema inmunológico está contenido dentro del tracto digestivo de los animales, los probióticos no solo ayudan a la salud digestiva del animal, sino al sistema inmunológico completo de un animal de compañía.

55 Se sabe que las bacterias probióticas son capaces de adherirse a las células intestinales y excluir a las bacterias patógenas de las células intestinales. Para poder ejercer esta actividad, las bacterias probióticas deben mantenerse viables en el producto hasta que este sea consumido. La adición de bacterias vivas a gránulos para animales de compañía, de modo que se mantengan viables hasta que el producto se consuma y las bacterias lleguen viables al tracto intestinal, sigue siendo desafío, y para lograrlo es necesario un esfuerzo técnico significativo.

60 Resultaría deseable disponer de una composición de un alimento para animales de compañía que pueda ofrecer beneficios probióticos incluso después de estar almacenada durante mucho tiempo bajo condiciones críticas para los probióticos, al mismo tiempo que sea sencilla de preparar. Se prefiere que esto se logre empleando ingredientes naturales que sean seguros de administrar y no tengan efectos secundarios y que sean fáciles de incorporar en composiciones alimentarias para animales de compañía empleando técnicas industriales que se emplean en la actualidad.

65 También sería deseable mejorar aún más el efecto reforzador inmunológico de los probióticos en dichas preparaciones.

También sería deseable mejorar aún más el efecto antiinflamatorio de los probióticos en dichas preparaciones.

Los presentes inventores han abordado estas necesidades. Por tanto, el objetivo de la presente invención es mejorar el estado actual de la técnica y proporciona un método para preparar composiciones alimentarias para animales de compañía que satisfagan las necesidades expresadas anteriormente.

Los presentes inventores se sorprendieron cuando comprobaron que podían alcanzar este objetivo por medio del contenido de la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes desarrollan más a fondo la idea de la presente invención.

Por consiguiente, los presentes inventores proponen un método para proporcionar una composición de un alimento para animales de compañía que comprende microorganismos probióticos no replicativos.

La invención se dirige a un método para preparar una composición de un alimento para animales de compañía que comprende microorganismos probióticos no replicativos en una cantidad correspondiente a 10^6 a 10^{12} cfu por ración, y dicho método comprende tratar los microorganismos probióticos con un tratamiento a alta temperatura/corta duración ("*high temperature/short time*", HTST) a una temperatura de 120 a 140 °C durante 1 a 30 segundos o un tratamiento a temperatura ultra-alta ("*ultra-high temperature*", UHT) a una temperatura que supera 135 °C durante 1 a 10 segundos, lo cual provoca que al menos el 90% de los microorganismos se transformen en no replicativos.

En una realización del método, dicha composición de un alimento para animales de compañía comprende del 4 al 40% en peso seco de grasas, del 12 al 70% en peso seco de hidratos de carbono y del 12 al 50% en peso seco de proteínas.

En una realización del método, dicha composición de un alimento para animales de compañía comprende del 10 al 20% en peso seco de grasas, del 30 al 60% en peso seco de hidratos de carbono y del 20 al 35% en peso seco de proteínas.

En una realización del método, dicha composición de un alimento para animales de compañía comprende además del 0,5 al 40% en peso seco, preferiblemente del 0,5 al 30% en peso seco, más preferiblemente del 1 al 20% en peso seco, y lo más preferiblemente del 1 al 10% en peso seco de fibra dietética.

En una realización del método, la composición de un alimento para animales de compañía se selecciona del grupo que consiste en alimentos para animales de compañía, dietas nutricionales para animales de compañía, complementos para animales de compañía, recompensas para animales de compañía y juguetes comestibles para animales de compañía, tales como juguetes que se pueden morder y comer.

En una realización del método, dicha composición de un alimento para animales de compañía comprende además prebióticos, por ejemplo, oligofructosa e inulina.

En una realización del método, el tratamiento con calor de dicha composición de un alimento para animales de compañía es un tratamiento a temperatura ultra-alta (UHT) que implica calentar la composición durante un corto periodo de tiempo de 1 a 10 segundos a una temperatura que supera 135 °C.

En una realización del método, en dicha composición de un alimento para animales de compañía al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99%, lo más preferiblemente al menos 99,5% y del modo más ideal todos los probióticos no son replicativos.

En una realización del método, los microorganismos probióticos se seleccionan del grupo que consiste en bifidobacterias, lactobacilos, propionibacterias o sus combinaciones, por ejemplo, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetyllactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y/o sus mezclas.

En una realización del método, los microorganismos probióticos se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* NCC 3001 (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium longum* NCC 2705 (CNCM I-2618), *Bifidobacterium breve* NCC 2950 (CNCM I-3865), *Bifidobacterium lactis* NCC 2818 (CNCM I-3446), *Lactobacillus johnsonii* La 1 (CNCM I-1225), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007 (CGMCC 1.3274), *Lactobacillus reuteri* DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059 (CNCM I-4153), *Lactobacillus casei* NCC 1825 (ACA-DC 6002), *Escherichia coli* Nissle (DSM 6601), *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 (CNCM I-1198), *Lactococcus lactis* NCC 2287 (CNCM I-4154), o sus combinaciones.

En una realización del método, dicha composición alimentaria para animales de compañía contiene de 0,005 mg a 1000 mg de microorganismos no replicativos por dosis diaria.

5 Las composiciones alimentarias para animales de compañía comprenden una diversidad de composiciones, por ejemplo, alimentos, dietas nutricionales, complementos, recompensas y juguetes comestibles, tales como juguetes que se pueden morder y comer.

10 Los animales de compañía incluyen animales domésticos, tales como perros, gatos, pájaros, conejos, cobayas, cabras, vacas, caballos, cerdos, por ejemplo.

15 Las composiciones pueden ser alimentos con cualquier forma adecuada, por ejemplo, alimentos líquidos o sólidos. Cuando los alimentos son alimentos líquidos, los microorganismos probióticos no replicativos pueden mezclarse con los alimentos. Cuando los alimentos son alimentos sólidos, los microorganismos probióticos no replicativos pueden revestirse sobre los alimentos, incorporarse a los alimentos, o ambos. Cuando se revisten o se incorporan en los alimentos, los microorganismos probióticos no replicativos pueden dispersarse de modo homogéneo o no homogéneo dentro de los alimentos o sobre ellos.

20 Las composiciones alimentarias para animales de compañía generalmente contienen una fracción de hidratos de carbono, una fracción de proteínas y una fracción de grasas.

Los porcentajes, a menos que se indique lo contrario, son porcentajes en peso sobre una base de material seca.

25 La composición alimentaria para animales de compañía comprende preferiblemente del 12% al 70%, preferiblemente del 16% al 65%, más preferiblemente del 20% al 60%, lo más preferiblemente del 30% al 60% de una fracción de hidratos de carbono ; del 12% al 50%, preferiblemente del 16% al 45%, más preferiblemente del 18% al 40%, lo más preferiblemente del 20% al 35% de una fracción de proteínas; y del 4% al 40%, preferiblemente del 6% al 30%, más preferiblemente del 8% al 25%, lo más preferiblemente del 10% al 20% de una fracción de grasas.

30 Para algunas composiciones alimentarias para animales de compañía, por ejemplo, recompensas para animales de compañía, las composiciones pueden contener del 1 al 12% de grasas, generalmente en forma de un revestimiento para potenciar la palatabilidad.

35 La composición alimentaria para animales de compañía también puede comprender fibra dietética del 0,5% al 40%, preferiblemente del 0,5% al 30%, más preferiblemente del 1% al 20%, y lo más preferiblemente del 1% al 10%

40 Pueden añadirse agentes de equilibrio nutricional (es decir, vitaminas, minerales, oligoelementos y sus combinaciones). Generalmente, dichos agentes de equilibrio nutricional pueden añadirse en una cantidad del 0,01% al 15%, preferiblemente del 0,05% al 10%, más preferiblemente del 1% al 5%, y lo más preferiblemente del 1% al 3%

45 Las cantidades adecuadas específicas para cada ingrediente en una composición dependerán de una diversidad de factores, tales como la especie del animal que consume la composición; los ingredientes concretos incluidos en la composición; la edad, el peso, la salud general, el sexo y la dieta del animal; la velocidad de consumo del animal; y similares. Así, las cantidades de los ingredientes pueden variar mucho e incluso pueden desviarse de las proporciones indicadas en la presente. La selección de dichos componentes y cantidades de los componentes está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. Para algunos animales de compañía, tales como perros y gatos, American Feed Control Officials (AAFCO) proporciona unas cantidades recomendadas de dichos ingredientes.

50 La fuente de proteínas del alimento puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, tales como plantas, animales o ambos. La proteína animal incluye carne, productos cárnicos, lácteos y huevos. Las carnes incluyen, carne de ave, de pescado y de animales, tales como, ganado vacuno, porcino, ovino, caprino y similar. Los productos cárnicos incluyen pulmones, riñones, cerebro, hígado, estómago e intestinos. El ingrediente de proteínas del alimento también puede contener aminoácidos libres y/o péptidos. Preferiblemente, el ingrediente de proteínas del alimento comprende carne, productos cárnicos, lácteos o huevos.

60 La fuente de grasas y de hidratos de carbono del alimento puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, tales como grasa animal, aceite de pescado, aceite vegetal, carne, productos cárnicos, cereales, otras fuentes animales o vegetales, y sus mezclas. Los cereales incluyen trigo, maíz, cebada y arroz.

El ingrediente de fibra del alimento puede obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, tales como fuentes de fibra vegetal, por ejemplo, celulosa, pulpa de remolacha, cáscaras de cacahuete y fibra de soja.

65 En concreto, cuando la composición es un alimento para animales, las vitaminas y los minerales preferiblemente se incluyen en las cantidades necesarias para evitar deficiencias y mantener la salud. Estas cantidades pueden

consultarse en la técnica. El National Research Council (NRC) proporciona cantidades recomendadas de dichos ingredientes para animales de granja. Véase, por ejemplo, Nutrient Requirements of Swine (10ª edición revisada, Nat'l Academy Press, Wash. D.C., 1998), Nutrient Requirements of Poultry (9ª edición revisada, Nat'l Academy Press, Wash. D.C., 1994), Nutrient Requirements of Horses (5ª edición revisada, Nat'l Academy Press, Wash. D.C., 1989), etc. American Feed Control Officials (AAFCO) proporciona unas cantidades recomendadas de dichos ingredientes para perros y gatos. Véase American Feed Control Officials, Inc., publicación oficial, pp. 126-140 (2003). Las vitaminas que, en general, son útiles como aditivos alimentarios incluyen vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina H (biotina), vitamina K, ácido fólico, inositol, niacina, y ácido pantoténico. Los minerales y oligoelementos que, en general, son útiles como aditivos alimentarios incluyen calcio, fósforo, sodio, potasio, magnesio, cobre, cinc, colina y hierro.

Las composiciones pueden contener ingredientes adicionales, tales como vitaminas, minerales, cargas, potenciadores de la palatabilidad, agentes aglutinantes, aromatizantes, estabilizantes, emulgentes, edulcorantes, colorantes, tampones, sales, revestimientos y similares conocidos por los expertos en la técnica. Los estabilizantes incluyen sustancias que tienden a aumentar la caducidad de la composición, tales como conservantes, sinérgicos y secuestrantes, gases de envasado, estabilizantes, emulgentes, espesantes, agentes gelificantes, y humectantes. Los ejemplos de emulgentes y/o agentes espesantes incluyen gelatina, éteres de celulosa, almidón, ésteres de almidón, éteres de almidón y almidones modificados. Las cantidades específicas para cada componente de la composición, ingrediente alimentario y otros ingredientes dependerán de una diversidad de factores, tales como los componentes e ingredientes concretos incluidos en la composición; la especie del paciente; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; la velocidad de consumo del paciente; el tipo de enfermedad que se está tratando (si existe); y similares. Por tanto, las cantidades de los ingredientes pueden variar mucho e incluso pueden desviarse de las proporciones preferidas indicadas en la presente. La cantidad de dichos aditivos en una composición generalmente es hasta del 5% en peso.

Las composiciones pueden ser o pueden contener ingredientes adicionales previstos para mantener o mejorar la salud del animal, por ejemplo, complementos, medicaciones, hierbas, composiciones y fármacos holísticos y similares.

Los complementos incluyen un alimento empleado con otro alimento para mejorar el equilibrio nutritivo o la actuación del total. Los complementos incluyen composiciones que se suministran no diluidas como un complemento para otros alimentos, que se ofrecen como elección con otras partes de la ración de un animal que están disponibles por separado, o diluidas y mezcladas con el alimento normal de un animal para producir un alimento completo. AAFCO proporciona un análisis sobre los complementos en American Feed Control Officials, Inc. publicación oficial, p. 220 (2003). Los complementos pueden tener formas variadas, que incluyen polvos, líquidos, jarabes, píldoras, composiciones encapsuladas y similares.

Las recompensas incluyen composiciones que se ofrecen a un animal para tentar al animal a que coma durante un momento que no corresponde al momento de comer, por ejemplo, huesos para perros para animales caninos. Las recompensas pueden ser nutricionales, en las que la composición comprende uno o más nutrientes, y pueden tener una composición como la descrita anteriormente para los alimentos. Las recompensas no nutricionales incluyen cualquier otra recompensa que no sea tóxica. Los microorganismos probióticos no replicativos pueden revestirse sobre las recompensas, incorporarse a las recompensas, o ambos.

Los juguetes incluyen juguetes masticables, tales como huesos artificiales. Los microorganismos probióticos no replicativos pueden formar un revestimiento sobre la superficie del juguete o sobre la superficie de un componente del juguete, para ser incorporados parcial o totalmente a través del juguete, o ambos. Los microorganismos probióticos no replicativos son accesibles por vía oral al usuario previsto. Existe una amplia gama de juguetes adecuados que se comercializan en la actualidad, por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 5.339.771, patente de EE. UU. n.º 5.419.283, y las referencias descritas en estos documentos. Se describen juguetes parcialmente comestibles, por ejemplo, juguetes que comprenden componentes plásticos, y juguetes totalmente comestibles, por ejemplo, cuero y diversos huesos artificiales. Además, se describen juguetes para uso humano y no humano, en particular para el uso por animales de compañía, de granja y de zoológico, y en particular para el uso por perros, gatos o pájaros.

En la preparación de las composiciones, los componentes se ajustan de modo que los microorganismos probióticos no replicativos están presentes en la composición a una concentración de al menos 0,01%, preferiblemente del 0,01% al 4%, lo más preferiblemente del 0,5% al 2% en peso de la composición. Los microorganismos probióticos no replicativos pueden incorporarse a la composición durante el procesamiento de la formulación, tal como durante y/o después de mezclar los otros componentes de la composición. La distribución de estos componentes en la composición se logra mediante de medios convencionales.

Las composiciones (en particular los alimentos) pueden prepararse en forma seca empleando procesos convencionales. Los ingredientes secos, que incluyen las fuentes de proteína animal, las fuentes de proteína vegetal, los cereales, etc., pueden triturarse y mezclarse. Después se añaden los ingredientes húmedos o líquidos, que incluyen grasas, aceites, fuentes de proteína animal, agua, etc., y se mezclan con la mezcla seca. La mezcla

después se procesa en gránulos o trozos secos similares. Los gránulos a menudo se forman empleando un proceso de extrusión, en el que la mezcla de los ingredientes secos y húmedos se somete a un procesamiento mecánico a alta presión y temperatura, y se obliga a pasar a través de pequeñas aberturas y se corta en gránulos por medio de un cuchillo rotante. Los gránulos húmedos después se secan y opcionalmente se revisten con uno o más revestimientos tópicos que pueden incluir aromatizantes, grasas, aceites, polvos y similares. Los gránulos también pueden fabricarse a partir de una masa empleando un proceso de cocción, en lugar de extrusión, en la que la masa se coloca en un molde antes de un procesamiento con calor seco.

Los microorganismos probióticos no replicativos pueden añadirse a la composición de un alimento para animales de compañía en su procedimiento de preparación normal, tal como mezclado, extrusión, cocción y similares, o preferiblemente se añaden después de preparación por extrusión, tal como mediante pulverización o revestimiento de la superficie del alimento. Esto resulta particularmente deseable para alimentos secos, en los que las hebras extrusionadas se ponen en contacto con los microorganismos probióticos no replicativos (o una disolución que comprende los microorganismos probióticos no replicativos) mediante pulverización o revestimiento de las hebras extrusionadas antes de que las hebras se corten en gránulos, o los gránulos se ponen en contacto con los microorganismos probióticos no replicativos (o una disolución que comprende los microorganismos probióticos no replicativos) mediante pulverización, revestimiento o inmersión de los gránulos *per se*.

Para la aplicación tópica a un alimento, los microorganismos probióticos no replicativos se mezclan con una composición de vehículo para facilitar la aplicación a la superficie de la composición alimentaria. Por ejemplo, puede utilizarse un líquido, una suspensión, un gel ligero o un sólido acuoso como vehículo para el compuesto o compuestos de esta composición. Se emplea un aparato de pulverización o inmersión convencional para aplicar el compuesto o compuestos sobre la superficie de la composición alimentaria. Un ejemplo de dicho vehículo es un subproducto animal triturado finamente y tratado con proteasas junto con aminoácidos, uno o más azúcares reductores y tiamina. El vehículo después se mezcla con los microorganismos probióticos no replicativos y se reviste sobre un gránulo, preparando con ello un alimento seco aceptable y muy sabroso. Los microorganismos probióticos no replicativos sencillamente pueden mezclarse con un potenciador del sabor líquido comercial u otra composición aromatizante para crear un nuevo producto sabroso que después puede aplicarse tópicamente a la composición. Los potenciadores de la palatabilidad líquidos adecuados del mercado para su uso con los microorganismos probióticos no replicativos incluyen cualquier potenciador de la palatabilidad líquido conocido o disponible en el mercado que puede adquirirse en suministradores de potenciadores del sabor para animales de compañía u otros suministradores de aromatizantes conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones (en particular, alimentos) pueden prepararse en una forma enlatada o húmeda empleando procesos alimentarios para animales de compañía convencionales. Pueden mezclarse tejidos proteicos de animales (por ejemplo, mamíferos, aves de corral, pescado y/o marisco) triturados con los otros ingredientes, que incluyen aceites de pescado, granos de cereales, otros ingredientes de equilibrio nutricional, aditivos con objetivos específicos (por ejemplo mezclas de vitaminas y minerales, sales inorgánicas, celulosa y pulpa de remolacha, agentes de carga, y similares). También puede añadirse agua suficiente para el procesamiento. Los ingredientes en forma húmeda generalmente se mezclan en un recipiente adecuado para calentar mientras se mezclan los componentes. El calentamiento de la mezcla puede realizarse de cualquiera manera adecuada, tal como mediante inyección directa de vapor o empleando un recipiente equipado con un intercambiador de calor. Después de la adición del último ingrediente, la mezcla se calienta hasta un intervalo de temperatura de 10 °C a 100 °C (de 50 °F a 212 °F). Las temperaturas fuera de este intervalo son aceptables, pero pueden ser poco prácticas desde el punto de vista comercial sin el uso de otros adyuvantes del procesamiento. Cuando se calienta hasta la temperatura apropiada, el material generalmente estará en forma de un líquido espeso. El líquido espeso se introduce en latas. Se aplica una tapa y el recipiente se sella herméticamente. La lata sellada después se introduce en un equipo convencional diseñado para esterilizar los contenidos. Esto habitualmente se logra calentando hasta unas temperaturas mayores que 110 °C (230 °F) durante un tiempo apropiado, que depende de la temperatura empleada y de la composición.

Para los alimentos húmedos, los microorganismos probióticos no replicativos pueden incorporarse a la composición alimentaria húmeda junto con un vehículo, tal como una composición de alcohol (concretamente, propilenglicol o dipropilenglicol), una ciclodextrina, una maltodextrina, o un almidón. Como alternativa, los microorganismos probióticos no replicativos pueden mezclarse con los materiales secos antes de formar la composición alimentaria húmeda.

Las recompensas pueden prepararse mediante un proceso de extrusión o cocción similar a los descritos anteriormente para el alimento seco. También pueden emplearse otros procesos para revestir la composición aromatizante sobre el exterior de una forma de recompensa existente o inyectarla a una forma de recompensa existente.

Los juguetes para animales generalmente se preparan revistiendo un juguete existente con una composición aromatizante que contiene en su interior los microorganismos probióticos no replicativos mezclados.

La cantidad de microorganismos probióticos no replicativos en el método para preparar una composición de un alimento para animales de compañía se corresponde de 10^6 a 10^{12} cfu por ración.

Obviamente, los microorganismos probióticos no replicativos no forman colonias y, por consiguiente, este término debe entenderse como la cantidad de microorganismos no replicativos que se obtiene a partir de 10^4 y 10^{12} cfu/g de bacterias replicativas. Esto incluye microorganismos que están inactivados, no son viables o están muertos o están presentes en forma de fragmentos, tales como ADN o paredes celulares o compuestos citoplásmicos. En otras palabras, la cantidad de microorganismos que contiene la composición se expresa en términos de la capacidad formadora de colonias ("*colony forming ability*", cfu) de esa cantidad de microorganismos si todos los microorganismos estuvieran vivos, independientemente de que, de hecho, no sean replicativos, tales como que estén inactivados o muertos, sean fragmentos o una mezcla de cualquiera o de todos estos estados.

La composición de un alimento para animales de compañía también puede comprender prebióticos.

Un "prebiótico" significa una sustancia alimentaria que estimula el crecimiento de probióticos en el intestino. No se degradada en el estómago y/o el intestino superior ni se absorbe en el tracto GI de la persona que lo ingiere, sino que se fermenta gracias a la microflora gastrointestinal y/o por los probióticos. Los prebióticos se definen, por ejemplo, en Glenn R. Gibson y Marcel B. Roberfroid, *Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics*, J. Nutr., 1995, 125:1401-1412.

Los prebióticos que pueden emplearse no están particularmente limitados e incluyen todas las sustancias alimentarias que estimulan el crecimiento de probióticos en el intestino. Preferiblemente, pueden seleccionarse del grupo que consiste en oligosacáridos, que contienen opcionalmente fructosa, galactosa, manosa; fibras dietéticas, en particular fibras solubles, fibras de soja; inulina; o sus mezclas. Los prebióticos preferidos son fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (IOS), isomalto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos de soja, glicosilacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), palatinosa-oligosacáridos (PAO), malto-oligosacáridos (MOS), gomas y/o sus hidrolizados, pectinas y/o sus hidrolizados.

Los ejemplos típicos de prebióticos son la oligofructosa y la inulina.

La cantidad de prebióticos en la composición de un alimento para animales de compañía depende de su capacidad para estimular el desarrollo de bacterias de ácido láctico. Como regla general, la composición puede contener del 0,1 al 20 % de dichos prebióticos (en peso con relación al contenido en materia seca).

Se describe una composición de un alimento para animales de compañía que comprende una cantidad de probióticos no replicativos que se corresponde con una cantidad de al menos 10^3 cfu por g de prebiótico, preferiblemente de 10^4 a 10^7 cfu/g de prebiótico, por ejemplo.

Los inventores se sorprendieron al constatar que, por ejemplo, en términos de un efecto de refuerzo inmunológico y/o en términos de un efecto antiinflamatorio, los microorganismos probióticos no replicativos pueden ser aún más eficaces que los microorganismos probióticos replicativos.

Esto resulta sorprendente, puesto que los probióticos a menudo se definen como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud al receptor" (directrices de FAO/OMS). La inmensa mayoría de la bibliografía publicada trata de probióticos vivos. Además, varios estudios investigaron los beneficios para la salud otorgados por bacterias no replicativas y, la mayoría de ellos, indican que la inactivación de los probióticos, por ejemplo, mediante un tratamiento con calor, conduce a la pérdida de su pretendido beneficio para la salud (Rachmilewitz, D., *et al.*, 2004, *Gastroenterology* 126:520-528; Castagliuolo, *et al.*, 2005, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 43:197-204; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, *Br. J. Nutr.*, 86:285-289; Kaila, M., *et al.*, 1995, *Arch. Dis. Child*, 72:51-53). Algunos estudios demuestran que los probióticos muertos pueden conservar algunos efectos para la salud (Rachmilewitz, D., *et al.*, 2004, *Gastroenterology* 126:520-528; Gill, H. S. y K. J. Rutherford, 2001, *Br. J. Nutr.*, 86:285-289), pero, evidentemente, en la técnica se han considerado los probióticos vivos como mucho más eficaces.

Los microorganismos probióticos "no replicativos" incluyen bacterias probióticas que han sido tratadas con calor. Estas incluyen microorganismos que están inactivados, están muertos, no son viables y/o están presentes como fragmentos, tales como ADN, metabolitos, compuestos citoplásmicos y/o materiales de la pared celular.

"No replicativo" significa que las células viables y/o las unidades formadoras de colonias pueden ser detectadas por medio de los métodos de cultivo en placa clásicos. Estos métodos de cultivo en placa clásicos se resumen en el libro de microbiología: James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden, 2005, *Modern food microbiology*, 7ª edición, Springer Science, Nueva York, N.Y., 790 p. Generalmente, la ausencia de células viables puede demostrarse como sigue: no se forman colonias visibles sobre placas de agar o la turbidez no aumenta en un medio de cultivo líquido después de una inoculación con diferentes concentraciones de preparaciones bacterianas (muestras "no replicativas") y una incubación bajo condiciones apropiadas (atmósfera aerobia y/o anaerobia durante al menos 24 h).

Los probióticos se definen como "preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del receptor" (Salminen S., Ouwehand A. Benno Y. *et al.*, "Probiotics: how should they be defined", Trends Food Sci. Technol., 1999:10, 107-10).

5 Las composiciones pueden comprender microorganismos probióticos y/o microorganismos probióticos no replicativos en una cantidad suficiente para producir al menos parcialmente un beneficio para la salud. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "una dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este fin dependerán de una diversidad de factores conocidos por los expertos en la técnica, tales como el peso y el estado de salud general del animal, y del efecto de la matriz alimentaria.

10 En aplicaciones profilácticas, las composiciones se administran a un consumidor susceptible o que, por lo demás, esté en riesgo de padecer un trastorno, en una cantidad que es suficiente para al menos reducir parcialmente el riesgo de desarrollar ese trastorno. Esta cantidad se define como "una dosis profilácticamente eficaz". De nuevo, las cantidades precisas dependerán de una serie de factores, tales como el peso y el estado de salud general del animal, y del efecto de la matriz alimentaria.

15 Los expertos en la técnica podrán ajustar la dosis terapéuticamente eficaz y/o la dosis profilácticamente eficaz de modo apropiado.

20 En general, la composición puede contener microorganismos probióticos no replicativos en una dosis terapéuticamente eficaz y/o en una dosis profilácticamente eficaz.

Por ejemplo, la dosis terapéuticamente eficaz y/o la dosis profilácticamente eficaz, puede estar en el intervalo de 0,005 mg a 1000 mg de microorganismos probióticos no replicativos por dosis diaria.

25 Se indica que los microorganismos no replicativos pueden estar presentes en una cantidad equivalente a entre 10^4 y 10^9 cfu/g de composición seca, aún más preferiblemente en una cantidad equivalente a entre 10^5 y 10^9 cfu/g de composición seca.

30 Puede hacerse que los probióticos no sean replicativos mediante cualquier método que sea conocido en la técnica.

Las tecnologías disponibles en la actualidad para hacer que cepas probióticas no sean replicativas son normalmente un tratamiento con calor, irradiación con rayos γ , luz UV o el uso de agentes químicos (formaldehído, paraformaldehído).

35 En términos de cantidades numéricas, por ejemplo, pueden estar presentes microorganismos no replicativos tratados a "una temperatura alta durante un corto periodo de tiempo" en una cantidad que se corresponde a entre 10^4 y 10^{12} equivalentes de cfu/g de la composición seca.

40 Para hacer que los probióticos no sean replicativos se prefiere utilizar una técnica que sea relativamente sencilla de aplicar en circunstancias industriales en la industria alimentaria.

45 La mayoría de los productos comercializados en la actualidad que contienen probióticos se tratan con calor durante su producción. Por tanto, sería conveniente poder tratar con calor a los probióticos junto con el producto producido o al menos de una manera similar, al mismo tiempo que los probióticos conserven o mejoren sus propiedades beneficiosas o incluso consigan una nueva propiedad beneficiosa para el consumidor.

50 Sin embargo, la inactivación de los microorganismos probióticos mediante tratamientos con calor, está asociada en la bibliografía, en general, a una pérdida al menos parcial de la actividad probiótica.

55 Los presentes inventores han descubierto, de modo sorprendente, que hacer que los microorganismos probióticos no sean replicativos, por ejemplo, mediante un tratamiento con calor, no produce la pérdida de beneficios probióticos para la salud, sino que, por el contrario, puede potenciar los beneficios para la salud existentes e incluso generar nuevos beneficios para la salud.

Por tanto, se describe una composición de un alimento para animales de compañía, en la que los microorganismos probióticos no replicativos se hacen no replicativos mediante un tratamiento con calor.

60 Este tratamiento con calor puede realizarse a una temperatura de 120 a 150 °C durante 1 a 120 segundos.

En la presente invención pueden emplearse tratamientos con calor de corta duración.

65 A la escala industrial, habitualmente se prefieren tratamientos con calor de corta duración, tales como tratamientos con calor de tipo UHT. Este tipo de tratamientos con calor reduce las cargas bacterianas y reduce el tiempo de procesamiento, reduciendo, con ello, el deterioro de los nutrientes.

Los inventores demuestran, por primera vez, que los microorganismos probióticos tratados con calor a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo, muestran unos perfiles inmunológicos antiinflamatorios independientemente de sus propiedades iniciales. En particular, se desarrolla un nuevo perfil antiinflamatorio o bien un perfil antiinflamatorio existente resulta potenciado por este tratamiento con calor.

5 Por tanto, ahora es posible generar microorganismos probióticos no replicativos con perfiles antiinflamatorios empleando parámetros de tratamiento con calor específicos que se corresponden con los tratamientos con calor aplicables a escala industrial típicos, incluso si sus homólogos vivos son cepas no antiinflamatorias.

10 El tratamiento a alta temperatura puede ser un tratamiento a alta temperatura/corta duración (HTST) o un tratamiento a temperatura ultra-alta (UHT).

Los microorganismos pueden someterse a un tratamiento a alta temperatura a 120-150 °C, durante un periodo de tiempo corto de 1-120 segundos.

15 Este tratamiento a alta temperatura hace que los microorganismos sean, al menos en parte, no replicativos.

El tratamiento a alta temperatura puede realizarse a presión atmosférica normal, pero también puede realizarse a alta presión. El intervalo de presión típico es de 1 a 50 bares, preferiblemente de 1-10 bares, aún más preferiblemente de 2 a 5 bares. Obviamente, se prefiere que los probióticos se traten con calor en un medio que sea líquido o sólido, cuando se aplica el calor. Por tanto, la presión ideal que se va a aplicar dependerá de la naturaleza de la composición en la que se proporcionan los microorganismos y de la temperatura utilizada.

25 El tratamiento a alta temperatura puede realizarse en el intervalo de temperatura de 120-140 °C.

El tratamiento a alta temperatura puede realizarse durante un periodo de tiempo corto de 1-30 segundos, preferiblemente de 5-15 segundos.

30 Este marco de tiempo indicado se refiere al periodo de tiempo durante el cual los microorganismos probióticos se someten a la temperatura concreta. Nótese que, dependiendo de la naturaleza y la cantidad de la composición, de los microorganismos proporcionados y de la arquitectura del aparato calentador empleado, el periodo de tiempo de aplicación de calor puede diferir.

35 La composición y/o los microorganismos se tratan mediante un tratamiento a temperatura ultra-alta (UHT).

Un tratamiento UHT generalmente es un procesamiento a temperatura ultra-alta o un tratamiento de ultra-calor (ambos se abrevian como UHT) que implica una esterilización al menos parcial de una composición mediante su calentamiento durante un periodo corto de tiempo, aproximadamente 1-10 segundos, a una temperatura mayor que 135 °C (275 °F), que es la temperatura necesaria para matar a las esporas bacterianas en la leche. Por ejemplo, el procesamiento de la leche de este modo, empleando unas temperaturas mayores que 135 °C, permite disminuir la carga bacteriana en un tiempo de mantenimiento necesario (durante 2-5 s), lo cual permite un funcionamiento en flujo continuo.

45 Existen dos tipos principales de sistemas UHT: el sistema directo e indirecto. En el sistema directo, los productos se tratan mediante una inyección de vapor o una infusión de vapor, mientras que en el sistema indirecto, los productos se tratan con calor empleando un intercambiador de calor de placa, un intercambiador de calor tubular o un intercambiador de calor de superficie rayada. Pueden aplicarse combinaciones de sistemas UHT en cualquier etapa o en múltiples etapas en el proceso de la preparación del producto.

50 Como comparación, un tratamiento HTST se define generalmente de la siguiente manera (temperatura alta/corta duración): un método de pasteurización diseñado para lograr una reducción de 5 logarítmica, que elimina el 99,9999% de los microorganismos viables en la leche. Esto se considera adecuado para destruir casi todas las levaduras, mohos y bacterias de la descomposición habituales y también para asegurar la destrucción adecuada de los organismos termorresistentes patógenos habituales. En el proceso HTST, la leche habitualmente se calienta hasta 71,7 °C (161 °F) durante 15-20 segundos.

60 También se indica que una pasteurización rápida (*flash*) es un método de pasteurización por calor de bebidas perecederas, tales como zumos de fruta y verdura, cerveza y productos lácteos. Se realiza antes de rellenar los recipientes para matar a los microorganismos de la descomposición, para hacer que los productos sean más seguros y extender su caducidad. El líquido se mueve en un flujo continuo controlado al mismo tiempo que se somete a unas temperaturas de 71,5 °C (160 °F) a 74 °C (165 °F) durante 15 a 30 segundos.

65 Para el fin de la presente invención, la expresión "tratamiento a alta temperatura y corta duración" incluye los tratamientos UHT.

Puesto que dicho tratamiento con calor proporciona probióticos no replicativos con un mejor perfil antiinflamatorio, la composición puede emplearse para la prevención o el tratamiento de trastornos inflamatorios.

Los trastornos inflamatorios que pueden tratarse o prevenirse por medio de la composición no están limitados en concreto. Por ejemplo, pueden seleccionarse del grupo que consiste en inflamaciones agudas, tales como sepsis; quemaduras; e inflamación crónica, tal como enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, bursitis; enterocolitis necrotizante; inflamación de la piel, tal como inflamación de la piel inducida por UV o productos químicos, eccema, piel reactiva; síndrome del intestino irritable; inflamación ocular; alergia, asma; y sus combinaciones.

Además se describen tratamientos con calor que hacen que los microorganismos probióticos no sean replicativos, tales como un tratamiento con calor que puede realizarse en un intervalo de temperatura de 70-150 °C durante 3 minutos-2 horas, preferiblemente en el intervalo de 80-140 °C durante 5 minutos-40 minutos.

Aunque la técnica anterior en general indica que las bacterias que se hacen no replicativas por medio de tratamientos con calor a largo plazo normalmente son menos eficaces que las células vivas, en términos de ejercer sus propiedades probióticas, se ha demostrado que los probióticos tratados con calor a largo plazo son mejores para estimular el sistema inmunológico, comparados con sus homólogos vivos.

También se describe una composición que comprende microorganismos probióticos que se han hecho no replicativos mediante un tratamiento con calor de al menos 70 °C durante al menos 3 minutos.

Los efectos de refuerzo inmunológico de los probióticos no replicativos se confirmaron mediante la determinación de inmunoperfiles *in vitro*. El modelo *in vitro* emplea la determinación de los perfiles de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica ("Peripheral Blood Mononuclear Cells", PBMC) humanas y es un modelo convencional aceptado en la técnica para ensayos de compuestos inmunomoduladores (Schultz *et al.*, 2003, Journal of Dairy Research 70, 165-173; Taylor *et al.*, 2006, Clinical and Experimental Allergy, 36, 1227-1235; Kekkonen *et al.*, 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203).

El ensayo de PBMC *in vitro* ha sido empleado por diversos autores/equipos de investigación, por ejemplo, para clasificar a los probióticos según su perfil inmunológico, concretamente sus características anti- o proinflamatorias (Kekkonen *et al.*, 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203). Por ejemplo, se ha demostrado que este ensayo permite la predicción del efecto antiinflamatorio de probióticos candidatos en modelos de ratón de colitis intestinal (Foligne, B., *et al.*, 2007, World J. Gastroenterol., 13:236-243). Además, este ensayo se emplea habitualmente en ensayos clínicos y se ha demostrado que conduce a resultados coherentes con los resultados clínicos (Schultz *et al.*, 2003, Journal of Dairy Research, 70, 165-173; Taylor *et al.*, 2006, Clinical and Experimental Allergy, 36, 1227-1235).

Las enfermedades alérgicas han ido aumentando a lo largo de las últimas décadas y, en la actualidad, son consideradas epidémicas por la OMS. De un modo general, la alergia se considera el resultado de un desequilibrio en las respuestas de Th1 y Th2 del sistema inmunológico, que conduce a un sesgo potente hacia la producción de mediadores de Th2. Por tanto, la alergia puede mitigarse, infrarregularse o prevenirse restableciendo un equilibrio apropiado entre los brazos de Th1 y Th2 del sistema inmunológico. Esto implica la necesidad de reducir las respuestas de Th2 o potenciar, al menos de una manera transitoria, las respuestas de Th1. Esto último sería una característica de una respuesta de refuerzo inmunológico, que a menudo viene acompañada de un aumento en los niveles de IFN γ , TNF- α e IL-12 (Kekkonen *et al.*, 2008, World Journal of Gastroenterology, 14, 1192-1203; Viljanen M. *et al.*, 2005, Allergy, 60, 494-500).

La composición de un alimento para animales de compañía permite, por tanto, tratar o prevenir trastornos que están relacionados con una defensa inmunológica comprometida.

Por consiguiente, los trastornos relacionados con una defensa inmunológica comprometida que pueden tratarse o prevenirse no están particularmente limitados.

Por ejemplo, pueden seleccionarse del grupo que consiste en infecciones, en particular infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias; deficiencias en fagocitos; niveles de inmunodepresión de bajos a graves, tales como los inducidos por estrés o fármacos inmunodepresivos, quimioterapia o radioterapia; estados naturales de sistemas inmunológicos menos inmunocompetentes, tales como los de los neonatos; alergias; y sus combinaciones.

La composición de un alimento para animales de compañía también permite potenciar la respuesta del animal a las vacunas, en particular a las vacunas orales.

Al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, lo más preferiblemente al menos 99%, de modo ideal al menos 99,9%, y del modo más ideal todos los probióticos son no replicativos.

Se describe que todos los microorganismos son no replicativos.

Por consiguiente, en la composición, al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, lo más preferiblemente al menos 99%, de modo ideal al menos 99,9%, y del modo más ideal todos los probióticos pueden ser no replicativos.

5 Todos los microorganismos probióticos pueden utilizarse para los fines de la presente invención.

Por ejemplo, los microorganismos probióticos se pueden seleccionar del grupo que consiste en bifidobacterias, lactobacilos, propionibacterias o sus combinaciones, por ejemplo, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetyllactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y/o sus mezclas.

15 La composición según la presente puede comprender, por ejemplo, microorganismos probióticos seleccionados del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* NCC 3001 (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium longum* NCC 2705 (CNCM I-2618), *Bifidobacterium breve* NCC 2950 (CNCM I-3865), *Bifidobacterium lactis* NCC 2818 (CNCM I-3446), *Lactobacillus johnsonii* La 1 (CNCM I-1225), *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007 (CGMCC 1.3274), *Lactobacillus reuteri* DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059 (CNCM I-4153), *Lactobacillus casei* NCC 1825 (ACA-DC 6002), *Escherichia coli* Nissle (DSM 6601), *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 (CNCM I-1198), *Lactococcus lactis* NCC 2287 (CNCM I-4154), o sus combinaciones.

Todas estas cepas están depositadas bajo el tratado de Budapest y/o están disponibles en el mercado.

25

Las cepas se han depositado bajo el tratado de Budapest como sigue:

	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC 3001:	ATCC BAA-999
	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC 2705:	CNCM I-2618
30	<i>Bifidobacterium breve</i> NCC 2950	CNCM I-3865
	<i>Bifidobacterium lactis</i> NCC 2818:	CNCM I-3446
	<i>Lactobacillus paracasei</i> NCC 2461:	CNCM I-2116
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NCC 4007:	CGMCC 1.3274
	<i>Streptococcus thermophilus</i> NCC 2019:	CNCM I-1422
35	<i>Streptococcus thermophilus</i> NCC 2059:	CNCM I-4153
	<i>Lactococcus lactis</i> NCC 2287:	CNCM I-4154
	<i>Lactobacillus casei</i> NCC 4006:	CNCM I-1518
	<i>Lactobacillus casei</i> NCC 1825:	ACA-DC 6002
40	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCC 3009:	ATCC 700396
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NCC 15:	CNCM I-1198
	<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1:	CNCM I-1225
	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM17983:	DSM17983
	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC55730:	ATCC55730
45	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917:	DSM 6601

Las cepas denominadas ATCC se depositaron en ATCC Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, EE. UU.

50 Las cepas denominadas CNCM se depositaron en COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS Cedex 15, Francia.

Las cepas denominadas CGMCC se depositaron en China General Microbiological Culture Collection Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Zhongguancun, P.O.Box2714, Pekín 100080, China.

55

Las cepas denominadas ACA-DC se depositaron en Greek Coordinated Collections of Microorganisms, Dairy Laboratory, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, 75, Iera odos, Botanikos, Atenas, 118 55, Grecia.

60 Las cepas denominadas DSM se depositaron en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7 B^A, 38124 Braunschweig, ALEMANIA.

Los expertos en la técnica comprenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención descrita en la presente.

65

Otras ventajas y características serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos y figuras.

Las figuras 1A y B muestran la potenciación de los perfiles inmunológicos antiinflamatorios de probióticos tratados con "temperaturas altas y corta duración".

La figura 2 muestra cepas probióticas no antiinflamatorias que se convirtieron en antiinflamatorias, es decir, mostraron unos pronunciados perfiles inmunológicos antiinflamatorios *in vitro* después de ser tratadas con "temperaturas altas y corta duración".

Las figuras 3A y B muestran cepas probióticas en uso en productos disponibles en el mercado que muestran perfiles inmunológicos antiinflamatorios nuevos o potenciados *in vitro* después de ser tratadas con "temperaturas altas y corta duración".

Las figuras 4A y B muestran cepas iniciadoras lácteas (concretamente, cepas iniciadoras Lc1) que muestran perfiles inmunológicos antiinflamatorios nuevos o potenciados *in vitro* después de un tratamiento con calor a altas temperaturas.

La figura 5 muestra una cepa probiótica no antiinflamatoria que muestra unos perfiles inmunológicos antiinflamatorios *in vitro* después de ser tratada con tratamientos HTST.

La figura 6 es un análisis de componentes principales de datos de PBMC (IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-10) generados con cepas probióticas e iniciadores lácteos en sus formas vivas y tratadas con calor (140 °C durante 15 segundos). Cada punto representa una cepa viva o tratada con calor identificada por su nombre o número NCC.

La figura 7 muestra las proporciones de IL-12p40/IL-10 de cepas vivas y tratadas con calor (85 °C, 20 min). De modo global, el tratamiento con calor a 85 °C durante 20 min conduce a un aumento en las proporciones de IL-12p40/IL-10, en oposición a los tratamientos de "alta temperatura y corta duración" de la presente invención (figuras 1, 2, 3, 4 y 5).

La figura 8 muestra la potenciación de la secreción de citoquinas *in vitro* de PBMC humanas estimuladas con bacterias tratadas con calor.

La figura 9 muestra el porcentaje de intensidad de diarrea observada en ratones sensibilizados con OVA expuestos a disolución salina (control negativo), ratones sensibilizados con OVA expuestos a OVA (control positivo) y ratones sensibilizados con OVA expuestos a OVA y tratados con *Bifidobacterium breve* NCC2950 vivo o tratado con calor. Los resultados se muestran como el porcentaje de intensidad de la diarrea (promedio \pm MEE calculado a partir de 4 experimentos independientes), correspondiéndose 100% de intensidad de diarrea con los síntomas desarrollados en el grupo de control positivo (sensibilizados y expuestos al alérgeno).

Ejemplo 1

Metodología

Preparaciones bacterianas:

Los beneficios para la salud ofrecidos por los probióticos vivos en el sistema inmunológico del hospedante se consideran, en general, específicos de cepa. Se ha demostrado que los probióticos que inducen unos niveles altos de IL-10 y/o que inducen unos niveles bajos de citoquinas proinflamatorias *in vitro* (ensayo de PBMC) son potentes cepas antiinflamatorias *in vivo* (Foligné, B., *et al.*, 2007, *World J. Gastroenterol.*, 13:236-243).

Se emplearon varias cepas probióticas para investigar las propiedades antiinflamatorias de probióticos tratados con calor. Estas fueron *Bifidobacterium longum* NCC 3001, *Bifidobacterium longum* NCC 2705, *Bifidobacterium breve* NCC 2950, *Bifidobacterium lactis* NCC 2818, *Lactobacillus paracasei* NCC 2461, *Lactobacillus rhamnosus* NCC 4007, *Lactobacillus casei* NCC 4006, *Lactobacillus acidophilus* NCC 3009, *Lactobacillus casei* ACA-DC 6002 (NCC 1825), y *Escherichia coli* Nissle. También se ensayaron varias cepas de cultivos iniciadores que incluyen algunas cepas disponibles en el mercado para producir los productos fermentados Nestlé Lc1: *Streptococcus thermophilus* NCC 2019, *Streptococcus thermophilus* NCC 2059, *Lactobacillus bulgaricus* NCC 15 y *Lactococcus lactis* NCC 2287.

Las células bacterianas se cultivaron en condiciones optimizadas para cada cepa en biorreactores 5-15L. Pueden utilizarse todos los medios de cultivo bacterianos típicos. Estos medios son conocidos por los expertos en la técnica. Cuando el pH se ajusta a 5,5, se añade de modo continuo una disolución de base al 30% (NaOH o Ca(OH)₂). Cuando resultó adecuado, las condiciones anaerobias se mantuvieron introduciendo CO₂ en el espacio de la parte superior. Se cultivó *E. coli* bajo condiciones aerobias convencionales.

Las células bacterianas se recolectaron mediante centrifugación (5.000 x g, 4 °C) y se resuspendieron en disolución salina tamponada con fosfato ("*phosphate buffer saline*", PBS) en volúmenes adecuados para alcanzar una concentración final de aproximadamente 10⁹-10¹⁰ cfu/ml. Parte de la preparación se congeló a -80 °C con glicerol al

15%. Otra parte de las células se trató con calor mediante:

- una temperatura ultra-alta: 140 °C durante 15 segundos; mediante inyección de vapor indirecta.

5 - alta temperatura y corta duración tiempo (HTST): 74 °C, 90 °C y 120 °C durante 15 segundos mediante inyección de vapor indirecta.

- mucho tiempo y baja temperatura (85 °C, 20 min) en agua. Tras el tratamiento con calor, las muestras se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta el momento del uso.

10

Formación de perfiles inmunológicos *in vitro* de preparaciones bacterianas:

Se evaluaron los perfiles inmunológicos de preparaciones bacterianas vivas y tratadas con calor (es decir, la capacidad para inducir la secreción de citoquinas específicas desde células sanguíneas humanas *in vitro*). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de filtrados de sangre. Después de una separación mediante un gradiente de densidad de células, las células mononucleares se recolectaron y se lavaron dos veces con disolución salina equilibrada de Hank. Después las células se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, Sigma) suplementado con suero de ternero fetal al 10% (Bioconcept, París, Francia), L-glutamina al 1% (Sigma), penicilina al 1%/estreptomina (Sigma) y gentamicina al 0,1% (Sigma). Después las PBMC (7×10^5 células/pocillo) se incubaron con bacterias vivas y tratadas con calor (equivalente a 7×10^6 cfu/pocillo) en placas de 48 pocillos durante 36 h. Se ensayaron los efectos de las bacterias vivas y tratadas con calor sobre las PBMC procedentes de 8 donantes individuales divididas en dos experimentos distintos. Después de 36 h de incubación, las placas de cultivo se congelaron y se mantuvieron a -20 °C hasta la medición de las citoquinas. Se realizaron los perfiles de citoquinas en paralelo (es decir, en el mismo experimento sobre el mismo lote de PBMC) para las bacterias vivas y sus homólogas tratadas con calor.

15

20

25

Se determinaron los niveles de citoquinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α e IL-10) en sobrenadantes de cultivos celulares después de 36 h de incubación mediante ELISA (R&D DuoSet IL-10 humana, BD OptEIA IL12p40 humana, BD OptEIA TNF α humano, BD OptEIA IFN- γ humano) siguiendo las instrucciones del fabricante. IFN- γ , IL-12p40 y TNF- α son citoquinas proinflamatorias, mientras que IL-10 es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados se expresan como promedio (pg/ml) \pm MEE de 4 donantes individuales y son representativos de dos experimentos individuales realizados con 4 donantes cada uno. Se calculó la proporción de IL-12p40/IL-10 para cada cepa como un valor predictivo del efecto antiinflamatorio *in vivo* (Foligné, B., *et al.*, 2007, World J. Gastroenterol., 13:236-243).

30

35

Los valores numéricos de las citoquinas (pg/ml) determinados mediante ELISA (véase anteriormente) para cada cepa se trasladaron a un software BioNumerics v5.10 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Se realizó un análisis de los componentes principales ("Principal Component Analysis", PCA, una técnica de dimensionamiento) en este conjunto de datos. En este análisis se incluyó la resta de los promedios con respecto a los caracteres y la división entre las varianzas con respecto a los caracteres.

40

Resultados

Perfiles antiinflamatorios generados mediante tratamientos similares a temperatura ultra-alta (UHT)/alta temperatura y corta duración (HTST)

45

Las cepas probióticas investigadas se sometieron a una serie de tratamientos con calor (temperatura ultra-alta (UHT), alta temperatura y corta duración (HTST) y 85 °C durante 20 min) y se compararon sus perfiles inmunológicos con los de células vivas *in vitro*. Los microorganismos vivos (probióticos y/o cultivos iniciadores lácteos) indujeron diferentes niveles de producción de citoquinas cuando se incuban con PBMC humanas (figuras 1, 2, 3, 4 y 5). El tratamiento con calor de estos microorganismos modifica los niveles de citoquinas producidas por las PBMC de una manera dependiente de la temperatura. Los tratamientos a "alta temperatura y corta duración" (120 °C o 140 °C durante 15 segundos) no generaron bacterias replicativas con perfiles inmunológicos antiinflamatorios (figuras 1, 2, 3 y 4). En efecto, las cepas tratadas con un procedimiento similar a UHT (140 °C, 15 seg) indujeron menos citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-12p40), al mismo tiempo que mantuvieron o indujeron la producción adicional de IL-10 (comparado con sus homólogas vivas). Las proporciones de IL-12p40/IL-10 resultantes fueron más bajas para cualquiera de las cepas tratadas con un procedimiento similar a UHT, comparado con las células vivas (figuras 1, 2, 3 y 4). Esta observación también fue válida para las bacterias tratadas con tratamientos similares a HTST, es decir, sometidas a 120 °C durante 15 seg (figuras 1, 2, 3 y 4), o 74 °C y 90 °C durante 15 seg (figura 5). Los tratamientos con calor (tratamientos similares a UHT o similares a HTST) producen un efecto similar sobre los perfiles inmunológicos *in vitro* de cepas probióticas (figuras 1, 2, 3 y 5) y cultivos iniciadores lácteos (figura 4). Los datos del análisis de componentes principales de PBMC generados con probióticos y cepas iniciadoras lácteas vivas y tratadas con calor (140 °C, 15 segundos) revelaron que las cepas vivas se extienden a lo largo del eje x, lo cual indica que las cepas muestran perfiles inmunológicos muy diferentes *in vitro*, desde inductores bajos (izquierda) a altos (derecha) de citoquinas proinflamatorias. Las cepas tratadas con calor se agrupan en la parte izquierda de la gráfica, lo cual demuestra que las citoquinas proinflamatorias son mucho menos inducidas por las cepas tratadas con calor (figura 6). Por contraste, las bacterias tratadas con calor a 85 °C durante 20 min

50

55

60

65

inducen más citoquinas proinflamatorias y menos IL-10 que las células vivas, dando como resultados unas proporciones de IL-12p40/IL-10 mayores (figura 7).

Los perfiles antiinflamatorios son potenciados o generados por tratamientos similares a UHT y similares a HTST.

Las cepas tratadas con UHT y HTST mostraron menos perfiles antiinflamatorios, independientemente de sus respectivos perfiles inmunológicos iniciales (células vivas). Se demostró que las cepas probióticas conocidas por ser antiinflamatorias *in vivo* y por mostrar unos perfiles antiinflamatorios *in vitro* (*B. longum* NCC 3001, *B. longum* NCC 2705, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818) mostraban perfiles antiinflamatorios potenciados *in vitro* después de los tratamientos a "alta temperatura y corta duración". Tal como se muestra en la figura 1, las proporciones de IL-12p40/IL-10 de las cepas de *Bifidobacterium* tratadas con un procedimiento similar a UHT fueron menores que las de sus homólogas vivas, lo cual demuestra unos perfiles antiinflamatorios mejorados de las muestras tratadas con un procedimiento similar a UHT. De forma aún más sorprendente, la generación de perfiles antiinflamatorios por los tratamientos con procedimiento similares a UHT y similares a HTST también fue confirmado por las cepas vivas no antiinflamatorias. Ambos *L. rhamnosus* NCC 4007 y *L. paracasei* NCC 2461 vivos muestran unas proporciones de IL-12p40/IL-10 *in vitro* (figuras 2 y 5). Se demostró que las dos cepas vivas no protegen frente a la colitis inducida por TNBS en ratones. Las proporciones de IL-12p40/IL-10 inducidas por *L. rhamnosus* NCC 4007 y *L. paracasei* NCC 2461 se redujeron notablemente después de los tratamientos con "alta temperatura y corta duración" (UHT o HTST), alcanzando unos niveles tan bajos como los obtenidos con cepas de *Bifidobacterium*. Estas proporciones bajas de IL-12p40/IL-10 son debidas a niveles bajos de producción de IL-12p40, combinados con la falta de cambios (*L. rhamnosus* NCC 4007) o una inducción notable de secreción de IL-10 (*L. paracasei* NCC 2461) (figura 2).

Como consecuencia:

- Los perfiles antiinflamatorios de microorganismos vivos pueden ser potenciados por medio de tratamientos con calor similares a UHT y similares a HTST (por ejemplo, *B. longum* NCC 2705, *B. longum* NCC 3001, *B. breve* NCC 2950, *B. lactis* NCC 2818).
- Pueden generarse perfiles antiinflamatorios a partir de microorganismos vivos no antiinflamatorios (por ejemplo, *L. rhamnosus* NCC 4007, *L. paracasei* NCC 2461, iniciadores lácteos *S. thermophilus* NCC 2019) por medio de tratamientos con calor similares a UHT y similares a HTST.
- También aparecieron perfiles antiinflamatorios en cepas aisladas a partir de productos disponibles en el mercado (figuras 3A y B), que incluyen una cepa probiótica de *E. coli*.

El impacto de los tratamientos similares a UHT/HTST fue similar para todos los probióticos e iniciadores lácteos ensayados, por ejemplo, lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos.

Se aplicaron tratamientos similares a UHT/HTST a varios lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos que muestran diferentes perfiles inmunológicos *in vitro*. Todas las cepas indujeron menos citoquinas proinflamatorias después de los tratamientos similares a UHT/HTST que sus homólogas vivas (figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6), lo cual demuestra que el efecto de los tratamientos similares a UHT/HTST sobre las propiedades inmunológicas de las bacterias no replicativas resultantes puede generalizarse a todos los probióticos, en particular a lactobacilos y bifidobacterias y a cepas específicas de *E. coli* y a todos los cultivos iniciadores lácteos, en particular a estreptococos, lactococos y lactobacilos.

Ejemplo 2 (ejemplo comparativo)

Metodología

Preparaciones bacterianas:

Se emplearon cinco cepas probióticas para investigar las propiedades de refuerzo inmunológico de probióticos no replicativos: 3 bifidobacterias (*B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *B. breve* NCC2950) y 2 lactobacilos (*L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007).

Las células bacterianas se cultivaron en MRS en una fermentación discontinua a 37 °C durante 16-18h sin control del pH. Las células bacterianas se recolectaron mediante centrifugación (5.000 x g, 4 °C) y se resuspendieron en disolución salina tamponada con fosfato antes de diluirse en agua con disolución salina para alcanzar una concentración final de aproximadamente 10E10 cfu/ml. *B. longum* NCC3001, *B. lactis* NCC2818, *L. paracasei* NCC2461, *L. rhamnosus* NCC4007 se trataron con calor a 85 °C durante 20 min en un baño de agua. *B. breve* NCC2950 se trató con calor a 90 °C durante 30 minutos en un baño de agua. Las suspensiones bacterianas tratadas con calor se dividieron en partes alícuotas y se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta el momento del uso. Las bacterias vivas se conservaron a -80 °C en PBS-glicerol al 15% hasta el momento del uso.

Formación de perfiles inmunológicos in vitro de preparaciones bacterianas

Se evaluaron los perfiles inmunológicos de preparaciones bacterianas vivas y tratadas con calor (es decir, la capacidad para inducir la secreción de citoquinas específicas desde células sanguíneas humanas *in vitro*). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de filtrados de sangre. Después de una separación mediante un gradiente de densidad de células, las células mononucleares se recolectaron y se lavaron dos veces con disolución salina equilibrada de Hank. Después las células se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, Sigma) suplementado con suero de ternero fetal al 10% (Bioconcept, París, Francia), L-glutamina al 1% (Sigma), penicilina al 1%/estreptomina (Sigma) y gentamicina al 0,1% (Sigma). Después las PBMC (7×10^5 células/pocillo) se incubaron con bacterias vivas y tratadas con calor (equivalente a 7×10^6 cfu/pocillo) en placas de 48 pocillos durante 36 h. Se ensayaron los efectos de las bacterias vivas y tratadas con calor sobre las PBMC procedentes de 8 donantes individuales divididas en dos experimentos distintos. Después de 36 h de incubación, las placas de cultivo se congelaron y se mantuvieron a -20°C hasta la medición de las citoquinas. Se realizaron los perfiles de citoquinas en paralelo (es decir, en el mismo experimento sobre el mismo lote de PBMC) para las bacterias vivas y sus homólogas tratadas con calor.

Se determinaron los niveles de citoquinas (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α e IL-10) en sobrenadantes de cultivos celulares después de 36 h de incubación mediante ELISA (R&D DuoSet IL-10 humana, BD OptEIA IL12p40 humana, BD OptEIA TNF α humano, BD OptEIA IFN- γ humano) siguiendo las instrucciones del fabricante. IFN- γ , IL-12p40 y TNF- α son citoquinas proinflamatorias, mientras que IL-10 es un potente mediador antiinflamatorio. Los resultados se expresan como promedio (pg/ml) \pm MEE de 4 donantes individuales y son representativos de dos experimentos individuales realizados con 4 donantes cada uno.

Efecto in vivo de Bifidobacterium breve NCC2950 vivo y tratado con calor para la prevención de la diarrea alérgica

Se empleó un modelo de ratón de diarrea alérgica para ensayar el efecto estimulante de Th1 de *B. breve* NCC2950 (Brandt E.B *et al.*, JCI, 2003, 112(11):1666-1667). Después de la sensibilización (2 inyecciones intraperitoneales de ovoalbúmina (OVA) y sulfato de aluminio y potasio en un intervalo de 14 días; días 0 y 4), ratones Balb/c macho fueron expuestos por vía oral a OVA seis veces (días 27, 29, 32, 34, 36, 39), lo cual produjo la aparición de síntomas clínicos transitorios (diarrea) y cambios en los parámetros inmunológicos (concentración plasmática de IgE total, IgE específica de OVA, proteasa 1 de células cebadas de ratón ("*mouse mast cell protease 1*", MMCP-1)). Se administró *Bifidobacterium breve* NCC2950 vivo o tratado con calor a 90°C durante 30 min mediante sonda oral 4 días antes de la sensibilización con OVA (días -3, -2, -1, 0 y días 11, 12, 13 y 14) y durante el periodo de exposición (días 23 a 39). Se empleó una dosis bacteriana diaria de aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colonias (cfu) o equivalentes de cfu/ratón.

Resultados

Inducción de la secreción de citoquinas "proinflamatorias" después del tratamiento con calor

Se evaluó la capacidad de cepas bacterianas tratadas con calor para estimular la secreción de citoquinas por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas *in vitro*. Se compararon los perfiles inmunológicos de cuatro citoquinas tras la estimulación de las PBMC por bacterias tratadas con calor, con los de las inducidas por células bacterianas vivas en el mismo ensayo *in vitro*.

Las preparaciones tratadas con calor se cultivaron en placa y se evaluaron para la ausencia de recuentos viables. Las preparaciones bacterianas tratadas con calor no produjeron colonias después del cultivo en placa.

Los probióticos vivos indujeron diferentes niveles, dependientes de la cepa, de producción de citoquinas cuando se incuban con PBMC humanas (figura 8). El tratamiento con calor de los probióticos modificó los niveles de citoquinas producidas por las PBMC, comparado con sus homólogos vivos. Las bacterias tratadas con calor indujeron más citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-12p40) que sus homólogas vivas. Por contraste, las bacterias tratadas con calor indujeron unas cantidades similares o menores de IL-10, comparado con las células vivas (figura 8). Estos datos demuestran que las bacterias tratadas con calor son más capaces de estimular el sistema inmunológico que sus homólogas vivas y, por tanto, son más capaces de reforzar las defensas inmunológicas debilitadas. En otras palabras, los datos *in vitro* indican un efecto de refuerzo inmunológico potenciado de las cepas bacterianas después de un tratamiento con calor.

Para ilustrar el efecto potenciado de *B. breve* NCC2950 tratado con calor (comparado con las células vivas) sobre el sistema inmunológico, se ensayaron *B. breve* NCC2950 (cepa A) vivas y tratadas con calor en un modelo animal de diarrea alérgica.

Comparado con el grupo de control positivo, la intensidad de la diarrea disminuyó significativa y constantemente después del tratamiento con *B. breve* NCC2950 ($41,1\% \pm 4,8$) tratadas con calor, mientras que la intensidad de la diarrea disminuyó en solo $20 \pm 28,3\%$ después del tratamiento con *B. breve* NCC2950 vivas. Estos resultados demuestran que *B. breve* NCC2950 tratadas con calor muestran un efecto protector potenciado frente a la diarrea

alérgica que sus homólogas vivas (figura 9).

Como consecuencia, se demostró que la capacidad de los probióticos para potenciar las defensas inmunológicas mejoró después del tratamiento con calor.

5

Otro ejemplo

Puede prepararse la siguiente composición de un alimento para animales de compañía empleando técnicas convencionales, tal como se describen en esta solicitud de patente:

10

Ingrediente	g/100 g
Grasas	15
Proteínas	29
Hidratos de carbono	46
Fibra dietética	7
Agentes de equilibrio nutricional	2
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 tratada con calor de corta duración	1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar una composición de un alimento para animales de compañía que comprende microorganismos probióticos no replicativos en una cantidad correspondiente a de 10^6 a 10^{12} cfu por ración, en el que dicho método comprende tratar los microorganismos probióticos con un tratamiento de alta temperatura a 120-150 °C durante 1-120 segundos y, así, hacer que los microorganismos probióticos no sean replicativos.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, que comprende del 4 al 40% en peso seco de grasas, del 12 al 70% en peso seco de hidratos de carbono y del 12 al 50% en peso seco de proteínas.
- 15 3. Un método según la reivindicación 2, que comprende del 10 al 20% en peso seco de grasas, del 30 al 60% en peso seco de hidratos de carbono y del 20 al 35% en peso seco de proteínas.
- 20 4. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además del 0,5 al 40% en peso seco, preferiblemente del 0,5 al 30% en peso seco, más preferiblemente del 1 al 20% en peso seco, y lo más preferiblemente del 1 al 10% en peso seco de fibra dietética.
- 25 5. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición alimentaria para animales de compañía se selecciona del grupo que consiste en alimentos para animales de compañía, dietas nutricionales para animales de compañía, complementos para animales de compañía, recompensas para animales de compañía y juguetes comestibles para animales de compañía, tales como juguetes que se pueden morder y comer.
- 30 6. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además prebióticos, por ejemplo, oligofructosa e inulina.
- 35 7. Un método según la reivindicación 1, en el que el tratamiento con calor es un tratamiento a temperatura ultra-alta (UHT) que implica calentar la composición durante un corto periodo de tiempo de 1 a 10 segundos a una temperatura que supera 135 °C.
- 40 8. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, lo más preferiblemente al menos 99%, de modo ideal al menos 99,9%, y del modo más ideal todos los probióticos se hacen no replicativos.
- 45 9. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los microorganismos probióticos se seleccionan del grupo que consiste en bifidobacterias, lactobacilos, propionibacterias o sus combinaciones, por ejemplo, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* y/o sus mezclas.
- 50 10. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los microorganismos probióticos se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bifidobacterium longum* CNCM 1-2618, *Bifidobacterium breve* CNCM 1-3865, *Bifidobacterium lactis* CNCM 1-3446, *Lactobacillus johnsonii* CNCM 1-1225, *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116, *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus reuteri* DSM17983, *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-1422, *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-4153, *Lactobacillus casei* CNCM 1-1518, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 700396, *Lactobacillus casei* ACA-DC 6002, *Escherichia coli* Nissle DSM 6601, *Lactobacillus bulgaricus* CNCM 1-1198, *Lactococcus lactis* CNCM 1-4154, o sus combinaciones.
11. Un método según una de las reivindicaciones anteriores, que contiene de 0,005 mg a 1000 mg de microorganismos no replicativos por dosis diaria.

Figura 1A

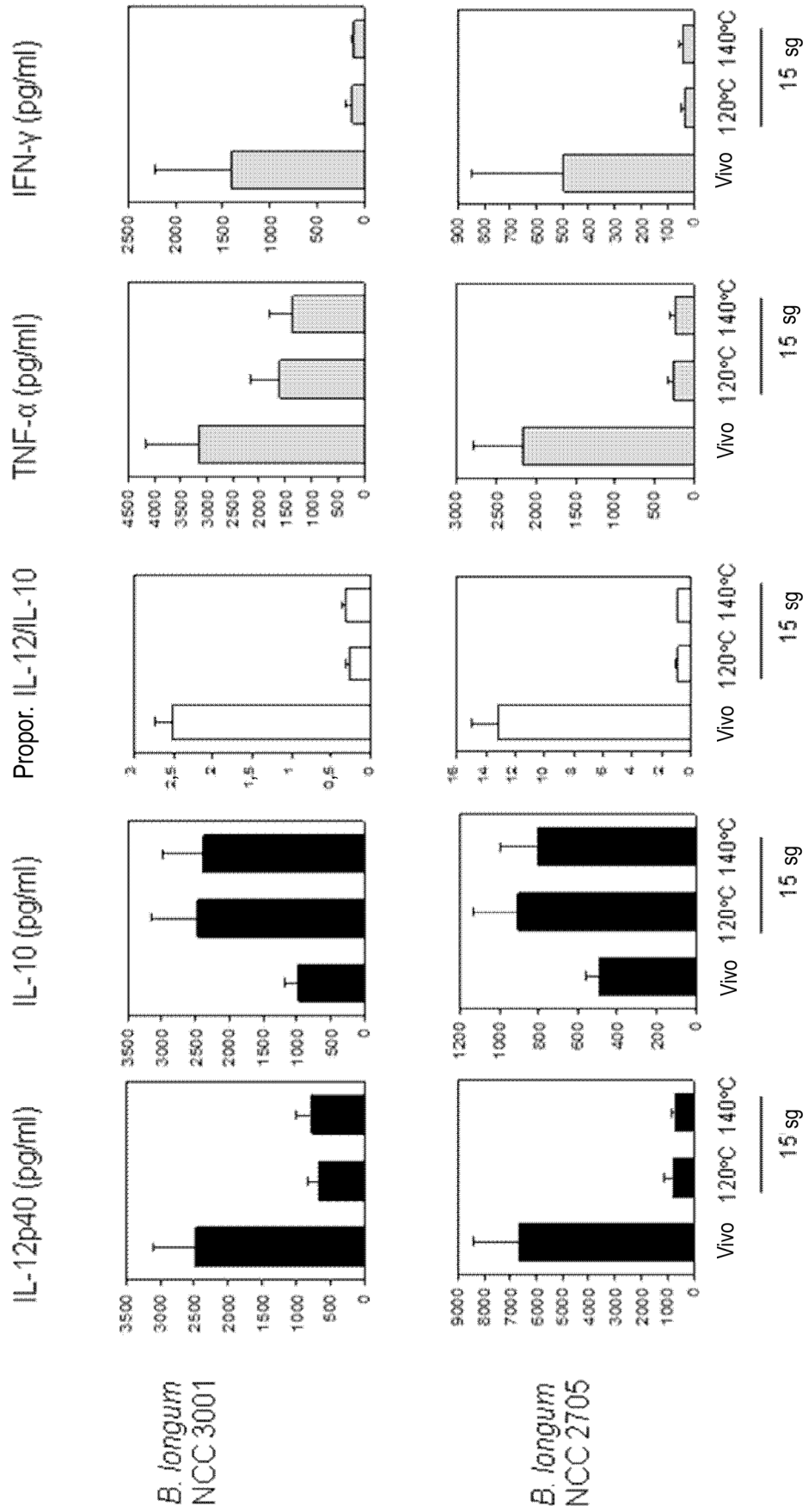


Figura 1B

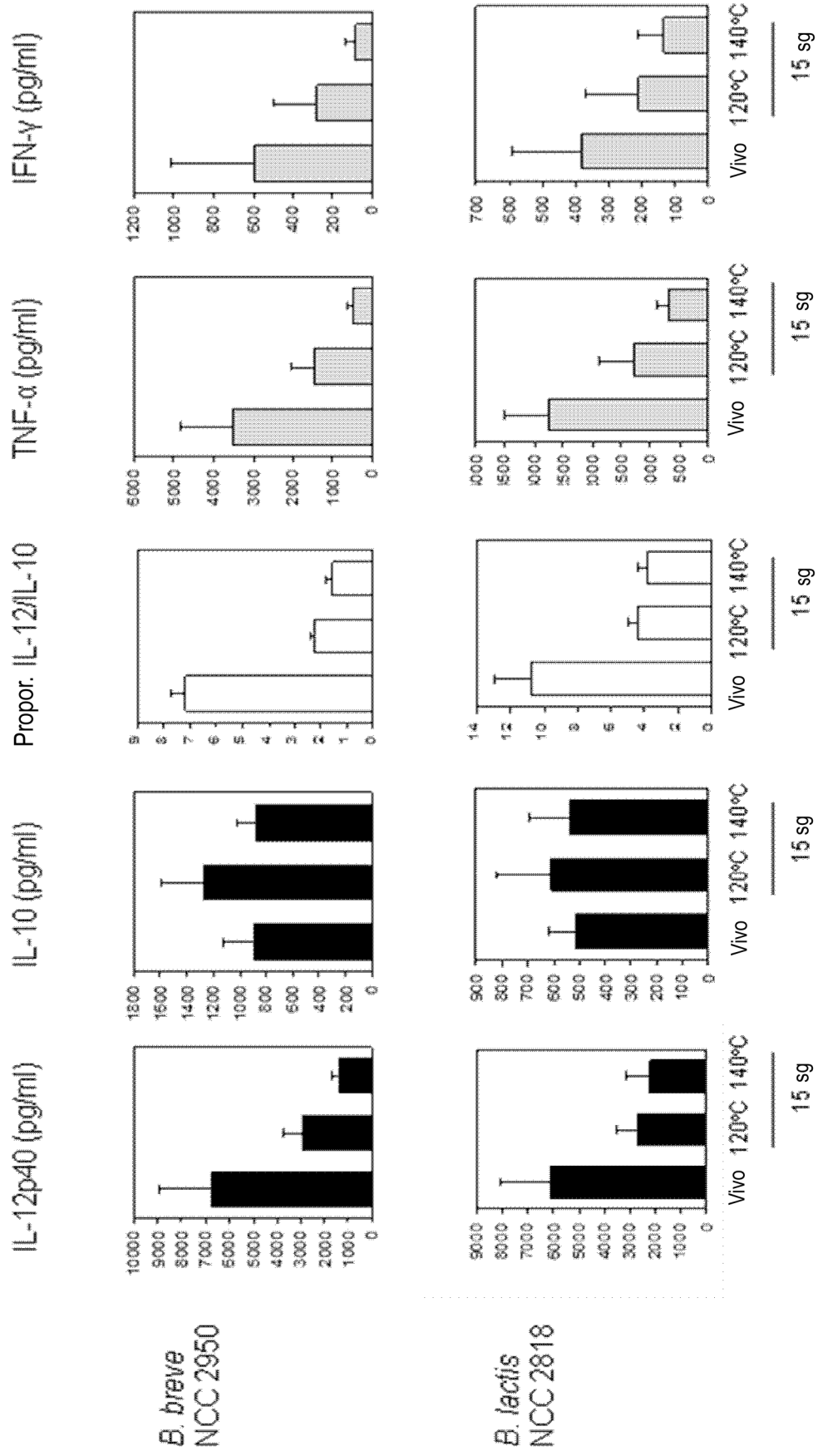


Figura 2

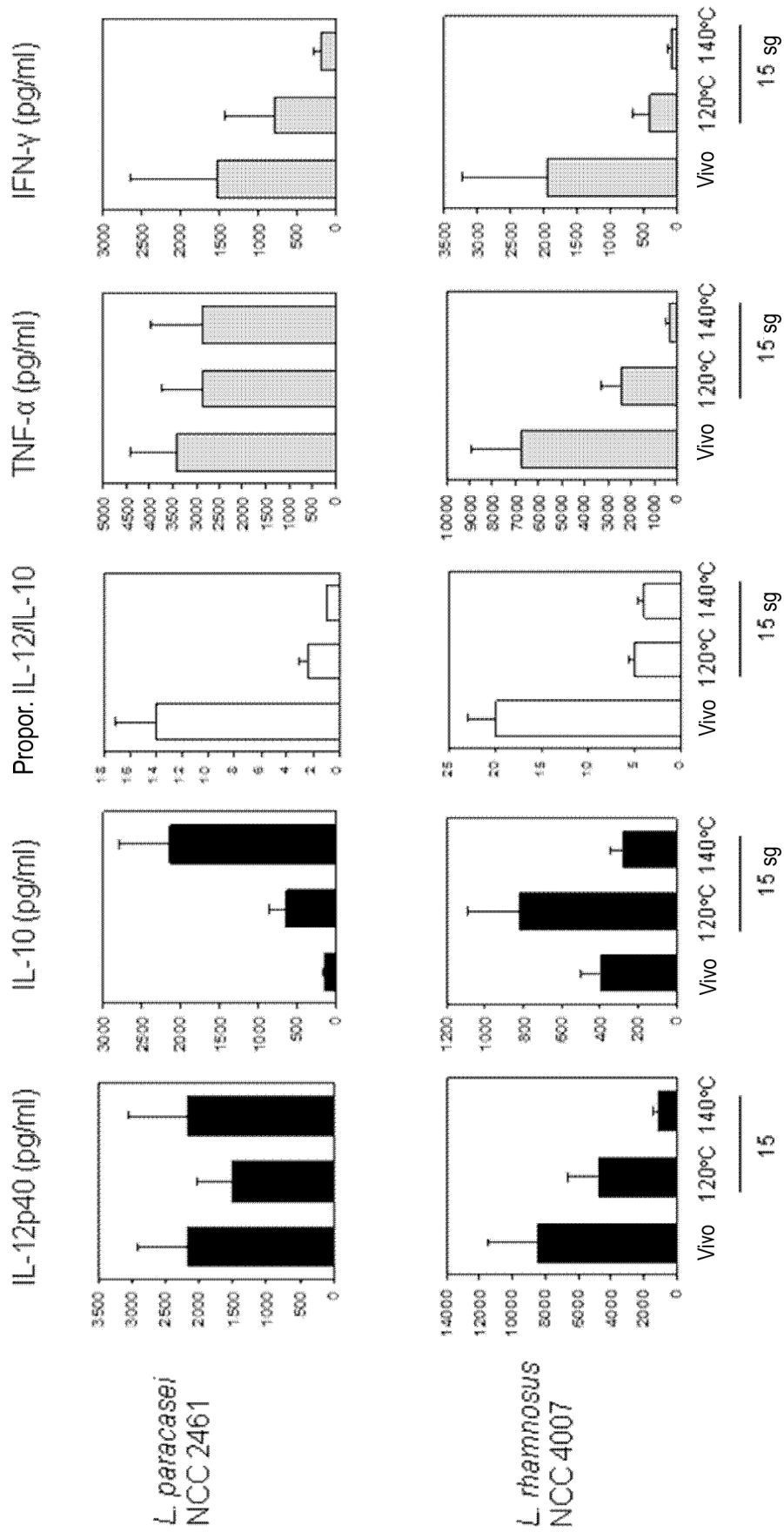


Figura 3A

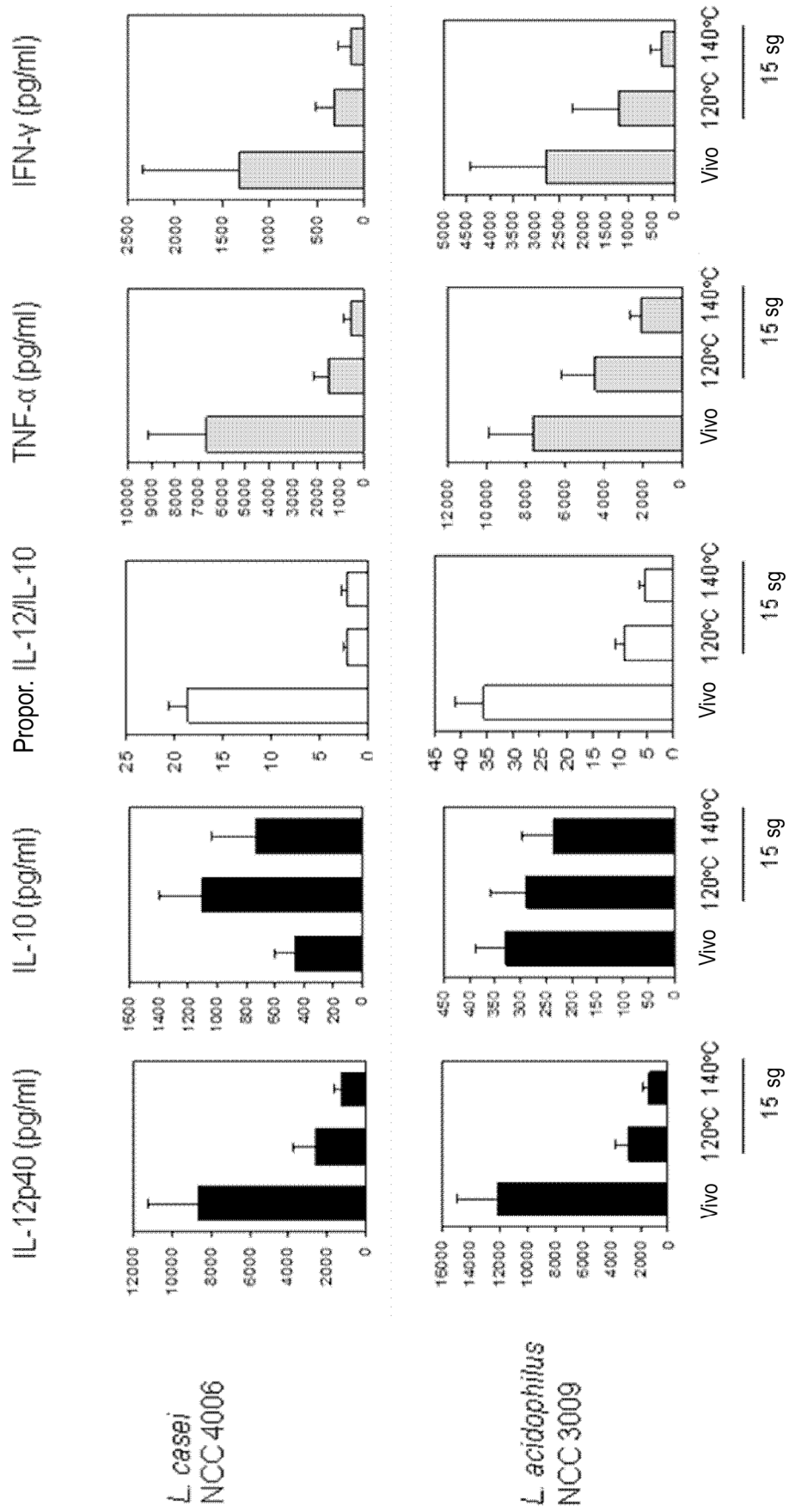


Figura 3B

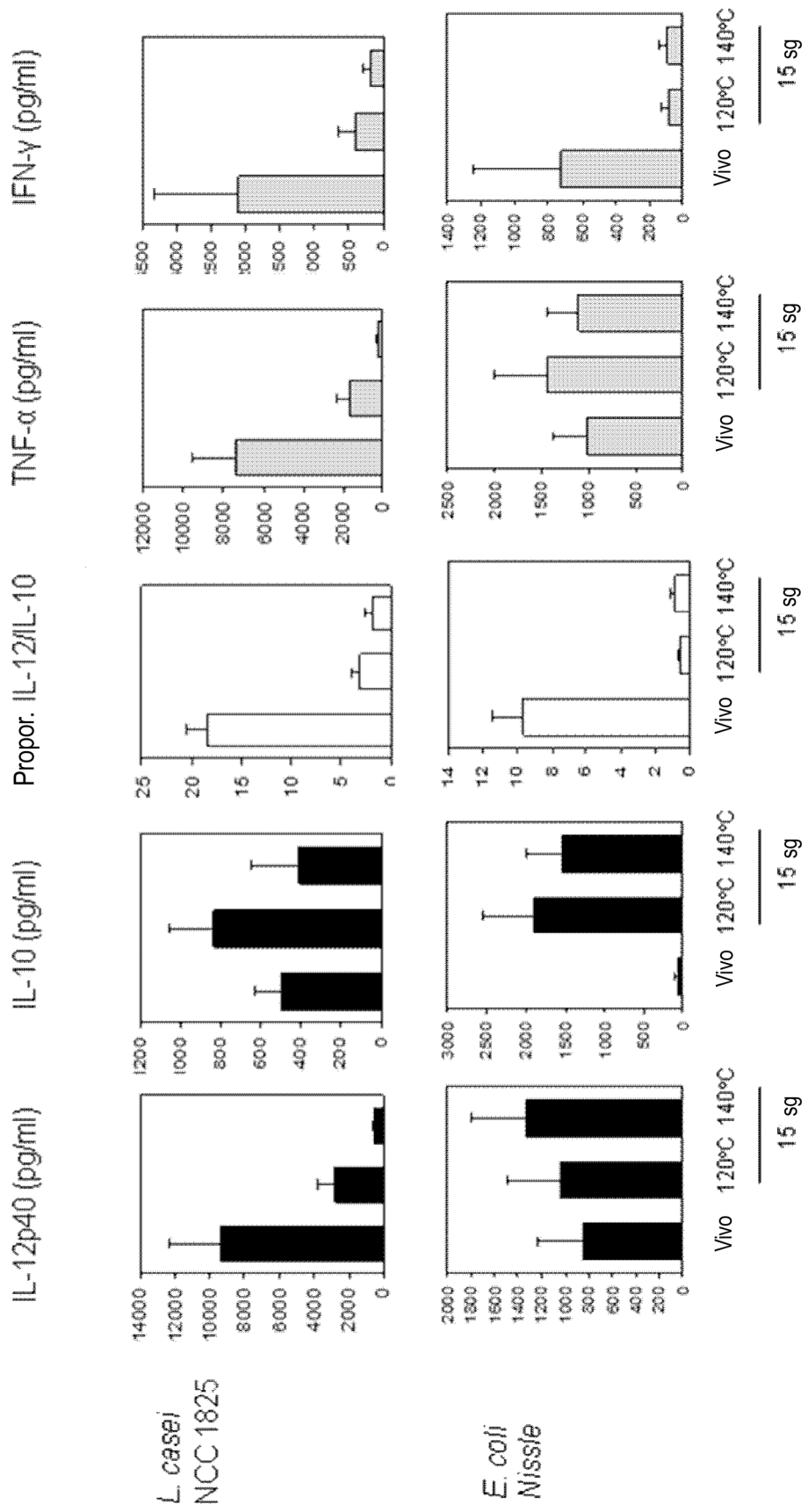


Figura 4A

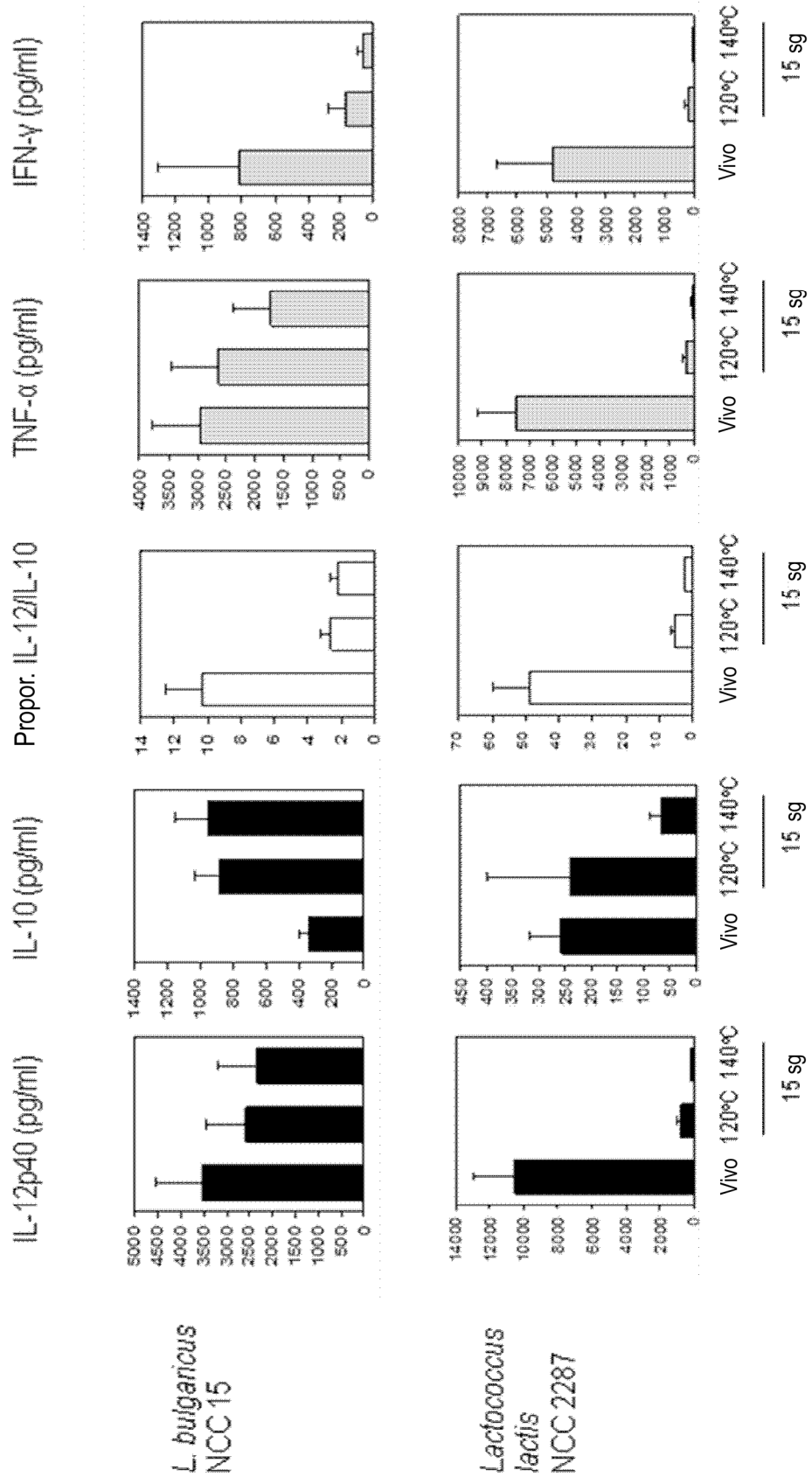


Figura 4B

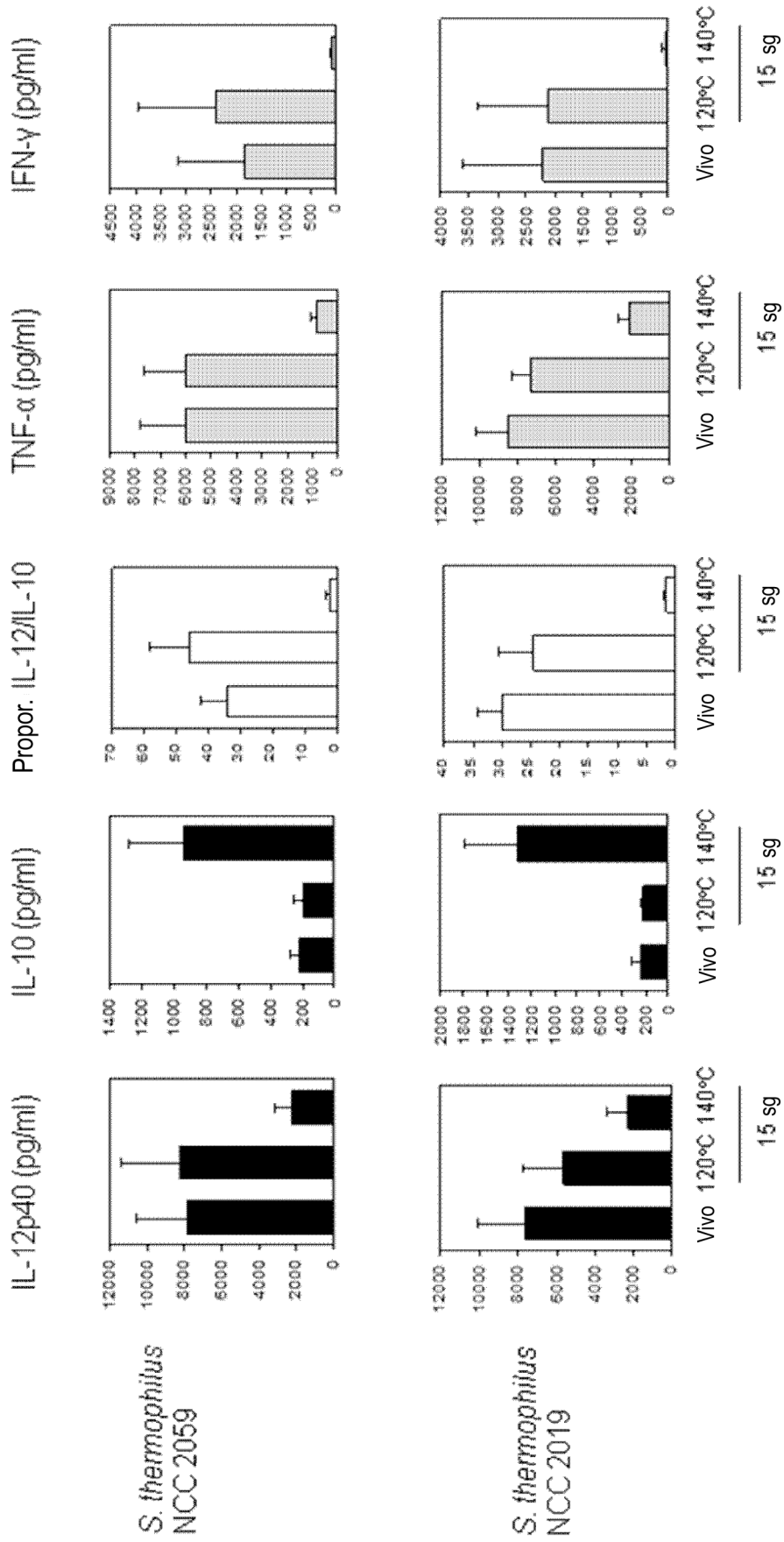


Figura 5

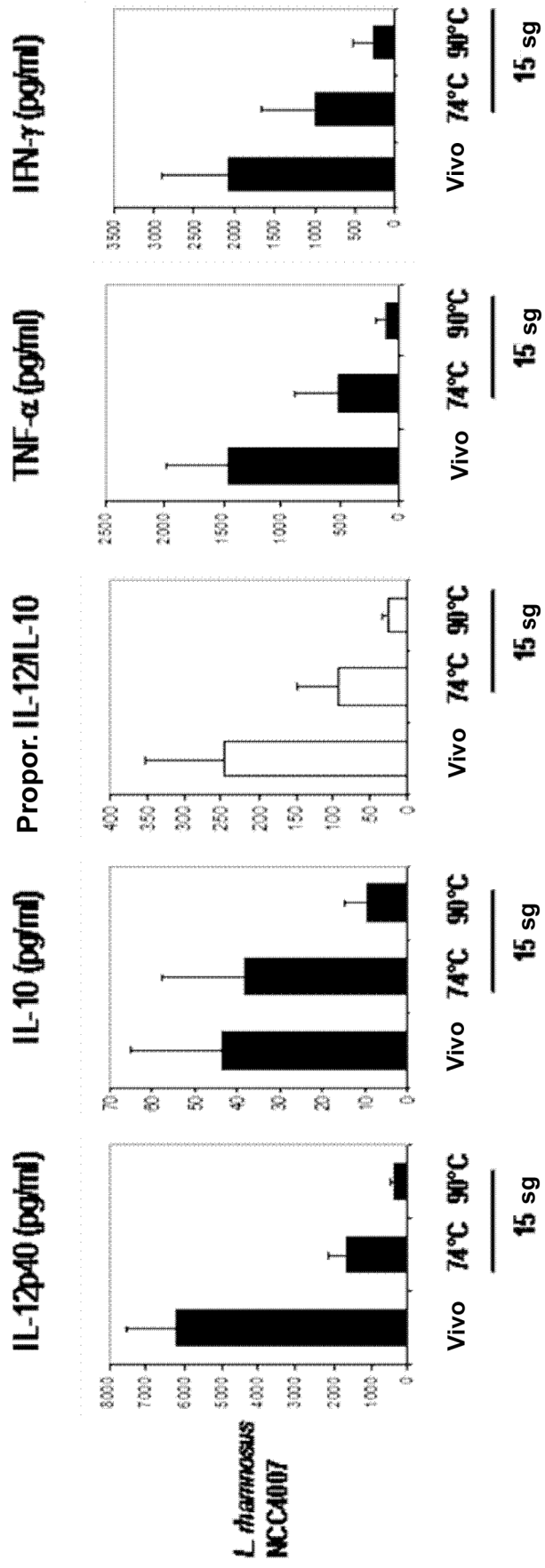


Figura 6

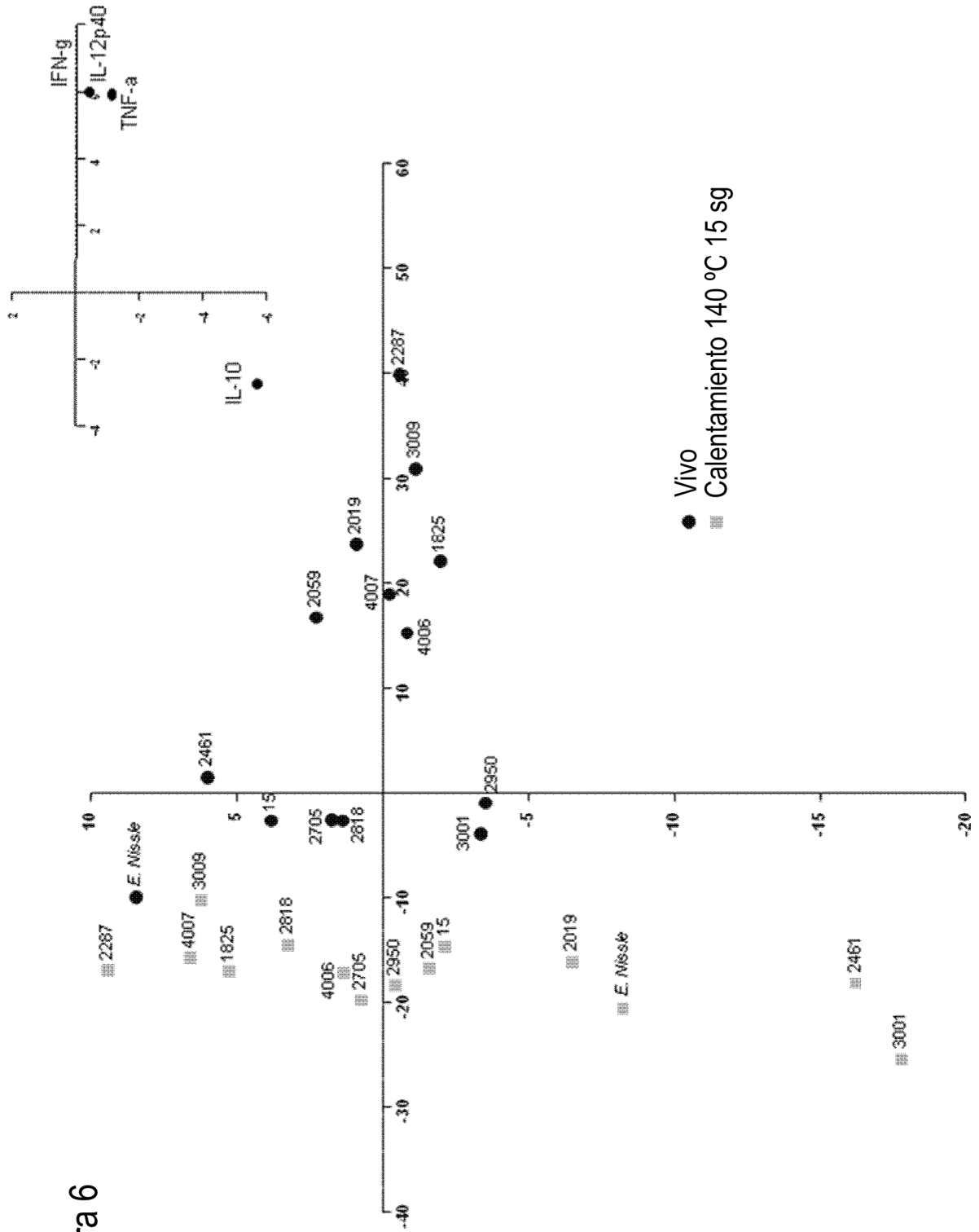


Figura 7

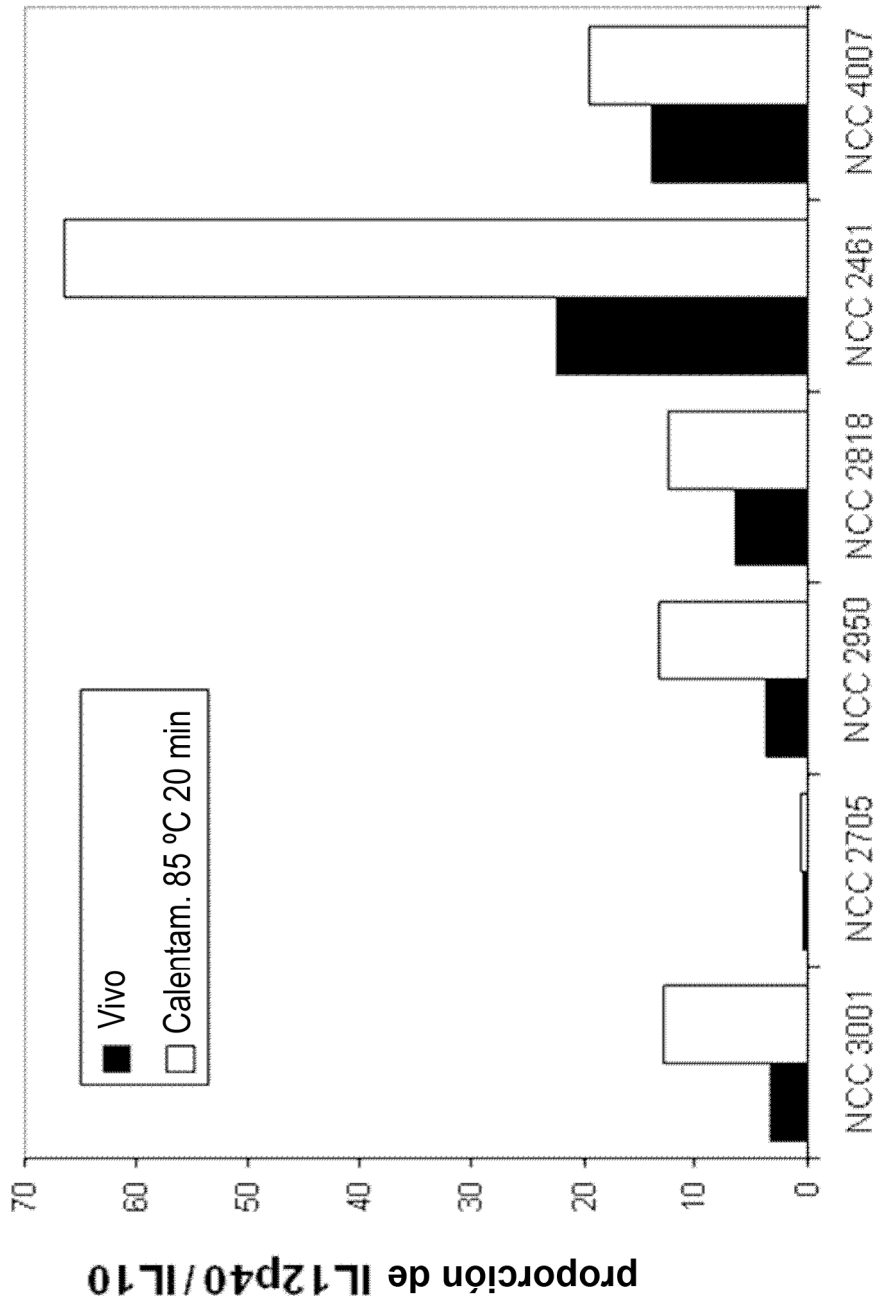


Figura 8

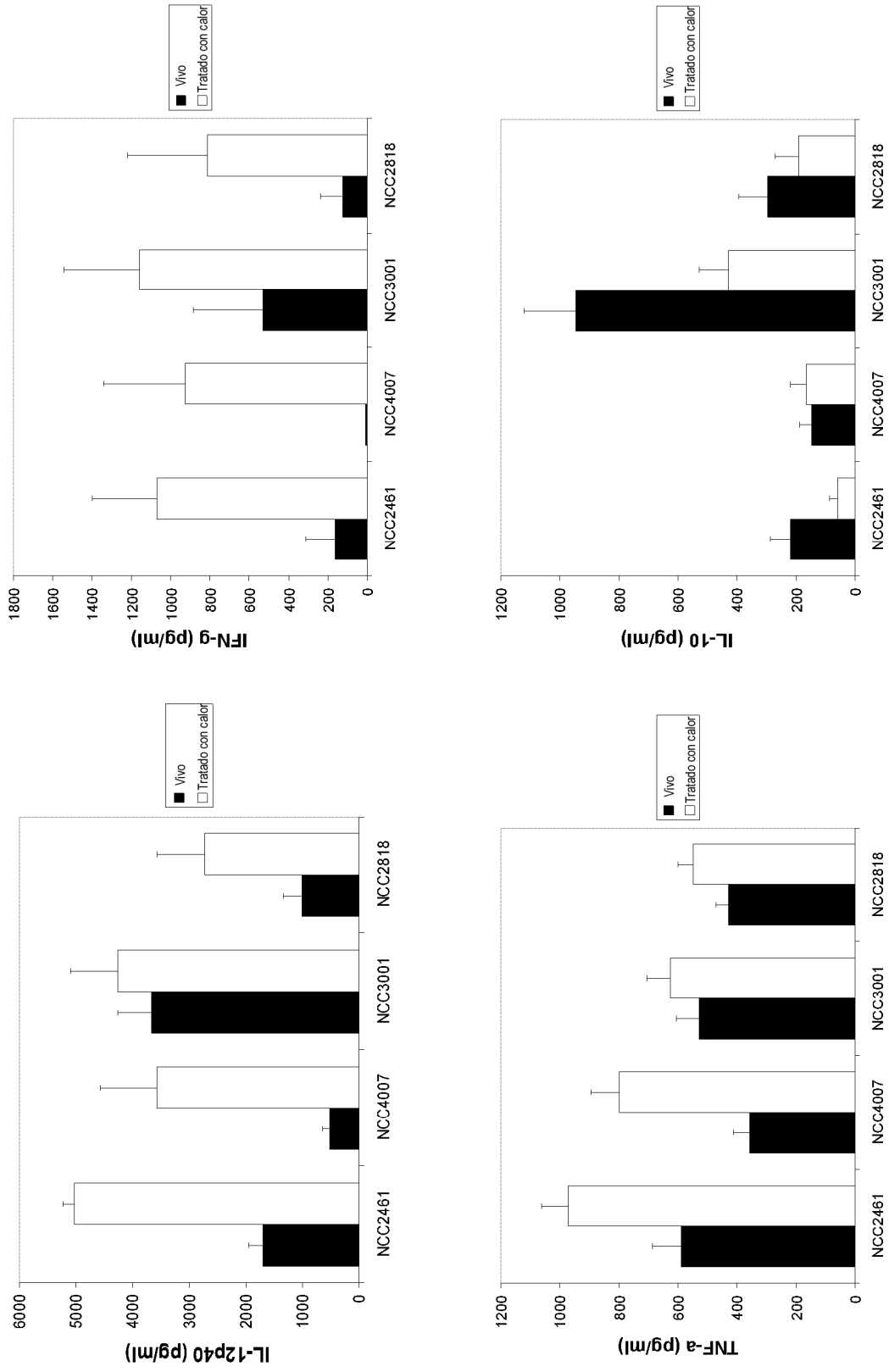


Figura 9

