

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 897**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

A23P 10/30 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A23P 30/40 (2006.01)

A23P 10/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2013 PCT/EP2013/056127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13185941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013 E 13713131 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2861086**

54 Título: **Procedimiento para la producción de un producto en polvo poroso que contiene un probiótico u otros microorganismos**

30 Prioridad:

13.06.2012 EP 12305670

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

04.08.2017

73 Titular/es:

**CLEXTRAL (100.0%)
1 Rue du Colonel Riez
42700 Firminy, FR**

72 Inventor/es:

**COLLADO, MAXIME y
BOUVIER, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 628 897 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

Procedimiento para la producción de un producto en polvo poroso que contiene un probiótico u otros microorganismos

5 **[0001]** La presente invención se refiere a la producción de productos en polvo secados porosos que contienen materiales probióticos u otros microorganismos con niveles elevados de células viables.

10 **[0002]** La preparación de cultivos biológicos altamente viables ha sido objeto de intensa investigación y desarrollo. Una cuestión que sigue causando dificultades es cómo procesar cultivos biológicos en productos alimenticios sin poner en peligro la viabilidad de los cultivos. Los microorganismos probióticos son bacterias que son capaces de producir un efecto beneficioso en el consumidor cuando se ingiere en cantidades suficientes y durante un tiempo suficiente. Existe un gran interés en la incorporación de probióticos en productos alimenticios para crear alimentos funcionales y/o nutracéuticos. Se ha recomendado que los productos probióticos contengan al menos 10^7 microorganismos vivos por g o ufc/g (ufc es la abreviatura de "unidad formadora de colonias"), que ha sido difícil de lograr con la metodología existente. El mantenimiento de la viabilidad de los probióticos durante el procesado ha demostrado ser extremadamente difícil y de gran necesidad de capital, en particular cuando se requieren productos en polvo porosos.

20 **[0003]** Un enfoque para el procesado de cultivos probióticos ha sido el uso de técnicas de liofilización mediante las cuales el contenido de humedad del cultivo se reduce significativamente. Si bien es posible preparar cultivos probióticos secados con altos valores de ufc, esta técnica demanda energía y capital y requiere entre 24 a 48 horas por lote. Este tipo de técnica por lo tanto no es fácilmente susceptible para la producción a gran escala sin una inversión de capital considerable.

25 **[0004]** Las técnicas de secado por pulverización modernos son procesos continuos que se utilizan para preparar rápidamente muchos productos alimenticios secos. Estas técnicas implican típicamente temperaturas de polvo altas (> 60°C) que matan a la mayoría de los microorganismos que conducen a valores más bajos de ufc para el producto procesado. Otras desventajas con el secado por pulverización incluyen el alto consumo de energía, con aproximadamente de 1,8 a aproximadamente 3,8 kg de vapor por kg de agua evaporada, restricciones asociadas al tratamiento del tamaño de partícula, los volúmenes de operación elevadas (que conducen a una gran huella), baja flexibilidad del proceso y una baja adaptabilidad para el procesamiento de las cultivos sensibles a la temperatura, tales como los probióticos y otros microorganismos.

35 **[0005]** Desde un punto de vista comercial, la mejora de la metodología para la producción a gran escala de cultivos biológicos secos con altos valores de ufc es altamente deseable y muy buscado. De este modo, el documento US-A6 010 725, que puede ser considerado como el documento de la técnica anterior más próximo con respecto al procedimiento definido en la reivindicación 1 adjunta, describe un procedimiento para la producción de un producto en polvo poroso que contiene un probiótico. En el documento US-A 6 010 725, un concentrado líquido que comprende microorganismos, proteínas e hidratos de carbono se reduce a un polvo por pulverización en un dispositivo de secado por pulverización. El documento US-A-6 010 725 explica que dicho dispositivo está adaptado del descrito en la Figura 1c de US-A-3 065 076: el concentrado a pulverizar está en una fase líquida con el fin de ser suministrado a través de una bomba y una tubería a una boquilla de pulverización de la cual se descarga el líquido en una cámara de secado. Con el fin de promover la supervivencia de los microorganismos en el polvo seco, el documento US-A-6 010 725 propone seleccionar los parámetros de funcionamiento del dispositivo de secado por pulverización de manera que el tiempo de residencia de las gotitas de líquido pulverizadas del concentrado se ajuste para secar estas gotitas sin elevar la temperatura interna de las gotitas pulverizadas por encima de 40 a 70°C. Justo antes de la boquilla de pulverización, puede introducirse un gas inerte en el concentrado líquido a fin de promover la pulverización, es decir la formación de las gotitas de líquido. En cualquier caso, la enseñanza de la US-A-6 010 725 se basa en la formación de gotitas de líquido del concentrado y controlar el secado de estas gotitas de líquido pulverizadas en una cámara de secado. En la práctica, como se admite en US-A-6 010 725, la implementación del procedimiento de la misma necesita un ajuste fino de algunos parámetros de funcionamiento, lo que hace difícil y costoso una producción a gran escala.

55 **[0006]** Un objetivo de la presente invención es proponer dicha metodología mejorada para la producción de productos en polvo secados porosos que contienen un probiótico u otros microorganismos.

60 **[0007]** Para este fin, el objetivo de la invención es un procedimiento como se define en la reivindicación adjunta 1. Las características ventajosas de este procedimiento se especifican en las reivindicaciones dependientes.

[0008] Gracias a la formación de la espuma estable a partir de un concentrado viscoso preparado, el producto secado poroso producido según la invención no está sometido a altas temperaturas y la reducción logarítmica de los microorganismos vivos es típicamente no superior a aproximadamente 1. Las pruebas de almacenamiento después de tres meses muestran niveles aceptables de supervivencia.

65

[0009] Las realizaciones de la invención se comprenderán mejor a partir de la lectura de la descripción que sigue, que se da únicamente a título de ejemplo y haciendo referencia a los dibujos en los que:

la figura 1 es un diagrama de flujo que muestra una producción de polvo poroso que contiene cultivos según la invención, donde los cultivos se suministran liofilizados, granulados o frescos;

la figura 2 es un diagrama de flujo que muestra una producción de polvo poroso que contiene cultivos según la invención, donde los cultivos se suspenden en el portador antes del secado;

la figura 3 es un diagrama de flujo que muestra una producción de polvo poroso que contiene cultivos según la invención, con el uso de un ciclón y el retorno de partículas finas;

la figura 4 es un diagrama de flujo que muestra una producción de polvo poroso que contiene cultivos según la invención, donde el proceso es un proceso por lotes que comprende dos etapas separadas; y

la figura 5 es un diagrama de flujo que muestra una micrografía electrónica de barrido (SEM) de polvo probiótico poroso obtenido por el procedimiento según la invención.

[0010] Haciendo referencia a la figura 1, es un diagrama esquemático de un proceso de acuerdo con la invención en forma de un diagrama de flujo, que indica los componentes del dispositivo utilizado. Para un dispositivo de tratamiento termomecánico que opera a una presión de aproximadamente 5 bar y una temperatura de aproximadamente 5 a 40°C, cualquiera de las siguientes opciones se pueden añadir (i) un cultivo liofilizado; (ii) un cultivo granulado fundido; y (iii) las células se desarrollan en un cultivo y se someten a un tratamiento de choque y se realiza un aclarado posterior. Las células utilizadas en este procedimiento se utilizan sin la adición de agentes protectores adicionales y aún no se han procesado. La aplicación de un tratamiento de choque al cultivo de microorganismos está diseñado para aumentar la resistencia del microorganismo a las etapas de secado posteriores. El cultivo aclarado se concentra a continuación hasta aproximadamente 15% de sólidos dependiendo del cultivo y se añade a un dispositivo de tratamiento termomecánico que opera a una presión de aproximadamente 5 bar (0,5 MPa) y una temperatura de aproximadamente 15°C.

[0011] A continuación, también se añade una composición de portador líquido al dispositivo de tratamiento termomecánico y los componentes se mezclan para formar un concentrado de cultivo con una viscosidad de aproximadamente 150 mPa.s. Por lo tanto, el producto de partida para el procedimiento según la invención, es decir, el concentrado de cultivo líquido, tiene que estar preparado para ser suficientemente viscoso a la temperatura a la cual se forma este concentrado. En la realización de la figura 1, el concentrado se prepara en el dispositivo de tratamiento termomecánico a una temperatura determinada, este concentrado es tratado por dicho dispositivo de manera que tenga una viscosidad mínima de 150 mPa.s.

[0012] El concentrado de cultivo viscoso se hace avanzar a continuación por el dispositivo termomecánico y se inyecta un gas de grado alimenticio a una presión por debajo de aproximadamente 1,3 MPa en el concentrado. El gas se disuelve y/o dispersa parcialmente en el concentrado para formar una espuma estable con una porosidad definida y con una densidad de entre 0,6 y 1,2 kg/l, más típicamente entre 0,8 y 1,1 kg/l, y más específicamente alrededor de 0,85 kg/l. La disolución y/o dispersión se ven facilitadas por agitación mecánica intensiva para dispersar el gas en el material viscoso para formar la espuma estable dependiendo de la viscosidad del concentrado. La espuma se somete a continuación a una etapa de atomización para formar un producto atomizado e inmediatamente es transportada a una cámara de secado. La cámara de secado es un espacio cerrado en el que el producto atomizado se mezcla con un medio de secado. La temperatura de entrada de los medios de secado es aproximadamente 100 a aproximadamente 200°C y la temperatura de salida es de entre 50 a 80°C. El producto atomizado forma pequeñas gotas espumosas y el agua migra desde el producto a los medios de secado. El medio de secado más común es aire caliente, pero el sistema puede ser configurado para funcionar en condiciones anaerobias, donde se controla la concentración de oxígeno. Dependiendo de la forma de la cámara, la dirección de movimiento del producto y del medio de secado usado, puede controlarse el tiempo de residencia. El producto se descarga en la parte inferior de la cámara, en el lecho fluidizado, en los ciclones o en el colector de polvo con una temperatura del producto no superior a aproximadamente 50°C. Una persona experta en la técnica entenderá, en base a las características de secado del producto que se seca, cuándo se produce la atomización ineficaz y una falta de porosidad afectará a la funcionalidad (densidad, humectabilidad) del producto. Por ejemplo, la viabilidad del recuento celular y las propiedades de rehidratación del producto secado.

[0013] Se puede usar una etapa de secado adicional para reducir aún más el contenido de humedad y la actividad de agua del producto. Con esta configuración, se usa un lecho fluidizado, que comprende una bandeja cerrada, perforada con inyección de aire (caliente) desde la parte inferior a través de la bandeja. Se utilizan vibraciones para ayudar a suspender el producto húmedo en un cojín de aire. En comparación con la cámara de secado que proporciona un secado rápido a temperaturas relativamente altas para eliminar el agua de la superficie del producto, un secador de lecho fluidizado es un secador moderado a temperaturas medias durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, el tiempo de residencia puede ser de hasta 90 minutos en el lecho fluidizado.

[0014] Una de las ventajas importantes de la presente invención es el corto tiempo de residencia del producto en el aparato de secado que contribuye a la alta viabilidad de los microorganismos transformados. El tiempo de residencia del concentrado de cultivo en el dispositivo de tratamiento termomecánico es de aproximadamente 1 minuto, seguido de aproximadamente otros 2 minutos en la cámara de secado, seguido de hasta 90 minutos en el secador de lecho fluidizado. Así, el tiempo total necesario para producir el producto de polvo poroso es de aproximadamente

menos de 95 minutos, que es significativamente más corto que las 48 horas requeridas para el sistema basado en la liofilización.

5 **[0015]** Haciendo referencia a la figura 2, se muestra un diagrama esquemático de un proceso de acuerdo con una realización en forma de un diagrama de flujo, que indica los componentes del dispositivo utilizado. Con esta
 10 realización, se muestra un proceso mediante el cual un cultivo probiótico o de otro microorganismo y una composición de portador adecuado que comprende al menos un hidrato de carbono y al menos una proteína se añaden directamente al dispositivo de tratamiento termomecánico a través de una tolva para formar un concentrado
 15 de cultivo. La temperatura del concentrado de cultivo en el dispositivo se controla cuidadosamente a aproximadamente 5 a 40°C para ayudar en la viabilidad continua del probiótico, y la viscosidad del concentrado de cultivo en el dispositivo es de más de 150 mPa.s. Un ejemplo de un dispositivo de tratamiento termomecánico adecuado es una extrusora de doble husillo (TSE). Otros dispositivos que pueden usarse incluyen una extrusora de husillo único, "votator" o intercambiadores de calor de superficie rascada, etc. Sorprendentemente, se ha encontrado que a pesar de la cizalladura significativa y la mezcla que se produce en la extrusora se mantiene la viabilidad del cultivo.

20 **[0016]** Se inyecta gas de grado alimenticio a presión en el concentrado de cultivo viscoso para formar una espuma estable. La presión, tiempo de residencia, temperatura, grado de agitación (o mezcla) y la cantidad de humedad presente en el concentrado contribuirán a la cantidad de gas que se solubiliza y/o que se dispersa en el concentrado. La espuma se somete a continuación a la atomización, mediante lo cual existe una liberación casi instantánea del gas desde la espuma dando lugar a la eliminación de una parte del agua y la formación de partículas de polvo poroso con una porosidad definida. El polvo parcialmente secado se descarga a continuación en una cámara de secado que recoge y parcialmente seca el producto en polvo. Se utiliza un medio de secado, tal como aire caliente, en la cámara de secado para eliminar más humedad del producto en polvo. Cuando sea necesario, el
 25 secado adicional se puede conseguir mediante el transporte del producto parcialmente secado a un lecho fluidizado. Alternativamente, se podría utilizar un secador de ciclón y a continuación a un pequeño secador por lotes (no se muestra). El tiempo de residencia del producto en cada una de estas etapas (no mostradas) es el tiempo transcurrido desde la entrada en la extrusora para la producción del producto poroso secado final que contiene el probiótico y es de aproximadamente 30 minutos.

30 **[0017]** Haciendo referencia a la figura 3, se muestra un diagrama esquemático de un proceso de acuerdo con una realización en forma de un diagrama de flujo, que indica los componentes del dispositivo utilizado. Con esta realización, la inyección y la mezcla del gas de grado alimenticio se realizan en un dispositivo de tratamiento termomecánico, tal como una extrusora de doble husillo para formar una espuma estable. Esta configuración tiene la
 35 ventaja por la que los parámetros de procesamiento, tales como la velocidad de cizallamiento en la extrusora y la aireación en el aireador, pueden manipularse de forma independiente. La espuma se somete a continuación a atomización, mediante lo cual existe liberación casi instantánea del gas desde la espuma dando lugar a la eliminación de parte del agua y la formación de partículas de polvo poroso con una porosidad definida. El polvo parcialmente secado se descarga a continuación en una cámara de secado que recoge y parcialmente seca el producto en polvo. Se utiliza un medio de secado, tal como aire caliente, en la cámara de secado para eliminar
 40 adicionalmente humedad del producto en polvo. Con esta realización, se consigue el secado adicional mediante el transporte del producto parcialmente secado a un secador de lecho fluidizado, a través de un ciclón de la cual las partículas finas descargadas se reciclan en la cámara de secado aumentando aún más la recuperación de sólidos.

45 **[0018]** Haciendo referencia a la figura 4, se muestra un diagrama esquemático de un proceso por lotes de acuerdo con una realización en forma de un diagrama de flujo, que indica los componentes del dispositivo utilizado. Con esta realización, se muestra un proceso por lotes mediante el cual se añaden un cultivo, portador líquido y gas de grado alimenticio a un tanque sellado para formar espuma estable. La espuma se somete a continuación a atomización, mediante lo cual existe una liberación casi instantánea del gas desde la espuma dando lugar a la eliminación de
 50 parte del agua y la formación de partículas de polvo poroso parcialmente secadas. El secado adicional del polvo poroso parcialmente secado se realiza a continuación en un aparato de secado de lecho fluidizado para dar el producto en polvo poroso final.

55 **[0019]** En la Figura 5 se muestra una micrografía electrónica de barrido (SEM) de un polvo probiótico poroso producido por el procedimiento de la invención. La cepa utilizada fue *Bifidobacterium animalis* BB12. La ampliación de la imagen es de 1800. El polvo se ha molido para mostrar la porosidad en el interior de las partículas. Las partículas molidas muestran poros de menos de 1 µm de diámetro. La foto muestra también la aglomeración secundaria con partículas más pequeñas (1-5 µm) que no han sido rotas durante la molienda.

60 **[0020]** Se entenderá por los expertos en la materia que se pueden hacer numerosas variaciones y/o modificaciones a las realizaciones descritas anteriormente, sin apartarse del alcance de la presente invención. Las presentes realizaciones deben, por lo tanto, considerarse en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas. En algunas realizaciones de la presente invención, un cultivo de un microorganismo, que puede ser una bacteria, levadura, un hongo o una mezcla de estos microorganismos, se prepara mediante el uso de los procedimientos de la
 65 invención. Una persona experta en la materia es capaz de seleccionar el medio de cultivo que sea más adecuado para el crecimiento de los microorganismos.

[0021] El cultivo de microorganismos contiene preferiblemente al menos 10^7 colonias de células vivas por gramo o ufc/g (ufc es la abreviatura de "unidad formadora de colonias"). También puede elegirse concentrar este cultivo, por ejemplo por centrifugación, con el fin de incrementar el título de células vivas a por lo menos 10^8 ufc/g, y preferiblemente a 10^9 - 10^{11} ufc/g.

[0022] Preferiblemente, se prepara un cultivo de al menos un microorganismo seleccionado, pero no limitado, del grupo formado por las bacterias ácido lácticas beneficiosas para la salud humana, por ejemplo, bifidobacterias, tales como *Bifidobacterium infantis*, lactococos, tales como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactic biovar diacetylactis*, estreptococos, tales como *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecalis*, lactobacilos, tales como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus delbrukii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, pediococos, tales como *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, estafilococos, tales como *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, micrococos, tales como *Micrococcus varians*; levaduras especialmente del género *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Saccharomyces*, tales como *Debaromyces hansenii*, *Candida krusei*, *Pichia saitoi*, *Torulopsis holmii*, *Torulopsis versatilis*, *Torulopsis etchellsii*, *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo *S. cerevisiae* NCIMB 40612, *Saccharomyces rouxii*; y hongos especialmente del género *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Penicillium*, tales como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus formosaensis*, *Mucor circinelloides*, *Mucor japonicus*, *Penicillium glaucum* y *Penicillium fuscum*.

[0023] En algunas realizaciones, el microorganismo o microorganismos utilizados de acuerdo con los procedimientos de la presente invención pueden seleccionarse entre el grupo que comprende las siguientes especies: *L. crispatus*, *L. gasserii*, *L. salivarius*, *L. casei*, grupo *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum*, y *B. pseudocatenulatum*.

[0024] La invención es particularmente adecuada para los microorganismos que son sensibles a las condiciones tradicionales de secado por pulverización, especialmente las que son sensibles al calor (termosensibles) y/o a la presencia de aire (preferencialmente anaerobios). Entre los microorganismos que son particularmente sensibles, se pueden incluir las bacterias ácido lácticas probióticas. A modo de ejemplo, se puede utilizar la cepa *Lactobacillus acidophilus*.

[0025] Este cultivo de microorganismos puede comprender además, antes o después de la fermentación, al menos un agente de protección química conocido para mejorar la supervivencia de los microorganismos durante los procedimientos de la presente invención y/o durante la conservación del polvo. Los expertos en la materia tienen abundante literatura sobre estos agentes de protección. Como guía general, estos agentes de protección son típicamente vitaminas, tales como ácido ascórbico, aminoácidos o sus sales, tales como lisina, cisteína, glicina y glutamato de sodio, proteínas o hidrolizados de proteínas que se pueden obtener a partir de leche o de soja, azúcares tales como lactosa, trehalosa, sacarosa, dextrina y maltodextrina, y grasas, tales como grasa de mantequilla (aceite de mantequilla), grasa de palma, de cacahuete, de cacao, de colza o de soja, por ejemplo. Estos agentes de protección pueden añadirse al cultivo en una cantidad de aproximadamente el 0,1 al 80% en peso, por ejemplo. Una etapa de procesamiento central (por ejemplo, homogeneización), no descrita en esta patente, puede ser necesario incorporar estos agentes de protección con el cultivo.

[0026] Si se desea un polvo que consiste principalmente de microorganismos, el cultivo de microorganismos puede procesarse mediante los procedimientos de la presente invención. Por otro lado, si se desea una composición alimenticia deshidratada, fácilmente dispersable en agua y que comprende tales microorganismos vivos, es preferible secar al mismo tiempo todos los componentes de esta composición en lugar de prepararla mediante la mezcla de los diversos constituyentes ya en formas secas. La formación de grumos o de precipitados indeseables se evita de este modo.

[0027] En una realización de la invención, el componente probiótico contiene de una a seis cepas, preferiblemente de una a tres cepas elegidas de entre las especies probióticas mencionadas anteriormente.

[0028] El probiótico puede mezclarse con un material prebiótico o ser parte de un material simbiótico.

[0029] El término prebiótico significa una sustancia tal como una proteína, péptido, o hidrato de carbono que proporciona nutrientes para el probiótico o ayuda al probiótico.

[0030] Normalmente, los prebióticos no pueden ser digeridos en el tracto intestinal superior. Las fuentes dietéticas tradicionales de prebióticos incluyen la soja, fuentes de inulina (tales como la alcachofa de Jerusalén, jicama, y la raíz de achicoria), avena cruda, trigo sin refinar, cebada sin refinar y yacón. Los hidratos de carbono de prebiótico incluyen almidón resistente, almidón de patata o almidón con amilosa elevada, tal como Starplus, almidones modificados (incluyendo almidones carboxilados, acetilados, propionados, y almidones butirados), oligosacáridos no digeribles tales como fructo-, gluco-, xilo, soja-, galacto-, leche-, inulin-, arabinosilanos, arabinogalactanos,

galactomananos o productos de digestión de éstos, pero sin excluir otros oligosacáridos capaces de ejercer efectos prebióticos.

5 **[0031]** A lo largo de esta memoria el término simbiótica o simbiótico significa una combinación de un probiótico y un prebiótico que en conjunto tienen un efecto beneficioso sinérgico sobre la salud humana.

[0032] Los cultivos de microorganismos útiles en la práctica de la presente invención se pueden obtener de una variedad de fuentes, incluyendo, pero no limitado a:

10 un cultivo de microorganismos líquido suministrado después del aclarado, centrifugación o ultrafiltración;
un cultivo de microorganismos suministrado después de la liofilización, secado al vacío o secado por microondas de un cultivo; y

una cultivo de microorganismos desarrollados en el interior del tanque de almacenamiento, dispositivo de tratamiento termomecánico, intercambiador de calor de superficie, recipientes agitados/mezclados, etc.

15 **[0033]** El dispositivo de tratamiento termomecánico útil en la práctica de la presente invención pueden tener la forma de una extrusora de doble husillo, extrusora de husillo único, "votator", intercambiadores de calor de superficie raspada, etc. En ciertas realizaciones, el dispositivo de tratamiento termomecánico es una extrusora de doble husillo (TSE), que permite un buen control de la temperatura y la velocidad de cizallamiento. En el caso de una extrusora de doble husillo cogiratorio, el diseño del dispositivo puede tener elementos de husillo intercambiables y en forma modular, lo que permite una variedad de opciones de procesamiento dentro de la misma máquina. Se pueden utilizar otros dispositivos como extrusora de husillo único (SSE), siempre y cuando se pueda configurar para tener al menos una zona de transporte y/o mezcla. En una realización preferida, el dispositivo de tratamiento termomecánico es un recipiente sellado herméticamente. Por ejemplo, el uso de extrusora de doble husillo permite el control fino de la temperatura, y proporciona una velocidad de cizalladura controlada para concentrados líquidos que requieran pseudoplasticidad.

[0034] La temperatura dentro del dispositivo de tratamiento termomecánico se mantiene entre 5 y 40°C. Preferiblemente entre 25 y 35°C, más preferiblemente a aproximadamente 30°C.

30 **[0035]** La composición de portador puede ser cualquier material adecuado que tenga una Tg inferior a aproximadamente 70°C. Los materiales adecuados que se pueden incluir en la composición de portador incluyen, por ejemplo, maltodextrina, azúcares de temperatura de transición vítrea alta, es decir, azúcares que tienen temperatura de transición vítrea superior a 55°C (lactosa, maltosa y sacarosa), gomas solubles en agua (acacia, guar, xantano), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), alginatos, pectina, polvos de leche, hidratos de carbono, proteínas, etc. Preferiblemente, la composición de portador comprende al menos un hidrato de carbono y al menos una proteína. Se pueden añadir excipientes adicionales a la composición de portador para, por ejemplo, estabilizar adicionalmente el microorganismo o el producto. La elección de los excipientes adecuados dependerá del microorganismo y serán conocidos por la persona experta en la materia, por ejemplo, los excipientes adecuados incluyen leche entera en polvo (FCMP), leche en polvo descremada (SMP) y maltodextrina.

40 **[0036]** La composición de portador puede añadirse como un polvo junto con una cantidad apropiada de agua para formar el concentrado de cultivo con la viscosidad requerida. Alternativamente, la composición de portador puede añadirse como un concentrado a partir de una emulsión, una evaporación o rehidratación. La composición del portador también puede hacerse a partir de productos líquidos y sólidos mezclados en el dispositivo de tratamiento termomecánico.

50 **[0037]** La viscosidad del cultivo líquido puede ser inicialmente de al menos aproximadamente 50 mPa.s. Después de una preparación apropiada del concentrado, por ejemplo después de añadir ayudantes del proceso y excipientes y/o después de aplicar un primer tratamiento termomecánico, la viscosidad del concentrado a la temperatura de funcionamiento del mismo es de entre 150 mPa.s y 10.000 mPa.s, siendo la temperatura de funcionamiento antes mencionada del concentrado entre 5 y 40°C según el procedimiento de la invención. En la práctica, los valores de la viscosidad corresponden a mediciones de RVA, es decir, mediciones con un analizador Rapid Visco Analyser.

55 **[0038]** El gas de grado alimenticio usada en el procedimiento de la invención es preferiblemente sustancialmente no reactiva hacia el microorganismo que se procesa y debe ser adecuado para la preparación de alimentos. El gas de grado alimenticio puede seleccionarse del grupo que consiste en dióxido de carbono, oxígeno, argón, nitrógeno, dióxido de nitrógeno, aire, o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el gas de grado alimenticio es dióxido de carbono.

60 **[0039]** La presión del gas inyectado depende de las propiedades deseadas del producto poroso resultante. En una realización preferida, la presión del gas de grado alimenticio inyectado cambiará dependiendo de la presión en el dispositivo de tratamiento termomecánico: mínimo 0,3 MPa (3 bar) con una presión típica de 1,3 MPa (13 bar).

65 **[0040]** El gas puede inyectarse en el dispositivo de tratamiento termomecánico o en un dispositivo de aireación separada o en ambos dispositivos. El gas inyectado puede ser diferente y en diferentes cantidades en ambos dispositivos.

[0041] La espuma se transporta a continuación a una cámara de secado donde tiene lugar una expansión súbita de gas después de una caída en la presión de al menos aproximadamente 0,2 MPa (2 bar). En este punto, la espuma se somete inicialmente a una etapa de atomización, mediante la cual se fuerza a través de un pequeño orificio y se pulveriza en la cámara de secado en una corriente de aire caliente que da lugar a un secado rápido.

[0042] El contenido de humedad de la espuma se reduce posteriormente en una cámara de secado. La espuma es forzada a través de una boquilla. La energía para romper la espuma en pequeñas gotas espumosas es aportada por el gas de atomización a entre 0,3 y 1,5 MPa (3 y 15 bar). La temperatura del aire de entrada es de entre 100 y 200°C para obtener una temperatura del aire de salida de aproximadamente 60 a 70°C. La temperatura del polvo en esta etapa no supera aproximadamente 40 a 50°C. Mientras que sale de la boquilla, la presión de la espuma va desde aproximadamente 0,3 MPa a 1,2 MPa (0,3 a 12 bar) a aproximadamente la presión atmosférica y una parte del gas es liberado de la espuma provocando una expansión súbita de gas. Con esta expansión, el gas extrae parte de la humedad del producto, aumenta el tamaño de las partículas y la liberación de gas crea la estructura porosa. Entonces menos agua tiene que eliminarse por el calor y la superficie de las partículas es más grande, por tanto, sólo se necesitan unos pocos segundos para secar las partículas de polvo en el secador. El área de superficie expuesta de las partículas puede ser de hasta dos veces el área de superficie de las partículas secadas por pulverización. La humedad del polvo después de esta etapa es de entre 5 y 10% con un porcentaje de sólidos totales de aproximadamente 90 a 95%.

[0043] Durante la etapa final del procedimiento, el polvo se seca a continuación hasta un nivel de humedad inferior a 5%, preferiblemente inferior al 3%, y una actividad de agua inferior a 0,25 A_w , preferiblemente entre 0,1 y 0,25 A_w , más preferiblemente alrededor de 0,15 A_w , cuando la actividad de agua se mide a 20°C. La temperatura se ajusta para disminuir la temperatura del polvo que debe estar a temperatura ambiente al final del proceso. Esta etapa se puede producir junto con el secado, mientras que se recoge el polvo, o en un lecho fluidizado.

[0044] La porosidad y el total de sólidos controlan la densidad aparente del producto en polvo. Por lo tanto, utilizando el procedimiento descrito en el Schuck P., Dolivet A., Jeantet R. (2012) Analytical methods for food and dairy powders (Wiley-Blackwell, Oxford), páginas 145-154, la densidad aparente del producto es ventajosamente entre 0,2 y 0,6 g/cm³, preferiblemente alrededor de 0,3 g/cm³. Además, el producto en polvo puede ser polvo de flujo libre, con un tamaño de partículas entre 30 µm y 200 µm. El uso de una extrusora como la máquina de tratamiento termomecánico permite que se lleve a cabo una plastificación termomecánica/trabajo de mezclado en el concentrado, lo que permite, en particular, la mezcla, la combinación y el cizallamiento del concentrado con el fin de llegar finalmente a un concentrado homogéneo. La máquina de extrusión también tiene la ventaja de permitir un proceso de tratamiento continuo.

[0045] Opcionalmente, la etapa final del procedimiento va seguida por la aglomeración para producir un polvo aglomerado.

[0046] La presente invención se describe con mayor detalle a continuación con la ayuda de los siguientes ejemplos no limitativos. Los porcentajes se dan en peso a menos que se indique lo contrario. No hace falta decir, sin embargo, que estos ejemplos se dan a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ninguna manera una limitación.

Ejemplo 1: Preparación de un polvo poroso de *Lactobacillus helveticus*

[0047] Se añadieron respectivamente un cultivo de bacterias de *Lactobacillus helveticus* (23 kg/h (4% de sólidos totales (TS)) y un portador compuesto de leche entera en polvo (35 kg/h (95% TS)) a través de una bomba y una tolva, a una extrusora de doble husillo (TSE) que opera a 450 rpm, 0,5 MPa (5 bar) de presión y a 15°C para formar un concentrado de cultivo bacteriano a 59% de TS. La mezcla a fondo y el cizallamiento mecánico del concentrado en la extrusora de doble husillo fue seguido por una inyección de CO₂ a una presión de al menos 1,3 MPa (13 bar) en el aireador para formar una espuma estable. La espuma se transporta a continuación a una cámara de secado a través de una etapa atomizadora, mediante la cual la presión se reduce a presión sustancialmente atmosférica para formar un polvo poroso. Se utiliza aire caliente como medio de secado para eliminar la humedad del polvo a una temperatura inicial de entre 140 y 150°C (entrada) y una temperatura de salida de 68°C. La temperatura del polvo se midió a 46°C. Una actividad de agua particularmente preferida del polvo es 0,15 A_w y el polvo probiótico poroso resultante tiene un contenido de humedad del 4,3%.

Ejemplo 2: Preparación de un polvo poroso de *Lactobacillus rhamnosus*

[0048] Se añadieron bacterias (*Lactobacillus rhamnosus* GG, 5% TS) y una composición de portador que comprende una mezcla de proteínas y hidratos de carbono (leche entera en polvo reconstituida, 95% de TS) a una extrusora de doble husillo a tasas respectivas de 24 kg/h y 30 kg/h. Los dos componentes se sometieron a mezclado y cizallamiento en la extrusora a una velocidad de husillo de 320 rpm, presión de 0,1 MPa (10 bar) y una temperatura de 20°C para formar un concentrado de cultivo con un total de sólidos del 55% y una viscosidad de más de aproximadamente 200 mPa.s. A continuación, se inyectó dióxido de carbono presurizado a una presión de 1,3 MPa (13 bar) en el concentrado y la espuma resultante se transportó a una cámara de secado a través de un atomizador

en donde la presión se disminuyó hasta la atmosférica en la cámara de secado. Se utilizó aire caliente como medio de secado a una temperatura de entrada de 140-170°C y una temperatura de salida de 68°C para formar un polvo poroso que contenía la bacteria.

5 Ejemplo 3: Viabilidad de probióticos secados porosos - *Bb12*, *L. casei* y *L. acidophilus*

[0049] Se ensayó la viabilidad de seis muestras de probióticos se ensayó de la siguiente manera:

- Tres muestras líquidas: *Bb12*, *L. casei* y *L. acidophilus*, respectivamente, antes de secar (~16% TS, proporcionadas por MG).

10 - Tres polvos de *BB12*, *L. casei* y *L. acidophilus* secados porosos, respectivamente.

[0050] Se inoculó *Bb12* en agar clostridial reforzado (RCA, pH 6,8). *L. casei* y *L. acidophilus* se inocularon en agar deMan Rogosa Sharpe (MRS, pH 6,2). Las colonias se cultivaron en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 h. La viabilidad se representó como unidad formadora de colonias (UFC) por ml (UFC/ml), para muestras líquidas, o UFC por gramo (UFC/g), para muestras secas. Para el cálculo de la pérdida en la viabilidad de probiótico a través del secado, los recuentos de UFC/ml de las muestras líquidas se convirtieron en UFC/g usando el contenido de sólidos totales (TS) de las muestras líquidas usando la siguiente ecuación:

$$(UFC/g)_{\text{antes de secado}} = (UFC/ml)_{\text{antes de secado}}/TS$$

20

y la pérdida de viabilidad a través de secado se calculó a continuación utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de viabilidad a través del secado} = \text{Log}_{10}(\text{UFC/g})_{\text{antes del secado}} - \text{Log}_{10}(\text{UFC/g})_{\text{después del secado}}$$

25 [0051] Se analizó la viabilidad de *Bb12*, *L. casei* y *L. acidophilus* antes y después del secado y se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Viabilidad de muestras probióticas antes y después de probióticos del secado por porosidad

| Muestra ID | Viabilidad | | Sólidos totales de muestras líquidas (% TS) (proporcionado por MG) | Pérdida de viabilidad a través de unidades \log_{10} e secado |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|--|---|
| | Antes del secado (UFC/ml) | Después del secado (UFC/ml) | | |
| <i>Bb12</i> | $(1,27 \pm 0,09) \times 10^{11}$ | $(2,56 \pm 0,20) \times 10^{11}$ | 16,0 | 0,49 |
| <i>Bb12</i> | $1,2 \times 10^{11}$ | $3,23 \times 10^{11}$ | 16,0 | 0,35 |
| <i>L. casei</i> | $(1,13 \pm 0,33) \times 10^{10}$ | $(1,63 \pm 0,04) \times 10^{10}$ | 16,0 | 0,64 |

30 [0052] La viabilidad de *Bb12* antes y después del secado fue $(1,27 \pm 0,09) \times 10^{11}$ UFC/ml y $(2,56 \pm 0,20) \times 10^{11}$ UFC/g, respectivamente. La viabilidad de *L. casei* antes y después del secado fue $(1,13 \pm 0,33) \times 10^9$ UFC/ml y $(1,63 \pm 0,04) \times 10^{10}$ UFC/g, respectivamente.

Ejemplo 4: Viabilidad de probióticos secados porosos después de 90 días de almacenamiento a 4°C

35

[0053] La viabilidad de los probióticos secados con porosidad se examinó después de haber sido almacenado a 4°C durante 90 días tal como se muestra en la Tabla 2. Se encontró que la reducción logarítmica en el polvo después del almacenamiento a 4°C durante 90 días fue de 0,40.

40

45

50

55

Tabla 2: Viabilidad de los probióticos procesados

| | Fecha de secado | Tamaño de lote | Gas | Alimentación de líquido | | Viabilidad después de secado | | Viabilidad después de almacenamiento | | | | | |
|---------------------------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------------|---------|------------------------------|----------|--------------------------------------|-------------|----------|----------------------------|---------------------|--|
| | | | | cfu/ml | cfu/g | cfu/g | log loss | duración | temperatura | cfu/g | log pérdida/almacenamiento | log pérdida/líquido | |
| BB12 <i>Lb. casei</i> | 19/09/2011 | 500 ml | N ₂ O | 1,4E+11 | 8,4E+11 | 1,8E+11 | -0,68 | 6 meses | Nevera | 3,61E+10 | -0,69 | -1,37 | |
| | 19/09/2011 | 500 ml | N ₂ O | 1,8E+10 | 1,1E+11 | 1,9E+10 | -0,77 | | | | | | |
| BB12 | 30/11/2011 | 3 L | CO ₂ | 6,3E+10 | 3,9E+11 | 2,6E+11 | -0,18 | 3 meses | Nevera | 2,1E+11 | -0,09 | -0,27 | |
| | 30/11/2011 | 3 L | CO ₂ | 5,0E+10 | 3,1E+11 | 2,7E+11 | -0,06 | 3 meses | Ambiente | 1,0E+03 | -8,41 | -8,59 | |
| BB12 | 19/12/2011 | 3 L | CO ₂ | 1,3E+11 | 8,1E+11 | 3,2E+11 | -0,40 | 3 meses | Nevera | 1,2E+11 | -0,43 | -0,83 | |
| BB12 | 19/03/2012 | 5 L | CO ₂ | 6,6E+10 | 4,1E+11 | 1,5E+11 | -0,43 | 3 meses | Ambiente | 1,21E+07 | -4,43 | -4,82 | |

Nota: Los números log de pérdida positivos son debidos a la desviación estándar

Ejemplo 5: Preparación de *Bifidobacterium animalis* poroso en procesos por lotes

- 5 **[0054]** Los gránulos congelados de bacterias (10^{11} a 10^{12} ufc/g) se funden en un baño de agua a 40°C y se mezclan con un concentrado UHT a base de leche y una solución tampón de pH (pH = 6.2). La proporción de la mezcla es 1:1 y su concentración final es el 18% de sólidos totales. Se preparan tres litros de concentrado y se vierten en un recipiente de 5L. Una vez que se sella el recipiente, se inyecta gas CO₂ hasta que la presión alcanza 0,5 MPa. A continuación, el recipiente se agita para crear una espuma. El recipiente está conectado a través de su línea de salida a una tobera que atomiza el producto en una cámara de secado. El polvo seco se recoge y se seca
- 10 adicionalmente en un secador de lecho fluidizado a escala pequeña para alcanzar una actividad de agua de 0,15. El polvo se envasa a continuación en bolsas de aluminio con nitrógeno. Después de contar las células vivas tanto en el concentrado como en el polvo, las cifras son $8,1 \times 10^{11}$ ufc/g y $3,2 \times 10^{11}$ ufc/g. La pérdida de viabilidad es 0,40 log.
- 15 **[0055]** Se entenderá por las personas expertas en la técnica que se pueden realizar numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención tal como se muestra en las realizaciones específicas sin apartarse del alcance de la invención reivindicada. Las presentes realizaciones, por tanto, deben considerarse en todos los aspectos ilustrativas y no limitativas.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de un producto en polvo poroso que contiene un microorganismo, a partir de un concentrado líquido que comprende al menos un cultivo de microorganismo líquido y una composición de portador, comprendiendo la composición de portador al menos un hidrato de carbono y al menos una proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 i) preparar el concentrado líquido para que tenga una temperatura entre 5 y 40°C y para que tenga, a la temperatura del concentrado preparado, una viscosidad superior a 150 mPa.s;
- 10 ii) inyectar un gas de grado alimenticio en el concentrado preparado a una presión superior a 0,3 MPa para incorporar íntimamente el gas en el concentrado líquido y formar una espuma estable con una densidad entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 1,2 kg/l;
- 15 iii) transportar la espuma a un dispositivo de atomización, en el que la presión de la espuma se reduce desde 0,3 MPa a presión atmosférica para proporcionar un producto parcialmente secado; y
- iv) exponer el producto parcialmente secado a un medio de secado para reducir el contenido de humedad a menos del 5% de humedad y la actividad de agua a menos de 0,25 A_w , cuando se mide a 20°C, y para proporcionar el producto en polvo poroso, en el que la temperatura del producto en polvo poroso en la etapa (iv) no supera los 50°C.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la temperatura del concentrado preparado es de 25 a 35°C, y preferiblemente de aproximadamente 30°C.
- 20 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la densidad está entre 0,8 y 1,1 kg/l, más específicamente alrededor de 0,85 kg/l.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gas de grado alimenticio se selecciona del grupo que consiste en dióxido de carbono, oxígeno, argón, nitrógeno, dióxido de nitrógeno, aire, o mezclas de los mismos.
- 25 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición de portador comprende maltodextrina, azúcares que tienen una temperatura de transición vítrea superior a 55°C, tal como lactosa, maltosa y sacarosa, gomas solubles en agua, tales como acacia, guar o xantana, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), alginatos, pectina, polvos de leche, hidratos de carbono, proteínas, o mezclas de los mismos, con el fin de ayudar al concentrado de cultivo líquido a formar espuma y a disolver el gas.
- 30 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (iv) comprende una primera subetapa en la que el producto secado parcialmente se descarga en una cámara de secado.
- 35 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la etapa (iv) comprende además una segunda subetapa, que es posterior a la primera subetapa y que se lleva a cabo en un lecho fluidizado.
- 40 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, en la etapa (iv), la actividad de agua del producto parcialmente secado se reduce a entre 0,1 y 0,25 A_w , cuando se mide a 20°C, preferiblemente a alrededor de 0,15 A_w , cuando se mide a 20°C.
- 45 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la densidad aparente del producto en polvo poroso está entre 0,2 g/cm³ y 0,6 g/cm³, y preferiblemente alrededor de 0,3 g/cm³.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto en polvo poroso es un polvo de flujo libre, con un tamaño de partículas entre 30 µm y 200 µm.
- 50 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias, levaduras, hongos y probióticos.
12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (ii) se lleva a cabo en un tanque sellado herméticamente que opera a través de un proceso por lotes.
- 55 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa (ii) se lleva a cabo en un dispositivo de tratamiento termomecánico que opera a través de un proceso continuo, seleccionándose este dispositivo de tratamiento termomecánico preferiblemente del grupo que comprende una extrusora de husillo único, extrusora de doble husillo, "votator" e intercambiadores de calor de superficie raspada.
- 60 14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que la etapa (i) también se lleva a cabo en el dispositivo de tratamiento termomecánico que está configurado para llevar a cabo continuamente las etapas (i) y (ii).
- 65 15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (iv) va seguida por aglomeración.

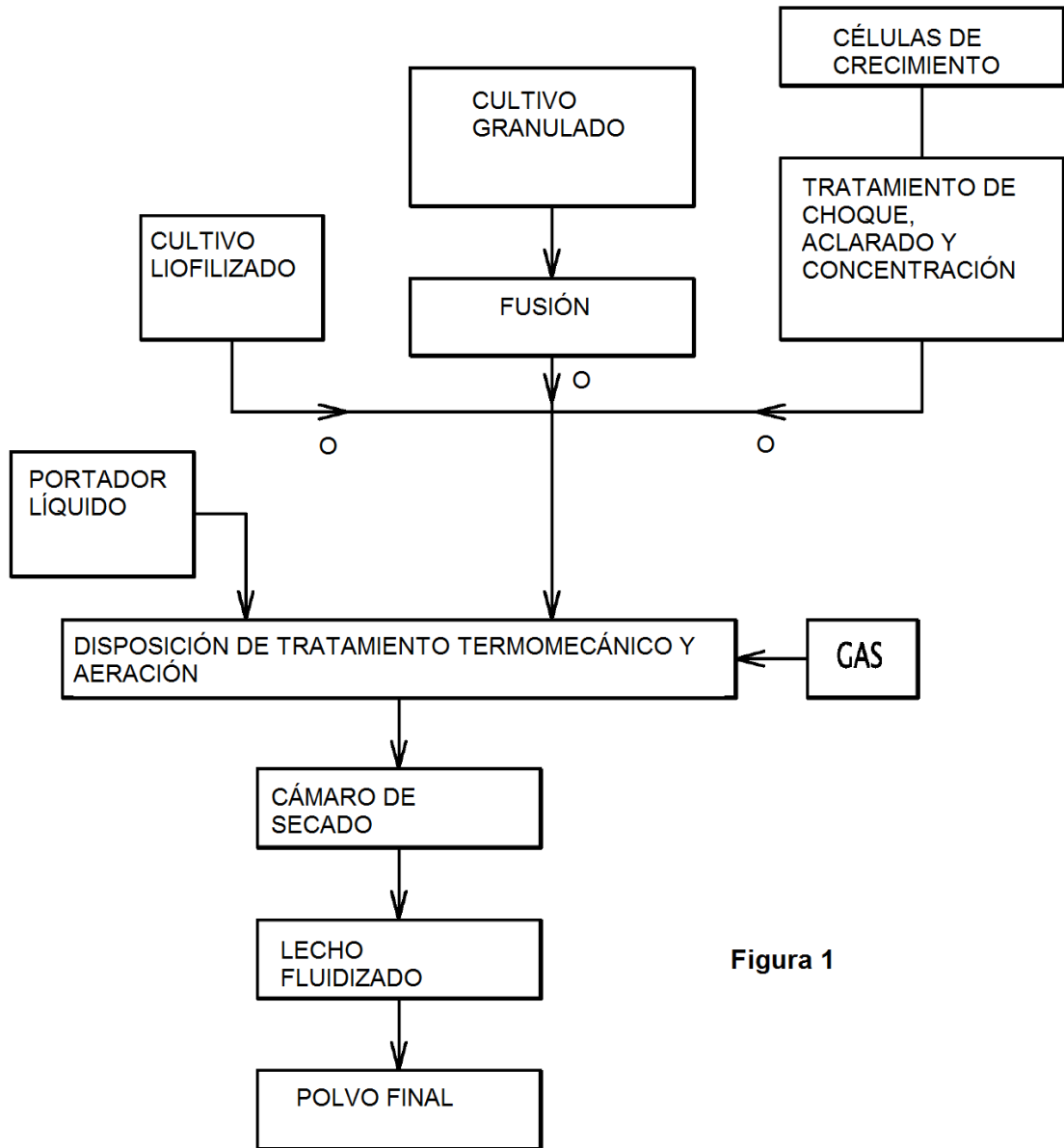


Figura 1

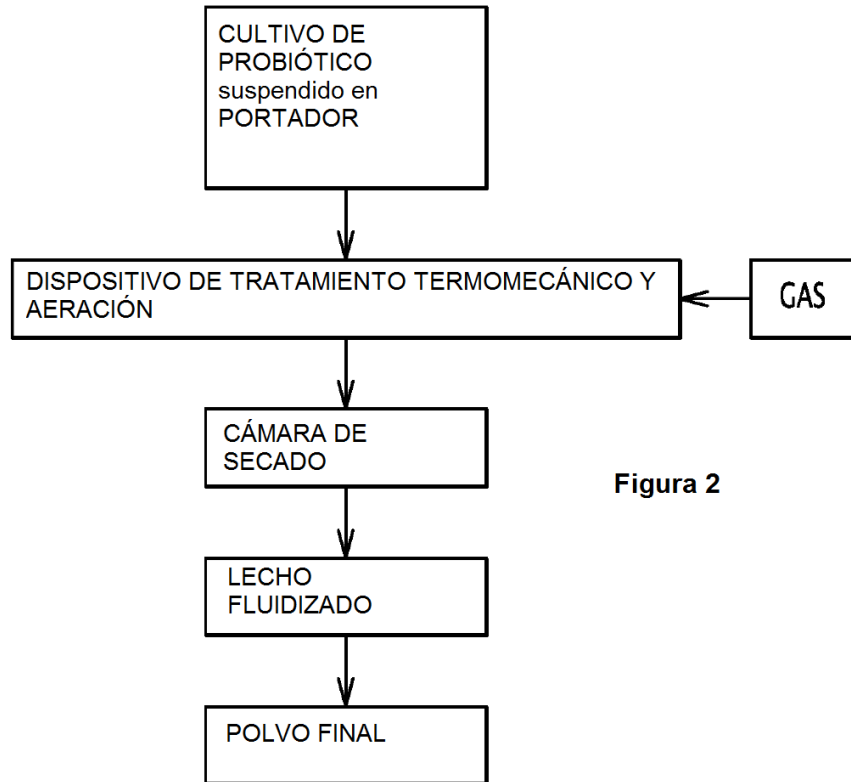


Figura 2

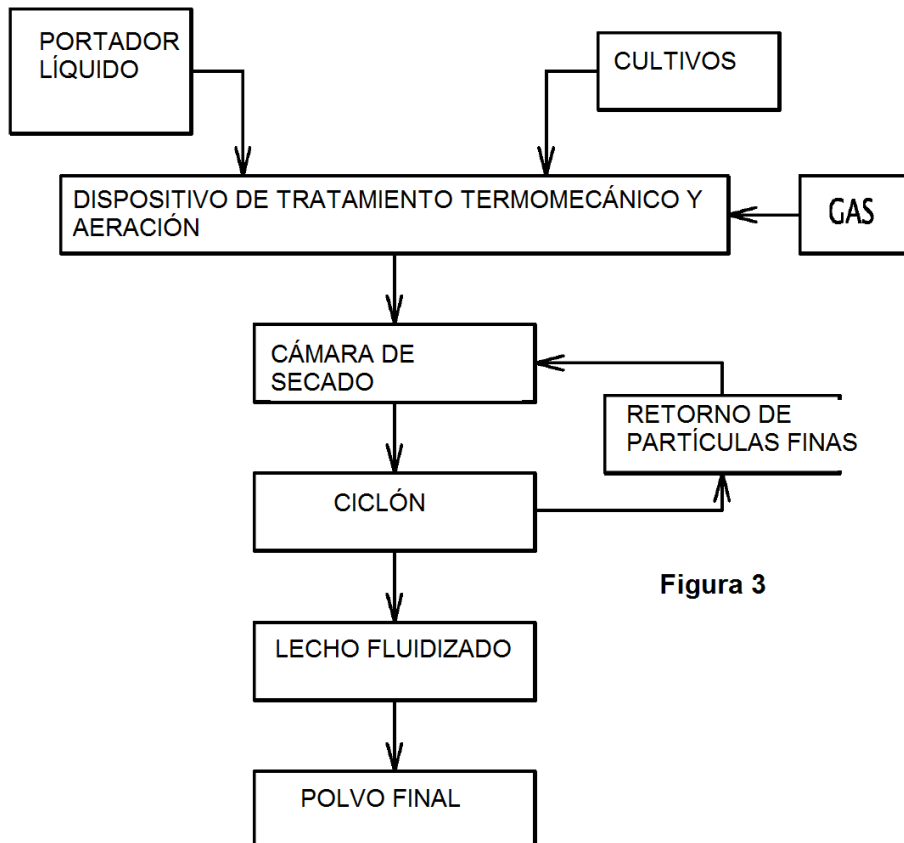


Figura 3

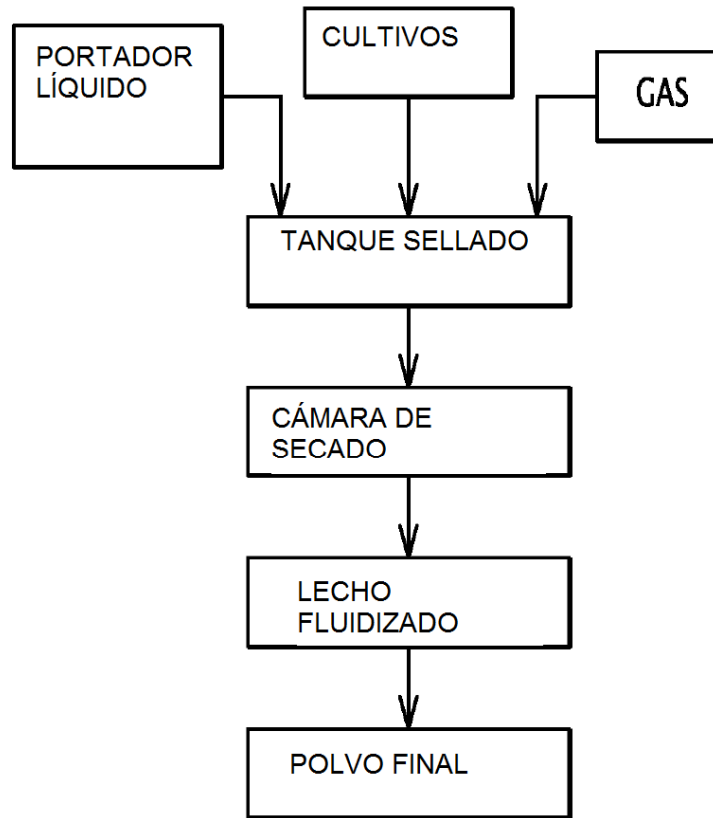


Figura 4

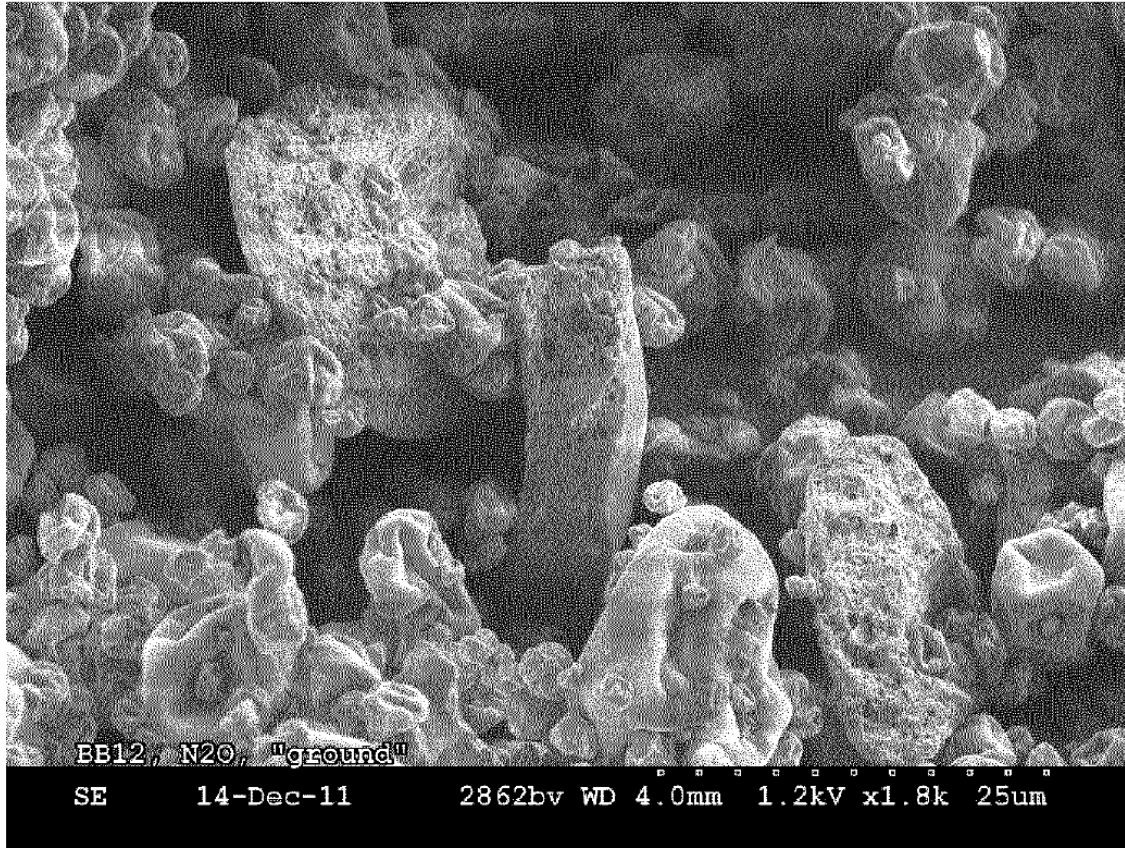


Figura 5