

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 794**

51 Int. Cl.:

**A23K 20/195** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2011 PCT/KR2011/008090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12060579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 11838184 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2647694**

54 Título: **Biomasa muerta de lactobacilos para uso antimicrobiano y su método de producción**

30 Prioridad:

**27.10.2011 KR 20110110381**  
**04.11.2010 KR 20100108971**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.04.2018**

73 Titular/es:

**CELL BIOTECH CO., LTD. (50.0%)**  
**134 Gaegok-ri Wolgot-myeon Gimpo-si**  
**Gyeonggi-do 415-872, KR y**  
**CHUNG, MYUNG-JUN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHUNG, MYUNG JUN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 663 794 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**

Biomasa muerta de lactobacilos para uso antimicrobiano y su método de producción

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un material antibacteriano que comprende un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado seco, y más particularmente, a un material antibacteriano que comprende un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas que tiene una apariencia homogénea y una excelente actividad antibacteriana y preparado mediante un proceso de calentamiento indirecto a una temperatura y caudal apropiados en un intercambiador de calor, un proceso de enfriamiento rápido para la tindalización, un proceso de secado en lecho fluidizado y un proceso de liofilización y un método para preparar el material antibacteriano.

Estado de la técnica

15 En general, las bacterias lácticas vivas se depositan en el intestino y tienen diversas actividades fisiológicas para activar el movimiento intestinal, inhibir bacterias dañinas, reducir el colesterol en la sangre y proporcionar un efecto anticancerígeno. Por otro lado, debido al ácido láctico y al material fisiológico activo (material antibacteriano activo) generalmente generado por las bacterias lácticas, el liofilizado de bacterias secadas por congelación y tindalizadas (incluido el liofilizado de bacterias muertas) aumenta la acidez intestinal y ralentizan el movimiento peristáltico en el intestino delgado y ayudan a la absorción digestiva, y controlan el movimiento intestinal en el intestino grueso para prevenir la diarrea.

20 Es decir, E. coli y Enterococcus que son bacterias intestinales entre la flora intestinal se incrementan en los intestinos y por lo tanto se produce diarrea intratable. Un material tindalizado y liofilizado (antibacteriano activo) de bacterias lácticas y su caldo fermentado inhiben el crecimiento de bacterias dañinas y, por lo tanto, proporcionan una mejora para la diarrea. Además, una de sus funciones esenciales es una función de refuerzo de la inmunidad. Como mecanismo de defensa del cuerpo, para curar y prevenir enfermedades, un material tindalizado y liofilizado (muerto) de bacterias lácticas, activa los macrófagos para detectar bacterias dañinas en un sistema inmune para detectar rápidamente bacterias y virus, y genera interferón gamma para aumentar la inmunidad y hacer frente a una enfermedad.

25 Un proceso convencional de preparación de un material tindalizado y liofilizado de bacterias lácticas es como se ilustra en la FIG. 1.

30 Los procesos de tindalización, liofilización y molienda se llevan a cabo en un caldo fermentado de bacterias lácticas. En este caso, el proceso de tindalización se realiza tindalizando el caldo fermentado de 60 a 120°C durante 10 a 60 minutos utilizando un recipiente a presión, y luego se enfría rápidamente el caldo fermentado a una temperatura igual o inferior a 20°C. Sin embargo, en el método de tindalización convencional descrito anteriormente, debido a la carbonización durante la tindalización, la aparición de bacterias lácticas muertas es muy mala, la tindalización no se lleva a cabo apropiadamente y, por lo tanto, la relación de bacterias lácticas vivas es excesivamente alta.

35 En forma más detallada, si se aumenta la temperatura de tindalización, las bacterias lácticas tindalizadas y liofilizadas completamente preparadas tienen un título excesivamente bajo, es decir, una actividad bacteriostática excesivamente baja, su aspecto también es excesivamente grueso y existen problemas para la comercialización. Por el contrario, si se reduce la temperatura de tindalización, dado que las bacterias lácticas vivas permanecen en el material tindalizado y liofilizado, las bacterias lácticas tindalizadas y liofilizadas pueden no funcionar adecuadamente ya que bacterias lácticas muertas y las bacterias lácticas vivas pueden ser mal reconocidas como bacterias contaminadas.

40 Además, el número de bacterias lácticas vivas difiere de acuerdo con un medio de cultivo para fermentar bacterias lácticas y, por lo tanto, el número de bacterias lácticas muertas después de un proceso de tindalización difiere en gran medida. Por lo tanto, un producto puede no tener fácilmente una apariencia homogénea, y la actividad bacteriostática varía de acuerdo con el número de bacterias lácticas muertas en un material tindalizado y liofilizado.

45 El documento EP 1308506 A1 divulga una mezcla de bacterias adecuadas para la conservación de alimentos, que es un cultivo no iniciador, libre de metabolitos y comprende al menos una primera bacteria seleccionada de la especie Propionibacterium jensenii y al menos una segunda bacteria seleccionada del género Lactobacillus.

50 Canducci F. et al.: "A lyophilized and inactivated culture of Lactobacillus acidophilus increases Helicobacter pylori eradication rates"; Alimentary Pharmacology & Therapeutics, Vol. 14, No. 12 (2000-12-27), páginas 1625-1629 y Simakachorn N. et al.: "Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat-killed Lactobacillus acidophilus LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children", Journal of Pediatric Gastroenterology and

Nutrition, Lippincott Williams Wilkins, Inc, EE.UU., Vol. 30, No. 1 (2000-01-01), páginas 68-72 ambos divulgan que un cultivo liofilizado e inactivado de *Lactobacillus acidophilus* aumenta las tasas de erradicación de *Helicobacter pylori*.

Divulgación de la invención

Problema técnico

- 5 La presente invención proporciona un método para preparar un material antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Solución técnica

10 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para preparar un material antibacteriano que comprende un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado seco, incluyendo el método las etapas de fermentar bacterias lácticas para formar un caldo fermentado; tindalizar el caldo fermentado; separar el caldo fermentado tindalizado en una solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado; liofilizar la solución que contiene bacterias lácticas muertas para formar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas; secar en lecho fluidizado o liofilizar el filtrado fermentado tindalizado para formar un filtrado fermentado tindalizado seco; y mezclar el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado seco.

15 La tindalización del caldo fermentado puede incluir calentar indirectamente el caldo fermentado a 80 a 160°C con un caudal de 10 a 100 L/min, usando un intercambiador de calor; y enfriar rápidamente el caldo fermentado de 20 a 40°C para matar las bacterias lácticas.

20 La fermentación de las bacterias lácticas puede incluir fermentar las bacterias lácticas después de añadir un sacárido, extracto de levadura, peptona de soja, un componente iónico y un factor de crecimiento.

La liofilización de la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado puede incluir congelar rápidamente la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado de -60 a -40°C; y secar la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado de 20 a 60°C durante 24 a 96 horas.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un material antibacteriano que comprende un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado seco, incluyendo el método las etapas de fermentar bacterias lácticas para formar un caldo fermentado; separar el caldo fermentado en una solución que contiene bacterias lácticas y un filtrado fermentado; tindalizar la solución que contiene bacterias lácticas para formar una solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas; tindalizar el filtrado fermentado para formar un filtrado fermentado tindalizado; liofilizar la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas para formar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas; secar en lecho fluidizado el filtrado fermentado tindalizado para formar un filtrado fermentado tindalizado seco; y mezclar el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizado y el filtrado fermentado tindalizado seco.

30 La configuración de la presente invención se describirá ahora en detalle con respecto a cada etapa del método.

35 (a) Fermentación de bacterias lácticas

En la etapa (a), se fermentan las bacterias lácticas.

La fermentación de bacterias lácticas puede incluir la adición de sacárido, extracto de levadura, peptona de soja, un componente iónico y un factor de crecimiento; y fermentar las bacterias lácticas.

40 Además, el sacárido, el extracto de levadura, la peptona de soja y el componente iónico son componentes necesarios para la supervivencia y el crecimiento cuando se fermentan las bacterias lácticas, y el contenido de los componentes puede ser del 1 al 5% en peso del sacárido, 0,1 a 5% en peso del extracto de levadura, 0,1 a 5% en peso de la peptona de soja, y 0,01 a 1% en peso del componente iónico con respecto al peso total de una solución de proteína acuosa. El sacárido puede ser glucosa, lactosa o una mezcla de los mismos. Además, se puede añadir adicionalmente complejo de vitamina B o TWEEN 80 como factor de crecimiento.

45 El componente iónico puede ser, pero no se limita a, citrato de amonio, acetato de sodio, fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso o cloruro de sodio. Las sustancias para cultivar las bacterias lácticas se pueden esterilizar antes de agregar las bacterias lácticas.

(b) Tindalización de las bacterias lácticas

En la etapa (b), las bacterias lácticas se tindalizan calentando las bacterias lácticas a una temperatura elevada y luego enfriando las bacterias lácticas. De acuerdo con la presente invención, la tindalización puede realizarse antes de separar un caldo fermentado de bacterias lácticas en una solución que contiene bacterias lácticas y un filtrado fermentado.

En este caso, la tindalización usa un método de calentamiento indirecto utilizando un intercambiador de calor. La aparición de bacterias lácticas muertas tindalizadas puede mejorarse para que sea homogénea, una proporción residual de bacterias lácticas vivas puede reducirse a casi 0% y se puede lograr una excelente actividad bacteriostática calentando indirectamente las bacterias lácticas de 70 a 160°C a un caudal de 1 a 200 L/min, y enfriando rápidamente las bacterias lácticas de 10 a 60°C. A la temperatura y caudal anteriores, se puede asegurar la mejora de la apariencia de bacterias lácticas muertas tindalizadas, una reducción en una proporción residual de bacterias lácticas vivas y una actividad bacteriostática excelente.

En la presente invención, la "tindalización" se refiere a una operación para matar bacterias lácticas a una temperatura determinada para obtener bacterias lácticas muertas. Aunque las bacterias lácticas vivas son muy débiles al ácido y por lo tanto pueden no llegar fácilmente a los intestinos, las bacterias lácticas muertas apenas son influenciadas por un ambiente, por ejemplo, de ácido gástrico y pueden llegar a los intestinos delgado y grueso, y las bacterias lácticas muertas y su filtrado fermentado seco tiene actividad antibacteriana en los intestinos delgado y grueso.

Alternativamente, de acuerdo con la presente invención, la tindalización se puede realizar individualmente después de separar un caldo fermentado de bacterias lácticas en una solución que contiene bacterias lácticas y un filtrado fermentado. En este caso, la tindalización se puede realizar calentando la solución que contiene bacterias lácticas de 70 a 130°C usando un autoclave de vapor, y enfriando rápidamente la solución que contiene bacterias lácticas a una temperatura de 10 a 60°C, y calentando el filtrado fermentado de 70 a 130°C usando un recipiente a presión, y enfriando rápidamente el filtrado fermentado de 10 a 60°C.

(c) Separación en una solución que contiene bacterias lácticas y un filtrado fermentado

En la etapa (c), el caldo fermentado tindalizado se separa en una solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado. La separación se puede realizar de 5.000 a 15.000 rpm usando una centrífuga, y el caldo fermentado tindalizado se separa después de la centrifugación en una solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas sedimentadas en el fondo y un filtrado fermentado tindalizado que es un sobrenadante.

(d) Liofilización de la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas

En la etapa (d), la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas se recubre con un crioprotector y después se liofiliza para formar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas. El crioprotector puede ser trehalosa, maltodextrina, almidón o leche descremada en polvo, se puede agregar en un 5 a un 40% en peso con respecto al peso total de la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y se puede agregar en forma de una solución acuosa. La liofilización puede incluir congelar rápidamente la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas de -60 a -40°C; y secar la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas de 20 a 60°C durante 24 a 96 horas.

(e) Secado del filtrado fermentado tindalizado

En la etapa (e), el filtrado fermentado tindalizado separado en la etapa (c) se seca en lecho fluidizado o se liofiliza para formar un filtrado fermentado seco y tindalizado. El secado en lecho fluidizado del filtrado fermentado tindalizado se puede llevar a cabo atomizando el filtrado fermentado tindalizado con un absorbente para secar el filtrado fermentado tindalizado. En este caso, el absorbente puede ser proteína de soja aislada, leche desnatada en polvo, almidón, o una mezcla de los mismos, y puede añadirse en un 10 a un 50% en peso con respecto a un peso total del filtrado fermentado tindalizado.

La liofilización puede llevarse a cabo mediante concentración 2 a 10 veces del filtrado fermentado tindalizado usando un evaporador (un concentrador), añadiendo un crioprotector y un absorbente, enfriando rápidamente el filtrado fermentado tindalizado de -60 a -40°C, y luego, secar el filtrado fermentado tindalizado de 20 a 60°C durante 24 a 96 horas. En este caso, cada uno de los crioprotectores y el absorbente se pueden agregar en un 5 a un 40% en peso con respecto al peso total del filtrado fermentado concentrado y tindalizado.

(f) Mezcla del liofilizado de bacterias muertas tinalizadas y el filtrado fermentado seco y tinalizado

En la etapa (f), se mezclan el liofilizado de bacterias muertas tinalizadas y el filtrado fermentado tinalizado y seco. El liofilizado de bacterias muertas tinalizadas y el filtrado fermentado seco y tinalizado obtenido en las etapas (d) y (e) se muelen individualmente y a continuación se mezclan, preparando de este modo el material antibacteriano definitivo.

5 En este caso, un producto que incluye el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas puede diluirse usando un diluyente apropiado para permitir que las bacterias lácticas muertas tinalizadas tengan una concentración de  $1,0 \times 10^9$  a  $1,0 \times 10^{11}$  ufc/g. En el intervalo de concentración de las bacterias lácticas muertas tinalizadas, se puede lograr una actividad antibacteriana óptima y se puede asegurar una apariencia homogénea.

10 El liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas de la presente invención tiene una excelente actividad antibacteriana, y por lo tanto se puede añadir y utilizar en diversos medicamentos, alimentos, cosméticos y alimentos para inhibir el crecimiento de bacterias. En particular, el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas puede usarse en una composición farmacológica, una composición alimenticia y una composición de pienso.

15 De acuerdo con un ejemplo de referencia, se proporciona una composición farmacológica antibacteriana que incluye el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas.

El liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas de la presente invención se puede usar en una composición farmacológica antibacteriana. En este caso, el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas pueden añadirse para tener una concentración de  $1,0 \times 10^9$  a  $1,0 \times 10^{11}$  cfu/g en la composición.

20 También, el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas de la presente invención se puede usar en una composición para regulación intestinal. En este contexto, "regulación intestinal" se refiere al tratamiento y mejora de los trastornos causados por la fermentación anormal de la flora intestinal de los animales. Los trastornos incluyen, por ejemplo, diarrea infecciosa, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de intestino neurogénico, sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, diarrea aguda intestinal y similares debido a microorganismos dañinos.

25 La composición puede prepararse y administrarse en diversas formas de dosificación y usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las bacterias lácticas o su cultivo de acuerdo con la presente invención se pueden mezclar con un vehículo generalmente usado en el campo farmacéutico y se pueden preparar y administrar en forma de comprimidos, pastillas, cápsulas, un elixir, un jarabe, polvo, una suspensión, gránulos o similares.

30 El vehículo puede ser, pero no está limitado a, por ejemplo, un aglutinante, un deslizante, un desintegrante, un excipiente, un agente solubilizante, un agente dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un colorante o un saborizante. Por ejemplo, el polvo se puede preparar simplemente mezclando el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas con un excipiente apropiado farmacéuticamente permitido tal como lactosa, almidón o celulosa amorfa.

35 Los gránulos se pueden preparar mezclando el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas con un excipiente apropiado farmacéuticamente permitido, y un aglutinante apropiado farmacéuticamente permitido tal como polivinilpirrolidona o hidroxipropilcelulosa, y luego llevando a cabo un método de granulación en húmedo usando un disolvente tal como agua, etanol o isopropanol, o un método de granulación en seco utilizando una fuerza de compresión. Además, los comprimidos pueden prepararse mezclando los gránulos con un lubricante apropiado farmacéuticamente permitido tal como estearato de magnesio, y luego formando comprimidos usando una máquina de elaboración de comprimidos.

40 La composición puede administrarse usando un método oral. Además, una dosis puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con la absorción, inactividad o la velocidad de excreción de un componente activo por el cuerpo y la edad, el sexo, el estado o nivel de enfermedad de un paciente. Por ejemplo, se pueden administrar de 100 a 5.000 mg con respecto al peso total de la composición del liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas de una a tres veces al día para una persona.

45 De acuerdo con otro ejemplo de referencia, se proporciona una composición alimenticia antibacteriana que incluye el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas.

50 El liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas puede usarse en una composición alimenticia antibacteriana. En este caso, el liofilizado de bacterias lácticas muertas tinalizadas pueden añadirse para tener una concentración de  $1,0 \times 10^9$  a  $1,0 \times 10^{11}$  cfu/g en la composición.

5 Los tipos de alimentos a los que es aplicable la composición liofilizada de bacterias lácticas muertas tindalizadas, no están particularmente restringidos. Por ejemplo, los alimentos incluyen bebidas, té, panes, chocolates, dulces, refrigerios y complejos vitamínicos, e incluyen todos los alimentos funcionales. Además, la composición se puede preparar como un alimento funcional saludable añadiendo adicionalmente un aditivo alimentario citológicamente permitido y en forma de un medicamento.

El alimento funcional saludable puede incluir adicionalmente diversos materiales tales como un agente saborizante, un carbohidrato natural, un agente edulcorante, una vitamina, un electrolito, un agente colorante, ácido péctico, ácido alginico, ácido orgánico, un espesante coloidal protector, un regulador de pH, un estabilizador, un conservante, glicerina, alcohol y un agente de carbonatación.

10 De acuerdo con otro ejemplo de referencia, se proporciona una composición antibacteriana de un pienso que incluye el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas.

El liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas puede usarse en una composición antibacteriana de un pienso. En este caso, el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas pueden añadirse para tener una concentración de  $1,0 \times 10^9$  a  $1,0 \times 10^{11}$  cfu/g en la composición.

15 La composición de un pienso puede usarse como un sustituto de un antibiótico convencional, puede mejorar una ganancia de peso y una textura de carne de ganado y puede aumentar la producción de leche y un nivel de inmunidad al inhibir el crecimiento de bacterias dañinas en el intestino, manteniendo en forma estable la flora intestinal y manteniendo un buen estado de salud del ganado. La composición de un pienso puede prepararse como, pero no se limita a, un pienso fermentado, piensos variados, gránulos o un ensilaje.

20 El pienso fermentado se puede preparar añadiendo el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y diversos microorganismos o enzimas y fermentando un material orgánico, y un pienso variado se puede preparar mezclando diversos piensos generales y el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas. Además, el pienso del tipo granulado se puede preparar aplicando calor y presión al pienso fermentado o al pienso variado en una máquina de formación de gránulos.

25 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de flujo de un método convencional para preparar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas.

Las FIGS. 2 a 5 son diagramas de flujo de métodos para preparar el material antibacteriano que incluye el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas, de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

30 El mejor modo para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle explicando las realizaciones de la invención con referencia a los dibujos adjuntos. Las siguientes realizaciones se proporcionan para obtener una comprensión suficiente de la presente invención y no para limitar el alcance de la presente invención. Las cuestiones no proporcionadas en las siguientes descripciones pueden inferirse suficiente y técnicamente por un experto en la materia y, por lo tanto, no se describirán aquí.

35 Se describirán ahora ejemplos de ensayo para comparar el material antibacteriano que incluye el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas preparado de acuerdo con la presente invención con los preparados de acuerdo con un método convencional.

#### [Ejemplo comparativo 1]

40 Como se ilustra en la FIG. 1, se usó un método convencional para preparar el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas. Específicamente, se tindalizó un caldo completamente fermentado de bacterias lácticas de 60 a 120°C durante 10 a 60 minutos usando un recipiente a presión tal como un tubo de fermentación y luego se enfrió rápidamente a una temperatura igual o inferior a 20°C. Después de eso, se liofilizó el caldo fermentado y se molió, obteniendo de ese modo el liofilizado de bacterias lácticas muertas. Los resultados del ensayo anterior son como se muestran en las Tablas 1 y 2.

45 La Tabla 1 muestra el número y una relación residual de bacterias lácticas vivas (células/g) de acuerdo con una temperatura de tindalización y un tiempo de tindalización.

[Tabla 1]

Temperatura de tindalización (°C)/ tiempo de tindalización (min)	10 min	30 min	60 min
60	1,7E+09	6,9E+07	7,0E+06
80	3,9E+06	8,1E+04	4,4E+03
100	7,9E+03	6,2E+02	8,3E+01
120	1,1E+02	Trazas	Trazas

5 Como se muestra en la Tabla 1, en la tindalización de bacterias lácticas usando un recipiente a presión tal como un tubo de fermentación, se puede verificar una relación residual de bacterias lácticas vivas según la temperatura de tindalización y el tiempo de tindalización, y la temperatura de tindalización debe ser igual o superior a 120°C en consideración de la proporción residual de bacterias lácticas vivas. (El número de bacterias lácticas vivas antes de la tindalización fue de 8,6E + 09).

La Tabla 2 muestra una turbidez de bacterias lácticas muertas de acuerdo con una temperatura de normalización y un tiempo de tindalización.

10

[Tabla 2]

Temperatura de tindalización (°C)/ tiempo de tindalización (min)	10 min	30 min	60 min
60	0,030	0,032	0,030
80	0,032	0,035	0,047
100	0,038	0,052	0,074
120	0,062	0,136	0,281

15 Como se muestra en la Tabla 2, en la tindalización de bacterias lácticas usando un recipiente a presión tal como un tubo de fermentación, la apariencia (turbidez) de las bacterias lácticas muertas tindalizadas después de la tindalización depende de la temperatura de tindalización y el tiempo de tindalización, y la turbidez es alta cuando la temperatura de tindalización es igual o mayor a 100°C y el tiempo de tindalización es igual o superior a 30 minutos. Si la turbidez es excesivamente alta, la comercialización y mercadeo no es fácil. Si la temperatura de tindalización es excesivamente alta, la actividad bacteriostática se verá reducida debido a una mala apariencia y una baja actividad antibacteriana. Por el contrario, si la temperatura de tindalización es excesivamente baja, se incrementará la relación residual de bacterias lácticas vivas. Del mismo modo, si el tiempo de tindalización es excesivamente largo, debido a la carbonización, las bacterias lácticas muertas tendrán una mala apariencia y una baja actividad bacteriostática.

20

<1-1> Aspecto del producto: 0,1 g del producto fueron disueltos con 10 mL de agua purificada, y se midió su turbidez (OD610 nm, Espectrofotómetro).

<1-2> Número de bacterias vivas: Se contó el número de bacterias lácticas vivas (células/g) en el producto después de la tindalización.

25

[Realización 1]

Como se ilustra en la FIG. 5, se usó un método para preparar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas, de acuerdo con la presente invención.

5 Específicamente, se separó un caldo completamente fermentado en un filtrado fermentado y una solución que contiene bacterias lácticas usando una centrifuga de 7.260 rpm. El filtrado separado se transfirió a un recipiente a presión (un tanque de fermentación), se tindalizó a 90°C durante 10 minutos, se enfrió a 40°C, se volvió a tindalizar a 110°C durante 10 minutos, se enfrió a 40°C, y se concentró 2 veces usando un secador de lecho fluidizado, y proteína de soja aislada y leche desnatada en polvo como absorbente, preparando de este modo un filtrado fermentado seco y tindalizado.

10 La solución que contiene bacterias lácticas se mezcló uniformemente y se diluyó con agua purificada en una proporción 1:2, se tindalizó en un autoclave de vapor a 121°C durante 20 minutos, se recubrió con 20% en peso de trehalosa y almidón como crioprotector con respecto a la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas a temperatura ambiente, y luego se congeló previamente y liofilizó, obteniendo de este modo un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas. El filtrado fermentado seco y tindalizado obtenido y el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas se molieron y mezclaron individualmente.

[Realización 2]

Como se ilustra en la FIG. 2, se usó un método para preparar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas, de acuerdo con la presente invención.

20 Se tindalizó un caldo completamente fermentado de bacterias lácticas a 90°C durante 10 minutos, se enfrió a 40°C, se volvió a tindalizar a 110°C durante 10 minutos, se enfrió a 40°C, y se separó en una solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado utilizando una centrifuga. A continuación, se concentró 2 veces el filtrado fermentado tindalizado usando un secador de lecho fluidizado, y proteína de soja aislada y leche desnatada en polvo como absorbente, preparando de este modo el filtrado fermentado seco y tindalizado.

25 La solución que contenía bacterias lácticas muertas tindalizadas se recubrió con un 20% en peso de trehalosa y almidón como un crioprotector con respecto a la solución que contenía bacterias lácticas muertas tindalizadas a temperatura ambiente, y luego se congeló previamente y liofilizó, obteniendo de este modo un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas. Después de eso, se molieron individualmente y se mezclaron el filtrado fermentado seco y tindalizado y el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas, completando de este modo el proceso.

30 [Realización 3]

Como se ilustra en la FIG. 3, se usó un método para preparar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas, de acuerdo con la presente invención.

35 Se tindalizó un caldo completamente fermentado de bacterias lácticas a 90°C durante 10 minutos, se enfrió a 40°C, se volvió a tindalizar a 110°C durante 10 minutos, se enfrió a 40°C, y se separó en una solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado utilizando una centrifuga. Luego, el filtrado fermentado tindalizado separado se concentró 5 veces usando un evaporador (un concentrador), se congeló en un congelador durante 48 horas a una temperatura igual o inferior a -40°C usando 20% en peso de proteína de soja aislada y leche desnatada en polvo como absorbente con respecto al filtrado fermentado tindalizado, se liofilizó en un liofilizador durante 96 horas, y se molió, obteniendo de este modo un filtrado fermentado seco y tindalizado.

40 La solución que contenía bacterias lácticas muertas tindalizadas se recubrió con un 20% en peso de trehalosa y almidón como crioprotector con respecto a la solución que contenía bacterias lácticas muertas tindalizadas a temperatura ambiente, y luego se congeló previamente y liofilizó, obteniendo de este modo un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas. Después de eso, el filtrado fermentado seco y tindalizado y el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas se molieron y se mezclaron individualmente y se añadió un diluyente apropiado, completando así el proceso.

[Realización 4]

Como se ilustra en la FIG. 4, se usó un método para preparar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas, de acuerdo con la presente invención.

5 Se tindalizó un caldo completamente fermentado de bacterias lácticas en un sistema de intercambiador de calor (UHT, fabricado por  $\alpha$ -Laval) a 125°C a un caudal de 30 L/min y se enfrió a una temperatura igual o inferior a 40°C. A continuación, el caldo fermentado tindalizado completamente enfriado se separó en una solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado que incluye un material activo antibacteriano, usando una centrífuga (SC-35 Separator, fabricada por Westfalia).

10 El filtrado fermentado tindalizado que incluye el material activo antibacteriano se pulverizó y secó en un secador de lecho fluidizado que incluía 50% en peso de proteína de soja aislada y leche desnatada en polvo como absorbente con respecto al filtrado fermentado, formando de este modo un filtrado fermentado tindalizado y seco, y se recubrió la solución separada que contenía bacterias lácticas muertas tindalizadas se revistió con 20% en peso de trehalosa y almidón como crioprotector con respecto a la solución que contenía bacterias lácticas muertas, y luego se secó en un liofilizador a 40°C.°C durante 96 horas, obteniendo así un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas. Después de eso, el filtrado fermentado secado y tindalizado y el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas se molieron individualmente y luego se mezclaron en un mezclador de tambor.

Se describirán ahora ejemplos de ensayo para medir la actividad antibacteriana en las Realizaciones 1 a 4.

### 15 [Ejemplo de prueba 1]

Con respecto al material antibacteriano que incluye un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas preparadas en las Realizaciones 1 a 4, se midieron el aspecto y el número de bacterias lácticas vivas (una proporción residual) y se verificó la actividad antibacteriana realizando una prueba bacteriostática.

20 En este caso, *Salmonella paratyphi*, género *Shigella* y género *Escherichia* se usaron como bacterias, y la prueba bacteriostática se realizó usando un método de ensayo bacteriostático descrito en "References and test Methods for Medicines, etc., 2ª revisión" publicado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Corea.

El método de ensayo se describe a continuación.

<1-1> Aspecto del producto: se disolvieron 0,1 g del producto con 10 mL de agua purificada, y se midió su turbidez (OD610 nm, Espectrofotómetro).

25 <1-2> Número de bacterias vivas: Se contó el número de bacterias lácticas vivas (células/g) en el producto después de la tindalización.

<1-3> Prueba bacteriostática

30 - Bacterias de prueba y solución de bacterias de prueba: se utilizó *Salmonella paratyphi* A como bacteria de prueba. Las bacterias de prueba se cultivaron en caseína peptona (agar de soja triptica) a 37°C durante 18 a 24 horas, y luego se contó el número de bacterias (células/g).

- Preparación de la Solución de Prueba A: Se pusieron exactamente 1,7 g de cada uno de los materiales antibacterianos preparados usando los métodos de tindalización anteriores en 20 mL de un medio líquido para suspender las bacterias de prueba, se agitó a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos y se separó por centrifugación a 5.000 rpm por 15 minutos. Luego, se tomó el sobrenadante y se filtró y esterilizó.

35 - Preparación de la solución de Prueba B: se manipularon exactamente 2,4 g de cada uno de los materiales antibacterianos preparados usando los métodos de tindalización anteriores y se prepararon como en la solución de prueba A.

40 - Método de manipulación: Se colocaron individualmente 5 mL de la solución de prueba A, la solución de prueba B y un medio comparativo en tres tubos de ensayo esterilizados con un diámetro interno de 16 mm y una longitud de 160 mm, y se inocularon con exactitud 0,1 mL de la solución de la bacteria de prueba (*Salmonella paratyphi*). Se colocaron individualmente 5 mL de la solución de prueba A y la solución de prueba B en dos tubos de ensayo adicionales y se usaron como soluciones de prueba que sirven como blanco. Estos tubos de ensayo se cultivaron a 37°C y se observaron crecimientos de bacterias con referencia a los tubos de ensayo individuales que sirven como blanco.

45 - Determinación: después del proceso de cultivo durante 5 a 6 horas, las bacterias no deben crecer en la solución de prueba A y la solución de prueba B y deben crecer en el medio comparativo. Después de 24 horas, las bacterias deben crecer activamente en el medio comparativo y no deben crecer en la solución de prueba B.

Los resultados de la prueba anterior son como se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Método de tindalización	Aspecto	Número de bacterias vivas		Actividad bacteriostática			
				5 horas		24 horas	
		Después de tindalización	En el producto	A	B	A	B
Realización 1	0,096	>E+05	>E+05	1,21E+07	1,30E+07	5,70E+08	8,52E+07
Realización 2	0,130	5,82E+03	6,51E+04	1,20E+07	1,17E+07	2,50E+09	8,40E+07
Realización 3	0,147	1,28E+03	5,94E+04	1,19E+07	1,13E+07	8,19E+09	6,00E+08
Realización 4	0,031	Trazas	<E+02	1,12E+07	9,93E+06	5,82E+06	<E+06

5 Como se muestra en la Tabla 3, en comparación con el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas de las Realizaciones 1 a 3, el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas de la Realización 4, que se prepara usando el método de preparación de acuerdo con la presente invención, tienen una turbidez más baja y, por lo tanto, tienen una apariencia homogénea, tienen un número mucho menor de bacterias lácticas vivas y tienen la mejor actividad bacteriostática. Sin embargo, en comparación con el Ejemplo comparativo 1, el aspecto es homogéneo y la actividad bacteriostática es excelente en las Realizaciones 1 a 3.

10 **[Ejemplo de prueba 2]**

15 En la tindalización de un caldo fermentado usando un intercambiador de calor, de acuerdo con la temperatura de una pieza de calentamiento que recibe calor del intercambiador de calor, el tiempo de retención (un caudal) en un tubo (un tubo de retención) en el que la tindalización ocurre, y la temperatura de una pieza de enfriamiento, la calidad de la tindalización puede diferir y el título (actividad bacteriostática) también puede diferir. En consecuencia, se verificaron la apariencia, el número de bacterias lácticas vivas y la actividad bacteriostática del liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas de acuerdo con cada condición del proceso.

<2-1> Prueba de la apariencia y el número de bacterias vivas de las bacterias lácticas después de la tindalización de acuerdo con el caudal cuando la temperatura de calentamiento era de 140°C y la temperatura de enfriamiento era de 40°C en un intercambiador de calor

20 Se compararon la apariencia y el número de bacterias vivas de las bacterias lácticas después de la tindalización de acuerdo con el caudal cuando la temperatura de una pieza de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor era de 140°C, y la temperatura de una pieza de enfriamiento era 40°C.

[Tabla 4]

Caudal (L/min.)	Aspecto	Número de bacterias vivas después de tindalización
1	0,120	Trazas
40	0,032	Trazas

## ES 2 663 794 T3

Caudal (L/min.)	Aspecto	Número de bacterias vivas después de tindalización
60	0,030	< E+02
120	0,028	> E+05

5 Como se muestra en la Tabla 4, si caudal es excesivamente bajo y el tiempo de retención en el intercambiador de calor es largo, ocurre una esterilización excesiva y, por lo tanto, la apariencia es inapropiada. Si caudal es excesivamente alto, el tiempo de retención es corto, la tindalización (esterilización) no se produce de manera apropiada y, por lo tanto, el número de bacterias lácticas vivas después de la tindalización es grande.

<2-2> Prueba de la apariencia y el número de bacterias vivas de las bacterias lácticas después de la tindalización de acuerdo con una temperatura de calentamiento cuando el caudal era de 40 L/min y la temperatura de enfriamiento era de 40°C en un intercambiador de calor

10 Se compararon la apariencia y el número de bacterias vivas de las bacterias lácticas después de la tindalización de acuerdo con la temperatura de una pieza de calentamiento cuando el tiempo de retención en un tubo, es decir, el caudal, era de 40°C/min y la temperatura de una pieza de enfriamiento era de 40°C.

[Tabla 5]

Temperatura de calentamiento (°C)	Aspecto	Número de bacterias vivas después de tindalización
50	0,027	> E+05
70	0,028	> E+05
140	0,031	Trazas
170	0,058	Trazas

15 Como se muestra en la Tabla 5, si la temperatura de calentamiento del intercambiador de calor es excesivamente baja, la tindalización (esterilización) no ocurre de manera apropiada y, por lo tanto, el número de bacterias vivas después de la tindalización es grande. Si la temperatura de calentamiento es excesivamente alta, debido a la temperatura, ocurre parcialmente carbonización y, por lo tanto, la apariencia es inadecuada.

20 <2-3> Prueba de la apariencia y el número de bacterias vivas de las bacterias lácticas después de la tindalización de acuerdo con la temperatura de enfriamiento cuando la temperatura de calentamiento era de 140°C y caudal era de 40°C/min en un intercambiador de calor

Se compararon la apariencia y el número de bacterias vivas de las bacterias lácticas después de la tindalización de acuerdo con la temperatura de una pieza de enfriamiento cuando la temperatura de una temperatura de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor era de 140°C y un caudal de 40 L/min.

[Tabla 6]

Temperatura de enfriamiento (°C)	Aspecto	Número de bacterias vivas después de tindalización
10	0,031	Trazas

## ES 2 663 794 T3

Temperatura de enfriamiento (°C)	Aspecto	Número de bacterias vivas después de tindalización
40	0,030	Trazas
60	0,030	Trazas
80	0,032	<E+02

Como se muestra en la Tabla 6, si la temperatura de enfriamiento es igual o inferior a 60°C, no hay una diferencia significativa en la apariencia y el número de bacterias vivas después de la tindalización, solo se incrementa el consumo de una utilidad, y por lo tanto se determina una condición óptima como aproximadamente a 60°C.

- 5 <2-4> Medida de la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de acuerdo con la temperatura de una pieza de calentamiento cuando caudal es de 120 L/min

Se midieron la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de acuerdo con la temperatura de una pieza de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor cuando el tiempo de retención en un tubo, es decir, el caudal, era de 120 L/min (Tabla 7). Se usó el método de medición del Ejemplo de prueba 1, y la temperatura de una pieza de enfriamiento se ajustó a 40°C.

10

[Tabla 7]

Temperatura de la pieza de calentamiento (°C)	Aspecto	Número de bacterias vivas		Actividad bacteriostática			
				5 horas		24 horas	
		Después de Tindalización	En el producto	A	B	A	B
60	0,028	>E+05	>E+05	1,33E+07	1,23E+07	5,70E+09	1,52E+09
90	0,030	4,7E+03	1,1E+04	2,01E+07	1,13E+07	1,77E+09	9,97E+08
150	0,034	<E+03	<E+03	1,57E+07	1,19E+07	1,08E+07	6,54E+06

<2-5> Medida de la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de acuerdo con la temperatura de una pieza de calentamiento cuando el caudal era de 30 L/min

- 15 Se midió la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de acuerdo con la temperatura de una pieza de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor cuando el tiempo de retención en un tubo, es decir, el caudal, era de 30 L/min (Tabla 8). Se usó el método de medición del Ejemplo de prueba 1, y la temperatura de una pieza de enfriamiento se ajustó a 40°C.

[Tabla 8]

Temperatura de la pieza de calentamiento (°C)	Aspecto	Número de bacterias vivas		Actividad bacteriostática			
				5 horas		24 horas	
		Después de Tindalización	En el producto	A	B	A	B
90	0,035	>E+03	>E+04	1,70E+07	9,80E+06	8,70E+08	2,22E+08
120	0,038	Trazas	<E+02	1,63E+07	1,17E+07	4,30E+07	1,07E+07
150	0,031	Trazas	<E+02	3,19E+07	1,43E+07	9,83E+06	<E+06

<2-6> Medida de la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de un producto de acuerdo con el caudal cuando la temperatura de una pieza de calentamiento era de 130°C

- 5 Se midieron la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de un producto cuando la temperatura medida de una pieza de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor era de 130°C (Tabla 9). Se usó el método de medición del Ejemplo de prueba 1, y la temperatura de una pieza de enfriamiento se ajustó a 20°C.

[Tabla 9]

Caudal (L/min)	Aspecto	Número de bacterias vivas		Actividad bacteriostática			
				5 horas		24 horas	
		Después de tindalización	En el producto	A	B	A	B
5	0,043	Trazas	Trazas	2,04E+07	9,65E+06	<E+06	<E+06
50	0,034	Trazas	<E+02	1,72E+07	1,47E+07	9,73E+06	4,65E+06
100	0,032	<E+02	2,09E+02	9,89E+06	1,63E+07	3,30E+07	2,06E+07

- 10 <2-7> Medida de la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de un producto de acuerdo con el caudal cuando la temperatura de una pieza de calentamiento era de 150°C

- 15 Se midieron la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de un producto cuando la temperatura medida de una pieza de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor era de 150°C (Tabla 10). Se usó el método de medición del Ejemplo de prueba 1, y la temperatura de una pieza de enfriamiento se ajustó a 40°C.

[Tabla 10]

Caudal (L/min)	Aspecto	Número de bacterias vivas		Actividad bacteriostática			
				5 horas		24 horas	
		Después de tindalización	En el producto	A	B	A	B
5	0,032	Trazas	Trazas	1,01E+07	1,66E+07	<E+05	<E+05
50	0,030	Trazas	<E+02	1,63E+07	9,88E+06	3,02E+06	<E+06
100	0,032	Trazas	<E+02	2,16E+07	1,69E+07	2,87E+07	4,26E+06

5 <2-8> Medida de la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de un producto de acuerdo con la temperatura de enfriamiento cuando la temperatura de una pieza de calentamiento era de 140°C y caudal era de 35 L/min

Se midieron la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de un producto cuando la temperatura de una pieza de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor era de 125°C y un caudal de 35 L/min (Tabla 11). Se usó el método de medición del Ejemplo de prueba 1.

[Tabla 11]

Temperatura de enfriamiento (°C)	Aspecto	Número de bacterias vivas		Actividad bacteriostática			
				5 horas		24 horas	
		Después de tindalización	En el producto	A	B	A	B
20	0,036	Trazas	<E+02	1,44E+07	1,33E+07	<E+06	<E+06
40	0,033	Trazas	<E+02	1,78E+07	2,68E+07	<E+06	<E+06
50	0,035	Trazas	<E+02	1,47E+07	1,06E+07	1,53E+06	<E+06

10 <2-9> Medida de la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de acuerdo con la cantidad de bacterias muertas después de mezclar cuando la temperatura de una pieza de calentamiento era de 130°C, el caudal era de 35 L/min, y la temperatura de enfriamiento era de 40°C

15 Se midieron la apariencia, el número de bacterias vivas y la actividad bacteriostática de un producto cuando la temperatura de una pieza de calentamiento que recibe calor de un intercambiador de calor era de 130°C, el caudal de flujo era de 35 L/min, y la temperatura de enfriamiento era de 40°C (Tabla 12). Se usó el método de medición del Ejemplo de prueba 1.

[Tabla 12]

Número de bacterias muertas después de la mezcla (células/g)	Aspecto	Número de bacterias vivas		Actividad bacteriostática			
				5 horas		24 horas	
		Después de tindalización	En el producto	A	B	A	B
< 5,0E+09	0,032	Trazas	<E+02	1,34E+07	1,39E+07	3,78E+07	3,09E+07
3,0E+10	0,032	Trazas	<E+02	1,77E+07	1,88E+07	1,03E+06	<E+06
> 1,0E+11	0,033	Trazas	<E+02	1,64E+07	1,22E+07	1,19E+06	<E+06

Aplicabilidad industrial

5 Un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas obtenido de acuerdo con un método de la presente invención puede tener un aspecto homogéneo y una actividad antibacteriana mejorada.

10 Además, en un método para preparar el material antibacteriano que comprende el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado seco, de acuerdo con la presente invención, dado que un caldo fermentado de bacterias lácticas se separa en una solución que contiene bacterias lácticas y un filtrado fermentado antes o después de un proceso de tindalización y la solución que contiene bacterias lácticas y el filtrado fermentado se secan individualmente, el número de bacterias lácticas muertas puede ajustarse de forma artificial y diversa y de este modo, pueden producirse diversos productos que tienen una apariencia homogénea.

15 Además, un método para preparar el material antibacteriano que comprende un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado secado, de acuerdo con la presente invención, puede lograr la simplificación del proceso y la mejora de la calidad usando un intercambiador de calor para la tindalización instantánea e indirecta después de que las bacterias lácticas se fermentan y antes de que las bacterias lácticas fermentadas se separan en bacterias y un filtrado fermentado.

20 De acuerdo con esto, el material antibacteriano y el método de preparación del mismo, de acuerdo con la presente invención, pueden usarse apropiadamente para preparar diversos medicamentos, alimentos, piensos, cosméticos, etc., que requieren actividad antibacteriana y regulación intestinal.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar un material antibacteriano que comprende un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizado y un filtrado fermentado tindalizado seco, comprendiendo el método las etapas de:

fermentar bacterias lácticas para formar un caldo fermentado;

5 tindalizar el caldo fermentado;

separar el caldo fermentado tindalizado en una solución que contiene bacterias lácticas tindalizadas y un filtrado fermentado tindalizado;

liofilizar de la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas para formar un liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas;

10 secar en lecho fluidizado o liofilizar el filtrado fermentado tindalizado a fin de formar un filtrado fermentado tindalizado seco; y

mezclar el liofilizado de bacterias lácticas muertas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado seco, en el que la tindalización del caldo fermentado comprende: calentar indirectamente del caldo fermentado de 80 a 160°C a un caudal de 10 a 100 L/ min usando un intercambiador de calor; y enfriar rápidamente el caldo fermentado de 10 a 60°C para matar a las bacterias lácticas.

15

2. El método de la reivindicación 1, en el que la fermentación de las bacterias lácticas comprende fermentar las bacterias lácticas después de agregar sacarido, extracto de levadura, peptona de soja y un componente iónico.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la liofilización de la solución que contiene bacterias lácticas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado comprende:

20 congelar rápidamente la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado de -60 a -40°C; y

secar la solución que contiene bacterias lácticas muertas tindalizadas y el filtrado fermentado tindalizado de 20°C a 60°C durante 24 a 96 horas.

FIG. 1

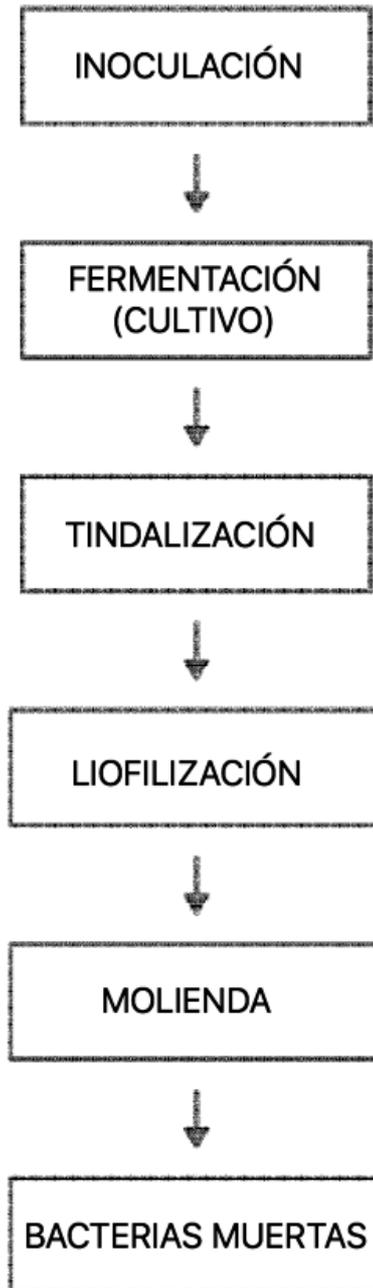


FIG. 2

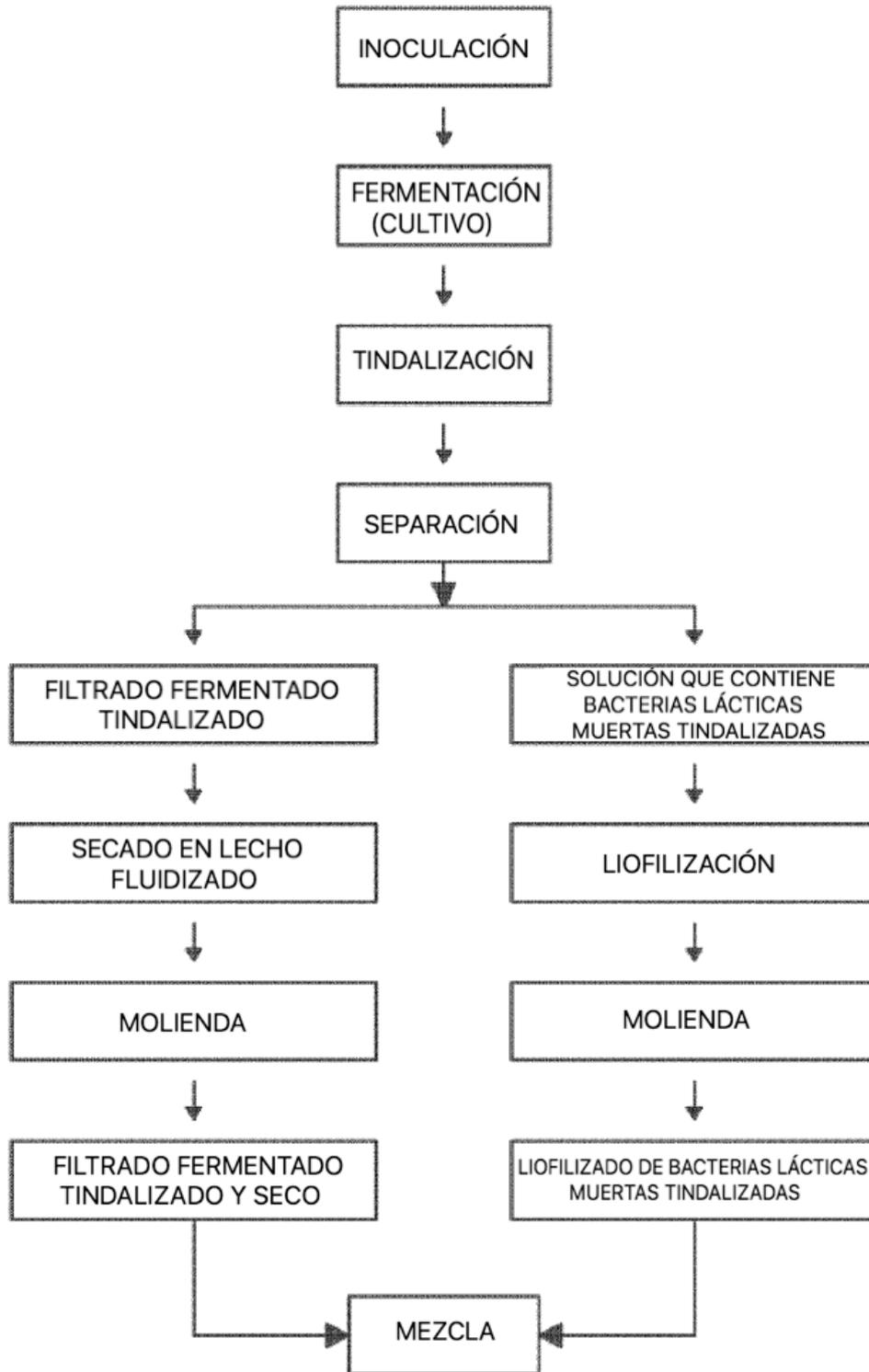


FIG. 3

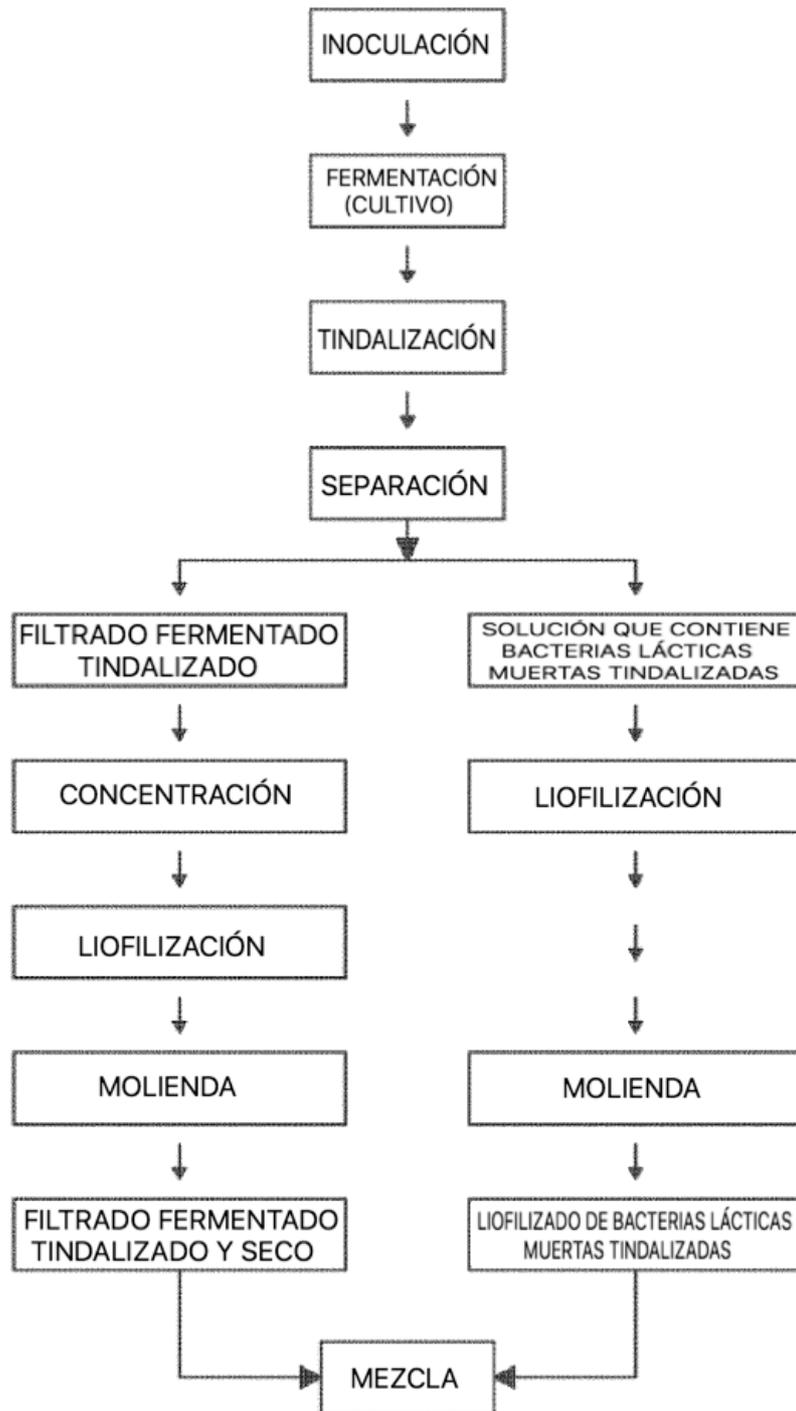


FIG. 4

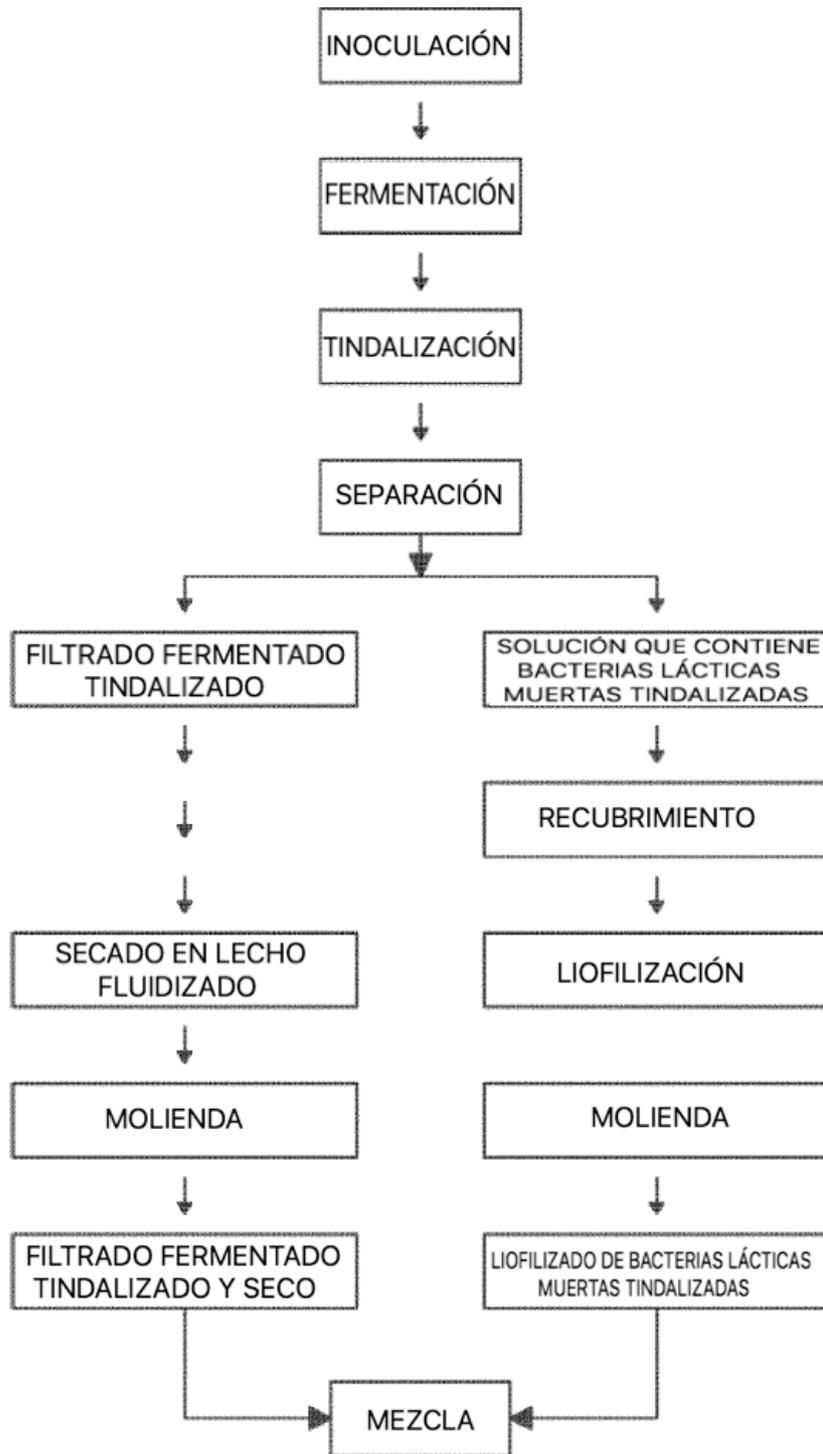


FIG. 5

