

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 552**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3571 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2007** **E 07104564 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 1972207**

54 Título: **Sistema de seguridad para composiciones nutricionales en polvo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JOOSTEN, HENRICUS;
BREEUWER, PIETER y
CORDIER, JEAN-LOUIS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 668 552 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

Sistema de seguridad para composiciones nutricionales en polvo

La presente invención se refiere a una composición nutricional en polvo que comprende bacterias vivas de ácido láctico, a la utilización de bacterias vivas de ácido láctico en composiciones nutricionales en polvo como un sistema de seguridad contra el crecimiento de bacterias patógenas, a la utilización de bacterias vivas de ácido láctico en composiciones nutricionales en polvo para acidificar composiciones nutricionales en polvo, y a un método para reducir la aparición y/o crecimiento de bacterias patógenas en composiciones nutricionales en polvo.

Antecedentes de la invención

Las infecciones gastrointestinales, que conducen a la diarrea, siguen estando entre las principales causas de muerte durante la infancia y a menudo se deben a la contaminación bacteriana del agua o de los alimentos.

La lactancia materna reduce la exposición a estos patógenos y también proporciona al niño anticuerpos protectores contra patógenos transmitidos por los alimentos, lo que resulta en una menor incidencia de diarrea. Sin embargo, la lactancia materna no siempre es posible, por ejemplo, si una madre tiene que dejar a su hijo en casa o en la guardería durante el trabajo. Además, no se recomienda amamantar si existe riesgo de transmisión del VIH (Weinberg G. The dilemma of postnatal mother-to-child transmission of HIV: to breastfeed or not? Birth 2000; 27 (3)).

En el contexto de la presente invención, se observa particularmente el hecho de que la alimentación de fórmulas nutricionales puede aumentar los riesgos de infecciones gastrointestinales. Se observó que ciertos patógenos son capaces de contaminar las fórmulas infantiles en polvo después de la reconstitución con agua. Por ejemplo, si el agua del grifo utilizada para la reconstitución no se esteriliza por ebullición previa, un patógeno puede llegar a la fórmula líquida destinada a la alimentación de un bebé, debido a su aparición natural en sistemas de suministro de agua o fuentes accesibles.

Sin embargo, la probabilidad de infección de un individuo aumenta si el patógeno está presente en concentraciones relativamente altas. Generalmente, si una fórmula en polvo se consume rápidamente después de la reconstitución con agua, es probable que los patógenos estén ausentes o presentes en concentraciones muy bajas que no sean suficientes para causar un estado de enfermedad en un individuo.

En realidad, y contrariamente a las prescripciones del producto, la composición nutricional reconstituida a menudo no se consume dentro de un tiempo razonablemente corto después de la reconstitución. Una situación problemática típica en el hogar se encuentra si un bebé se niega a beber toda la botella de fórmula reconstituida y la madre deja la botella medio vacía para un consumo posterior. En una clínica pediátrica puede ocurrir que varias botellas de fórmulas infantiles reconstituidas se preparen al mismo tiempo y se mantengan a aproximadamente 37 °C, una temperatura que no solo es muy conveniente para el consumo, sino que implica condiciones de crecimiento óptimas para varios patógenos. Si una botella se administra solo después de varias horas de incubación, un patógeno ha tenido tiempo suficiente para alcanzar altas concentraciones, lo que aumenta la probabilidad de infección. Lo mismo es cierto, por supuesto, si las condiciones ambientales ya apoyan el crecimiento de patógenos, como es el caso del clima tropical cálido o subtropical. Aquí unas pocas horas de temperatura ambiente pueden ser suficientes para que un patógeno se desarrolle en una composición reconstituida.

Se pueden concebir muchas otras circunstancias problemáticas, tales como las descritas anteriormente, en las que los patógenos que han encontrado su camino en una composición nutricional reconstituida pueden explotar el hábitat ideal formado por los abundantes macro y micronutrientes presentes en la composición líquida. Una infección de un individuo puede ser la consecuencia, seguida de una enfermedad y, dependiendo del tipo de patógeno, incluso la muerte.

La técnica anterior aborda los problemas relacionados con la contaminación y la proliferación de patógenos en composiciones nutricionales tales como la fórmula infantil de diversas maneras.

Una forma de resolver el problema es la adición de un agente antimicrobiano específico, como se muestra en el documento WO 96/25054. Sin embargo, para los bebés, se debe evitar el consumo de agentes antimicrobianos de forma regular debido a un potencial daño al hígado y, además, porque los agentes antimicrobianos a menudo presentan efectos secundarios indeseables.

La solicitud europea EP 02028285.1 describe una fórmula infantil en polvo, que se acidifica químicamente con ácido láctico L+. Se descubrió que a un pH de 5 o por debajo de él en una fórmula infantil reconstituida, el crecimiento de patógenos tales como *Salmonella typhium*, *Vibrio cholerae*, entre otros, se puede suprimir de manera efectiva. El documento EP-A-0 443 543 describe el uso de bacterias de ácido láctico (por ejemplo, *Streptococcus thermophilus*) para producir ácido en productos alimenticios (productos lácteos) como antimicrobianos contra bacterias patógenas.

El documento WO-A-2004/054371 describe una fórmula infantil en polvo reconstituible con ácido láctico añadido (de bacterias de ácido láctico) para disminuir el pH y evitar el crecimiento de microorganismos patógenos. En la actualidad, uno puede encontrar fórmulas infantiles en el mercado, que contienen probióticos, es decir, bacterias vivas que tienen un efecto beneficioso sobre su consumidor. Los probióticos han demostrado que generalmente mejoran las condiciones intestinales de un consumidor; en concreto, se consideran para aliviar el estreñimiento, prevenir la diarrea, reforzar el sistema inmunitario, prevenir el cáncer y aumentar la absorción de minerales. Un ejemplo de una fórmula infantil en polvo que comprende probióticos es BEBA2 HA, comercializado bajo la marca registrada NESTLE, que comprende aproximadamente 2×10^7 UFC/g de colonias probióticas (*Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium lactis*). Esto corresponde a aproximadamente 3×10^6 UFC/ml en el producto reconstituido.

El objetivo de la presente invención es proporcionar una fórmula para lactantes aún más segura en polvo. En particular, es un objetivo proporcionar una fórmula en polvo para lactantes que incluya un sistema de seguridad que evite que los patógenos crezcan en la fórmula después de su reconstitución.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar una fórmula para lactantes en polvo en la que el crecimiento de patógenos se inhibe cada vez más después de la reconstitución, estando la fórmula preferiblemente libre de antibióticos o agentes antimicrobianos.

Otro objetivo de la presente invención es aumentar aún más la seguridad de la fórmula para lactantes. En particular, los riesgos de infección con patógenos que conllevan retrasar el consumo de la fórmula en polvo después de la reconstitución deben reducirse.

Todavía otro objetivo de la presente invención es una fórmula infantil en polvo que comprende un sistema de seguridad contra patógenos, que no compromete esencialmente el sabor del producto, a menos que se haya sometido a condiciones de almacenamiento inapropiadas.

Además, es un objetivo de la presente invención proporcionar una fórmula infantil en polvo que, cuando se reconstituye y se deja durante varias horas, produce una señal óptica que indica que el producto ya no es adecuado para alimentar a un bebé.

Además, es un objetivo de la presente invención aumentar la seguridad de las fórmulas para lactantes sin utilizar ingredientes adicionales o principios activos que habitualmente no están presentes en las fórmulas en polvo para lactantes, y menos en los ingredientes, que generalmente no se recomiendan para el consumo de bebés, lactantes o niños.

Resumen de la invención

Sorprendentemente, se descubrió que *Streptococcus thermophilus* TH4 vivo (DSM 15957) con la cantidad de 5×10^7 UFC/g de polvo en una fórmula infantil en polvo es capaz de acidificar muy rápidamente la fórmula infantil después de la reconstitución e inhibición de bacterias patógenas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, una fórmula infantil en polvo que comprende *Streptococcus thermophilus* TH4 vivo (DSM 15957) en una cantidad de al menos 5×10^7 UFC/g de polvo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el crecimiento de bacterias patógenas en fórmula infantil en polvo después de la reconstitución, comprendiendo el método la etapa de incluir *Streptococcus thermophilus* TH4 vivo (DSM 15957) en la fórmula infantil en polvo en una cantidad de al menos 5×10^7 UFC/g de polvo.

La invención se extiende además a una fórmula infantil en polvo que comprende *Streptococcus thermophilus* TH4 vivo (DSM 15957) que, si se reconstituye en agua de acuerdo con la prescripción y se almacena a 37°C durante 6 horas, se caracteriza por una disminución del pH de al menos 1 punto log. Preferiblemente, el pH de la fórmula directamente después de la reconstitución es superior a 5 pero cae a 5 o menos 6 horas después de la reconstitución si se mantiene a temperatura ambiente.

En las Figuras 1 - 3, se muestran las concentraciones de tres bacterias patógenas diferentes en fórmulas infantiles reconstituídas durante 6 horas después de la reconstitución.

La Figura 1 muestra el destino de *Escherichia coli*, la Figura 2 *Salmonella Typhimurium* y la Figura 3 el de *Enterobacter sakazakii*.

La presente invención proporciona una serie de ventajas inesperadas.

En primer lugar, es sorprendente que se pueda añadir *Streptococcus thermophilus TH4* (DSM 15957) a las composiciones en polvo de manera que la acidificación comienza muy pronto después de la reconstitución y que esto es suficiente para inhibir el crecimiento de patógenos en la composición.

5 Además, el proceso de acidificación debido a la actividad de las bacterias del ácido láctico después de la reconstitución normalmente provoca una separación de fases solo unas pocas horas después de la reconstitución. De esta manera, se proporciona a la madre una señal óptica de que la fórmula se ha almacenado durante un tiempo demasiado prolongado y que ya no se debe alimentar al bebé.

10 Además, el sistema de seguridad tiene una ventaja de sabor sobre las fórmulas infantiles que se acidifican directa o biológicamente con el fin de prevenir el crecimiento de patógenos. La presente fórmula no es muy ácida inmediatamente después de la reconstitución ni se desarrolla acidez si la fórmula reconstituida se almacena adecuadamente, por ejemplo en condiciones de frío. Esto significa que la fórmula infantil de acuerdo con la invención es más aceptable tanto para los bebés como para sus cuidadores que las fórmulas permanentemente acidificadas de la técnica anterior.

Descripción detallada de la invención

20 En el contexto de esta especificación, la palabra "comprende" significa "incluye, entre otras cosas". No pretende ser interpretado como "consiste en solo".

25 En el contexto de la presente invención, las palabras "reconstituido de acuerdo con la prescripción" significan que una fórmula infantil en polvo, que se comercializa o se vende como un producto, se reconstituye con agua, de acuerdo con las indicaciones asociadas con el producto. Normalmente, el empaque del producto o el manual de instrucciones que lo acompaña o las instrucciones de uso especifican la cantidad de líquido que se agregará a una cantidad específica de polvo.

30 En el contexto de la presente invención, las palabras "disminución en el pH de al menos 1 punto log" se refieren al logaritmo en la base de diez. A título de ejemplo, se ejemplifica que una disminución de pH 6,6 a pH 4,8 sería una disminución de 1,8 puntos log.

35 La fórmula infantil en polvo de acuerdo con la presente invención se puede caracterizar por su capacidad de producir una disminución en el pH de al menos 1 punto log después de la reconstitución y el almacenamiento a 37 °C durante seis horas. Preferiblemente, la disminución del pH es al menos 1,5, más preferiblemente al menos 1,7, incluso más preferiblemente al menos 2 y lo más preferiblemente al menos 2,5 puntos logarítmicos. En una realización, la fórmula infantil en polvo de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque, si se reconstituye en agua según la prescripción y se almacena a 37 °C durante 6 horas, tiene un pH de 5 o menor. El almacenamiento a 37 ° durante 6 horas se puede realizar en un baño de agua a 37 +/- 1 °C.

40 En el contexto de la presente invención, el término bacterias vivas de ácido láctico se refiere a una cepa o una pluralidad de cepas bacterianas vivas presentes en la fórmula infantil en polvo y capaz de proporcionar el efecto acidificante deseado después de que el polvo se reconstituye.

45 Como se indicó anteriormente, la fórmula infantil en polvo de la invención no necesita ser fuertemente ácida inmediatamente después de la reconstitución de acuerdo con la prescripción. Preferiblemente, por lo tanto, la fórmula infantil de la invención tiene un pH superior a 5, más preferiblemente superior a 6, lo más preferiblemente superior a 6,5 directamente después de la reconstitución de acuerdo con la prescripción.

50 La bacteria de ácido láctico está presente en cantidades suficientes que permiten una disminución en el pH de acuerdo con la invención. Preferiblemente, se selecciona una bacteria de acidificación relativamente rápida. En este caso, la cantidad de UFC vivientes en la fórmula infantil en polvo puede mantenerse relativamente baja.

55 Los representantes de estas especies están disponibles para la persona experta. Por ejemplo, son ampliamente utilizados en la producción de yogur. Se pueden obtener, por ejemplo, de ALCE-PROBIOTICAL, Via P. Custodi, 12, 28100 Novarra, Italia; CENTRO SPERIMENTALE DEL LATTE (CSL), 26839 Zelo Buon Persico, (LODI), 3 Strada por Merlin, Italia; Enriquecimiento de alimentos CSK, Pallasweg, 1, 8938, Leeuwarden, Países Bajos (<http://www.cskfood.com>); D.S.M. Food Specialties, Alexander Fleminglaan 1, 2613 AX Delft, Países Bajos, (www.dsm-foodspecialties.com), para enumerar solo algunos proveedores.

60 La bacteria de ácido láctico está presente en cantidades de al menos 5×10^7 UFC/g de fórmula infantil en polvo, preferiblemente cantidades de más de 10^6 , más preferiblemente cantidades superiores a 5×10^8 UFC/g.

65 Después de la reconstitución de acuerdo con la prescripción, la fórmula infantil comprende preferiblemente al menos 4×10^6 UFC/ml. Más preferiblemente, la fórmula reconstituida comprende al menos 7×10^6 , incluso más preferiblemente, al menos 10^7 , lo más preferiblemente al menos 2×10^8 UFC/ml. Por ejemplo, la fórmula infantil

comprende, después de la reconstitución de acuerdo con la prescripción del producto, al menos 5×10^8 UFC/ml de bacterias de ácido láctico.

Preferiblemente, la cepa o cepas seleccionadas han adquirido la designación GRAS de la FDA y, por lo tanto, generalmente se consideran seguras.

Preferiblemente, la cepa o cepas seleccionadas son probióticas.

La presente invención proporciona sorprendentemente el uso de *Streptococcus thermophilus TH4* vivo (DSM 15957) para acidificar la fórmula infantil en polvo después de la reconstitución con agua. Hasta ahora, las bacterias se han agregado a las fórmulas infantiles en polvo solo por sus propiedades probióticas, como su efecto beneficioso sobre la flora intestinal y el sistema inmunitario. La preparación de una fórmula infantil de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de proporcionar una fórmula infantil en polvo y la adición de *Streptococcus thermophilus TH4* vivo (DSM 15957) a la misma.

La fórmula en polvo para lactantes de la invención puede ser una fórmula inicial, una fórmula de seguimiento o una leche en crecimiento, es decir, una composición enriquecida a base de leche para alimentar a bebés y niños pequeños hasta la edad de tres a cuatro años. Por simplicidad, el término "fórmula infantil" se usa en este documento para cubrir todos estos productos.

La fórmula infantil puede estar adaptada al suero, predominante en caseína, a base de soja y/o hipoalérgica. Estos productos están disponibles comercialmente y su método de producción es conocido por la persona experta. Muy brevemente, los ingredientes de las composiciones generalmente se hidratan, se tratan con calor, se homogeneizan y se secan, por ejemplo se secan con rodillos o mediante pulverización.

Un ejemplo para la preparación de una fórmula infantil en polvo se describe en el documento WO 0122837. Esta referencia describe ingredientes adecuados y, a partir de la página 7, línea 31 a la página 8, línea 21, enseña cómo se puede preparar una fórmula infantil en polvo.

La etapa de añadir bacterias vivas de ácido láctico se realiza preferiblemente añadiendo una preparación bacteriana en polvo, que puede mezclarse en seco fácilmente con la fórmula en polvo para lactantes. El experto conoce cómo pueden obtenerse tales preparaciones. Además, estas preparaciones bacterianas en polvo que comprenden bacterias vivas de ácido láctico están disponibles comercialmente de muchos proveedores. Muy brevemente, se agrega un inóculo de bacterias de ácido láctico a un medio que contiene nutrientes que la bacteria puede metabolizar. El medio está diseñado preferiblemente para soportar el crecimiento y/o la multiplicación. La temperatura del medio inoculado se ajusta a la temperatura de crecimiento óptima de la bacteria y se fermenta durante 6 - 15 horas. Después de eso, las bacterias vivas del ácido láctico se pueden separar del grueso del medio fermentado y se pueden concentrar, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación. Preferiblemente, se añaden materiales de soporte a las bacterias, tales como leche en polvo, o mono, oligo y/o polisacáridos, tales como maltodextrina, por ejemplo. Muy a menudo, se agregan agentes protectores a la biomasa de las bacterias para su protección durante el paso de secado. Luego, las bacterias se secan, por ejemplo, por congelación, rodillo, lecho fluidizado o por pulverización. El documento WO 98/10666 describe una composición alimenticia deshidratada que contiene bacterias de ácido láctico probiótico vivo.

En el documento WO 02/065840 A2, se describe otra forma de añadir bacterias vivas a un producto consumible. En consecuencia, la biomasa fresca de probióticos, después de ser concentrada, se pulveriza directamente sobre un producto alimenticio seco. Dado que solo se debe agregar una pequeña cantidad de biomasa para obtener cantidades suficientes de bacterias vivas, se puede omitir un proceso de secado en caliente, ya que el producto alimenticio seco absorbe el agua aún presente en la biomasa. De esta manera, la supervivencia de las bacterias es mucho mayor.

La fórmula en polvo para lactantes que comprende *Streptococcus thermophilus TH4* vivo (DSM 15957) puede a continuación llenarse en paquetes adecuados y suministrarse en esta forma a un consumidor.

Ejemplo

Los siguientes experimentos estudian los efectos de diferentes cepas de bacterias de ácido láctico sobre el crecimiento de patógenos en una fórmula infantil reconstituida. La fórmula infantil en polvo disponible comercialmente con probióticos se compara con la fórmula infantil de acuerdo con la invención con cantidades incrementadas de probióticos específicos para aumentar la actividad de acidificación en la composición después de la reconstitución.

Materiales

Fórmula infantil en polvo

NAN 1 y BEBA 2 HA son fórmulas infantiles en polvo vendidas por compañías del grupo NESTLE en diversos países, tales como Suiza, por ejemplo. NAN 1 no contiene probióticos, mientras que BEBA 2 HA contiene *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium lactis* a un nivel de aproximadamente 2×10^7 UFC/g cada uno.

BEBA 2 HA proporciona 477 kcal por cada 100 g del polvo y contiene 14,3 g de proteínas, 59,1 g de carbohidratos y 20,4 g de grasas. Los ingredientes son leche desnatada, lactosa, aceites vegetales, emulsionante (lecitina de soja), minerales, vitaminas y las bacterias beneficiosas mencionadas anteriormente.

NAN 1 proporciona 519 kcal por 100 g de polvo y 68 kcal por 100 ml si se reconstituye de acuerdo con las instrucciones. 100 g de polvo contienen 9,5 g de proteína, 58 g de carbohidratos y 27,7 g de grasas y 1,9 g de minerales.

Los ingredientes básicos de los preparados para lactantes son fracción de suero de leche desmineralizada, leche desnatada, lactosa, aceites vegetales, fracción de proteína de suero de leche, minerales y vitaminas. Las fórmulas también contienen nucleótidos.

Cepas probióticas

Streptococcus thermophilus (DSM 15957) *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954)

Ambas cepas se pueden obtener comercialmente con los nombres comerciales TH4 y Bb12, respectivamente, de Christian Hansen Biosystems A/S (CHL), 10-12 Bøge Allé. P.O. Box 407, DK-2970 Hørsholm, Dinamarca.

Las cepas se liofilizaron por separado y se diluyeron en lactosa para el propósito del estudio. Para cada cepa, la concentración final en el polvo de lactosa liofilizada fue de aproximadamente 3×10^9 ufc/g.

Se añadió un gramo de una o ambas cepas en el polvo a 100 ml de NAN 1 reconstituido para alcanzar una concentración final de aproximadamente 3×10^7 UFC/ml en la composición infantil reconstituida. Donde se agregaron ambas cepas, cada una de ellas estaba presente en esta concentración.

Cepas expuestas

<i>Enterobacter sakazakii</i>	Cepas FSM 155, 156 y 158
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	Cepas FSM 444, 469 y 496
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (no toxigénica)	Cepa FSM 222

Prueba de exposición

Inoculación

Las cepas expuestas se cultivaron individualmente en caldo de cultivo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid CM225) durante aproximadamente 20 h a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, después del cual las cepas de la misma especie se juntaron y se diluyeron en triptona sal (TS, Triptona; Oxoid L42; NaCl: Merck 6404). Se inocularon porciones de 100 ml de los productos reconstituidos para alcanzar un nivel de aproximadamente 10^3 UFC/ml. Este nivel se eligió para permitir una enumeración relativamente precisa en caso de un aumento o una disminución en los números de microorganismos.

Incubación

Las fórmulas infantiles inoculadas se incubaron en un baño de agua a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante hasta 6 h.

Enumeración

Después de 0, 3 y 6 horas de incubación, los patógenos se enumeraron con la técnica de vertido en placa usando agar violeta rojo bilis glucosa (VRBG, Oxoid CM 485).

Medición de pH

El pH se midió usando el sistema de autoquímica Orion 960.

Resultados

Calidad microbiológica del polvo infantil NAN 1 antes de los experimentos

El número de organismos mesófilos aerobios y Enterobacteriaceae estaba por debajo de 1 UFC/ml en el producto reconstituido antes de comenzar la prueba.

Efecto de las cepas probióticas

Se reconstituyó NAN1 y las dos cepas probióticas (Bb12, TH4) se añadieron por separado o juntas para obtener una concentración de aproximadamente 3×10^7 UFC/ml en el producto. A continuación, los productos se inocularon con las cepas expuestas y se incubaron a 37 °C.

Las tres cepas expuestas iniciaron el crecimiento al cabo de 3 h en Nan 1. Aproximadamente en este momento, los productos que contenían TH4 se volvieron inhibidores, véanse las Figuras 1 - 3. El crecimiento adicional de *E. coli* y *Salmonella* se redujo y se detuvo totalmente para *E. sakazakii*. Después de 6 horas hubo una diferencia en los recuentos de *E. sakazakii* de más de 2 unidades logarítmicas en comparación con el producto que no contenía probióticos. El efecto inhibidor también se observó con NAN 1 que contiene tanto TH4 como Bb12, pero no con Bb12 solamente. La explicación más probable es que solo TH4 crece bien en el producto y comienza a producir ácido láctico, que acidifica el producto. Esto fue confirmado por mediciones de pH al final de los experimentos. En Nan 1, el pH cayó de 6,6 en el producto recién reconstituido, a 4,3 cuando estaba presente TH4. Con solo Bb12 no hubo caída en el pH, ver la Tabla 1 a continuación.

El BEBA 2 HA que ya está en el mercado contiene aproximadamente 2×10^7 UFC/g de cepas probióticas, que corresponden a aprox. 3×10^6 UFC/ml en el producto reconstituido, es decir, mucho menos de lo que se añadió a NAN 1 en este estudio. Como se muestra en la Figura 2, no se observó inhibición con este producto, tampoco disminuyó el pH (Tabla 1).

En las Figuras, se usan los siguientes símbolos:

- ◇- representa las fórmulas infantiles NAN 1 que contienen *B. lactis* (3×10^7 UFC/ml).
- Δ- representa la fórmula infantil NAN 1 que contiene *S. thermophilus* (3×10^7 UFC/ml).
- ● - representan la fórmula infantil NAN 1 que contiene *B. lactis* y *S. thermophilus* (3×10^7 UFC/ml cada uno).
- X - representan la fórmula infantil BEBA 2 HA que contiene *B. lactis* y *S. thermophilus* (3×10^6 UFC/ml cada uno).

El efecto inhibidor de las fórmulas infantiles suministradas con 3×10^7 UFC/ml de *St. thermophilus* (-Δ- y -●-), que se acidifica rápidamente, se ve claramente después de tres horas.

Por el contrario, las fórmulas infantiles que no contienen o solo 3×10^6 UFC/ml de bacterias probióticas (-◇- y -X-) no son inhibidoras, incluso después de 6 horas. En este experimento, -◇- representa una fórmula infantil comercialmente disponible que contiene probióticos en cantidades que no son suficientes para obtener el efecto protector o de seguridad de acuerdo con la presente invención.

Tabla 1. pH en preparados para lactantes que contienen diferentes cepas probióticas y de cepas expuestas

Producto	Cepa/s probiótica/s	pH en producto reconstituido	pH después de 6 h a 37 °C	
			<i>E. coli</i> O157/H7	<i>Salmonella</i> Typhimurium
NAN 1		6,6		
NAN 1	Bb12		6,1	6,3
NAN 1	TH4		4,3	4,3
NAN 1	Bb12 + TH4		4,3	4,3
BEBA 2 HA	Bb12 + TH4	6,6	6,6	6,6

Conclusión

Acidificación

La separación / coagulación observada de productos acidificados tras un almacenamiento prolongado en condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos, podría servir como un indicador de almacenamiento de abuso. En este caso, evitará el uso y protegerá al consumidor de eventuales peligros microbiológicos.

Probiótico

La cepa probiótica *Streptococcus thermophilus* TH4 (DSM 15957) puede limitar el crecimiento de bacterias patógenas en NAN 1, sin embargo, existen algunas limitaciones en su uso:

para lograr un efecto antimicrobiano, se deben agregar cantidades suficientes de bacterias probióticas (aproximadamente 5-10 veces más que el aplicado en la fórmula probiótica actualmente disponible en el mercado).

La cantidad y tipo de bacteria probiótica, que se agrega como un sistema de seguridad a las necesidades nutricionales en polvo, se debe determinar de acuerdo con el principio de que el pH de la composición nutricional, después de la reconstitución y el almacenamiento a 37 °C durante 6 horas es preferiblemente de 5 o menos.

- 5 Esto se puede lograr equilibrando la capacidad de acidificación de la bacteria del ácido láctico seleccionada con la cantidad de bacterias vivas que estarán presentes en la fórmula en polvo. Preferiblemente, se selecciona una bacteria de ácido láctico que se acidifica rápidamente, con el fin de mantener la cantidad de bacteria viva añadida a la composición lo más baja posible.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir el crecimiento de bacterias patógenas en una fórmula infantil en polvo después de su reconstitución, comprendiendo este método la etapa de incluir bacterias vivas de ácido láctico en la fórmula infantil en polvo en una cantidad de al menos 5×10^7 UFC/g de polvo, la bacteria de ácido láctico es *Streptococcus thermophilus TH4*. (DSM 15957)
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que las bacterias de ácido láctico vivas están presentes en una cantidad de al menos 10^8 UFC/g de polvo.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que las bacterias de ácido láctico vivas están presentes en una cantidad de al menos 5×10^8 UFC/g de polvo.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha fórmula infantil en polvo comprende *Bifidobacterium Bb12*. (DSM 15954)
- 20 5. Un método para preparar una fórmula infantil en polvo que comprende bacterias de ácido láctico para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, comprendiendo el método la etapa de preparar una fórmula infantil en polvo y añadir bacterias vivas de ácido láctico en una cantidad de al menos 5×10^7 UFC / g de polvo para la fórmula infantil, en la que la bacteria del ácido láctico es *Streptococcus thermophilus TH4*. (DSM 15957)
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha fórmula infantil en polvo comprende *Bifidobacterium Bb12*. (DSM 15954)

Figura 1

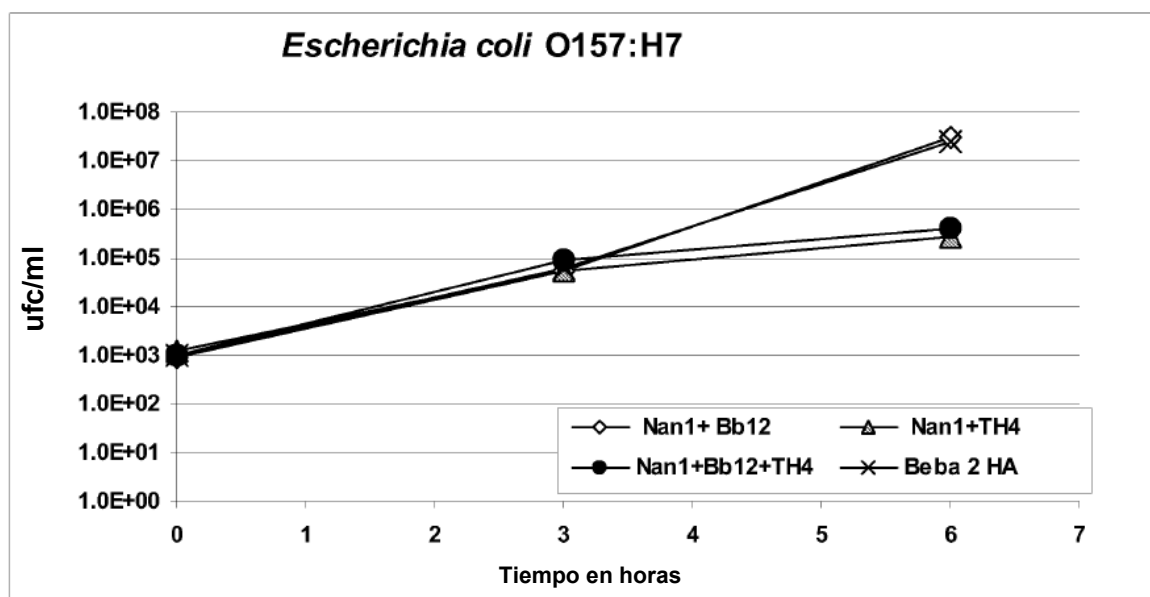


Figura 2

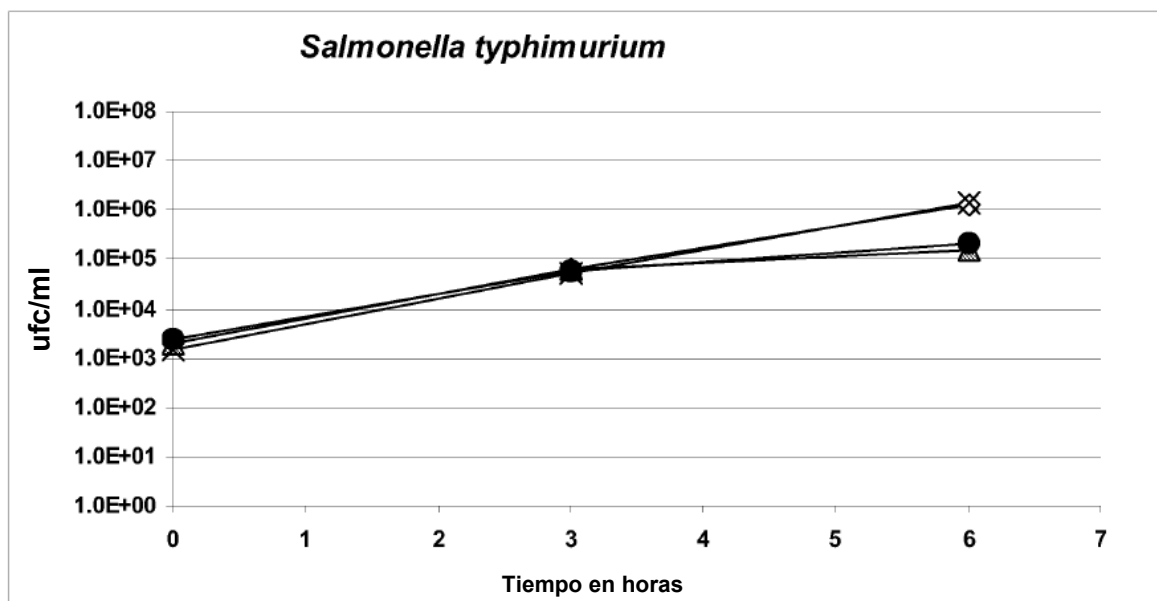


Figura 3

