

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 310**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/152 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2010 PCT/US2010/049225**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO11035093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2010 E 10817876 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2477638**

54 Título: **Estabilización de probióticos**

30 Prioridad:

20.09.2009 US 563157

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

26.09.2018

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
225 North Canal Street, 25th Floor
Chicago, Illinois 60606, US**

72 Inventor/es:

**RANGAVAJLA, NAGENDRA y
CEVALLOS, BOLIVAR**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 683 310 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

Estabilización de probióticos

5 Campo técnico de la invención

La presente divulgación se refiere a la estabilización de material biológico para la ingestión por un individuo. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a una mezcla bacteriana estabilizada que comprende proteína hidrolizada de mamífero, especialmente bovina, de modo que un organismo probiótico puede tener estabilidad mejorada durante la distribución y el almacenamiento del producto.

Estado de la técnica

Actualmente hay una variedad de composiciones para complementar los tractos gastrointestinales tanto de humanos como de animales. Estos suplementos pueden proporcionarse para alterar, reducir o aumentar la microflora dentro del intestino del individuo a fin de causar un efecto deseado en la digestión. Un ejemplo de disminución de las alergias en los bebés se divulga en el documento WO 2006/130204, concedido a Rangavajla et al. En este documento, se divulga el uso de una fórmula para bebés parcialmente hidrolizada con baja lactosa. Otros ejemplos sobre el uso de proteínas hidrolizadas en composiciones dietéticas que proporcionan diversos beneficios para la salud son suministrados por Beermann et al. (US 2009/0203592) y Edens et al. (US 2008/0220470). Además de los ejemplos anteriores relativos a proteínas hidrolizadas en composiciones dietéticas, el documento US 2009/0215718 de van Laere et al. divulga una manera de obtener una liberación sostenida y menor de glucosa después del consumo. Idealmente, la suplementación puede cultivar una microflora mejorada para los individuos, incluidos los humanos, basada en la alteración de bacterias específicas dentro del tracto gastrointestinal (GI) del ser humano. Este estilo de suplementación puede realizarse mediante el uso de probióticos que se entienden como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades efectivas, confieren un beneficio nutricional o de salud al huésped. Uno de los tipos más comunes de probióticos es una bacteria ácido láctica que puede convertir azúcares y otros carbohidratos en ácido láctico. Esta conversión reduce el pH dentro del intestino del huésped y proporciona menos oportunidades para que los organismos dañinos crezcan y causen problemas a través de infecciones gastrointestinales.

Un desafío tecnológico común es introducir los probióticos en el huésped de una manera apropiada tanto para el mantenimiento de los probióticos como para la salud y el disfrute de un individuo. Una referencia del estado de la técnica es el documento US 2007/116826. Se divulgan composiciones edulcorantes funcionales que comprenden edulcorantes de alta potencia naturales y/o sintéticos no calóricos o poco calóricos y métodos para elaborarlos y usarlos. Específicamente, el documento US 2007/116826 enseña composiciones que comprenden un probiótico o prebiótico, un edulcorante y una composición que mejora el sabor dulce. Las tecnologías actuales relacionadas con el mantenimiento de probióticos incluyen la utilización de técnicas de encapsulación y estabilización para proteger a los probióticos con una capa o matriz protectora para que el microbio protegido puede pasar al lugar apropiado dentro del tracto gastrointestinal del individuo. Por ejemplo, en Batich et al. (patente de Estados Unidos No. 5.286.495), se proporciona un proceso para microencapsular células de manera que las enzimas y bacterias que degradan oxalato puedan encapsularse tanto para la administración entérica como intraperitoneal. De acuerdo con Batich et al., las bacterias y enzimas se pueden encapsular con éxito tanto en microcápsulas de alginato como en microesferas de ftalato-acetato de celulosa. El modelo sugiere que la viabilidad permanece para las bacterias y las enzimas de modo que las células encapsuladas alcancen la región gástrica apropiada del animal.

En la solicitud de patente de Estados Unidos No. 5.733.568 expedida a Ford, se administran lactobacilos microencapsulados en la piel para tratar o prevenir infecciones cutáneas recurrentes. Las especies de lactobacilos se mezclan con una solución salina de glucosa y se agitan suavemente con una solución de alginato de sodio antes de ser forzadas a través de una aguja y secadas para crear gotas gelificadas. Otros métodos de encapsulación pueden incluir la adición de bacterias a una suspensión de polivinil povidona o hidroxipropilmetilcelulosa para encapsular las bacterias.

En la patente de Estados Unidos No. 6.465.706, expedida a Rogers et al., la encapsulación de microbios se describe para su uso en la biodescontaminación. Rogers et al. afirma que los materiales de encapsulación adecuados incluyen aglutinantes poliméricos naturales o sintéticos que abarcan tanto geles como espumas, así como polímeros de gelatina.

Aunque ha habido desarrollos concernientes a técnicas de encapsulación y estabilización para contener microorganismos para su administración al sistema digestivo de animales, ha habido poco desarrollo en técnicas de encapsulación o estabilización que protejan la viabilidad de los probióticos durante la distribución y el almacenamiento. Existe la necesidad de una técnica de estabilización cuando las circunstancias impidan la refrigeración, y además cuando tales formulaciones puedan estar expuestas a diversos ambientes, especialmente aquellos asociados con climas tropicales. Además, la humedad inherente del producto plantea un desafío ya que los probióticos generalmente son sensibles al agua, especialmente en combinación con altas temperaturas. Hasta la fecha, no se ha identificado ninguna tecnología o técnica para proporcionar una protección significativa a los

probióticos en condiciones de humedad intermedia (es decir, actividad del agua de aproximadamente 0,2 y más, y hasta aproximadamente 0,4 o más) y temperaturas altas durante la distribución y almacenamiento (es decir, temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, y hasta y por encima de 40°C) cuando se incorporan en agentes nutricionales.

5 En particular, los probióticos pueden proporcionar una variedad de beneficios al huésped, tales como mantener una flora gastrointestinal saludable, mejorar la inmunidad, proteger contra la diarrea, dermatitis atópica y otras enfermedades, etc. Como tal, existe la necesidad de probióticos para ser administrado en diversas ubicaciones geográficas, incluidos los climas tropicales, donde la viabilidad del probiótico podría verse comprometida. Las técnicas de encapsulación y estabilización convencionales generalmente se consideran adecuadas solo para
10 individuos no humanos y poseen una composición química que no es adecuada para fórmulas para bebés y para uso infantil, o tienen características de estabilidad deficientes que limitan significativamente las oportunidades comerciales.

15 Lo que se desea, por lo tanto, es una técnica de estabilización y una mezcla bacteriana estabilizada usando ingredientes aceptables ya sea para una fórmula para bebés o para nutrición infantil, posibilitando la mezcla estabilizada propiedades de estabilidad mejoradas para que los probióticos se puedan distribuir en una amplia variedad de ubicaciones geográficas y climas mientras se mantiene una vida útil durante el almacenamiento. Se desea además una tecnología de estabilización para la protección de *Lactobacillus rhamnosus* para su uso en fórmulas para bebés, suplementos y productos para niños. De hecho, una combinación de características, que
20 incluye una mejor estabilidad combinada con factores nutricionales, proporciona una mezcla de estabilización mejorada aplicable para la nutrición prenatal, infantil y para niños.

Divulgación de la invención

25 La presente divulgación proporciona una mezcla estabilizada que puede usarse para mejorar la estabilidad de un material biológico. En realizaciones de la divulgación, el sustrato estabilizado puede ser un probiótico en el que los diversos beneficios para la salud asociados con el probiótico estabilizado pueden conferirse al individuo al ingerir una composición que contiene el microbio estabilizado.

30 Aunque los probióticos se han reconocido como nutricionalmente beneficiosos, generalmente se acepta que la mayoría de los probióticos proporcionan un efecto beneficioso óptimo solo cuando el microorganismo está vivo. Para una efectividad óptima, los probióticos deben sobrevivir las condiciones de fabricación en un artículo consumible, tal como un alimento o bebida, así como el posterior despacho y tiempo de almacenamiento antes de que el producto sea ingerido para la introducción del probiótico en el tracto gastrointestinal. La mayoría de las composiciones
35 probióticas convencionales utilizan un conteo extremadamente alto de células bacterianas, entendiéndose de que un número significativo de células finalmente pierde viabilidad y muere durante el proceso de fabricación, transporte y almacenamiento. Las técnicas actuales de encapsulación y estabilización proporcionan cierta protección para los probióticos, pero no proporcionan la estabilidad deseada y, a la vez, sean funcionales para las fórmulas para bebés y los productos para niños.

40 Mediante la práctica de la presente divulgación, se incorpora proteína de mamífero hidrolizada en una mezcla estabilizada, lo que fortalece la matriz y aumenta la estabilidad de los probióticos. Como resultado, los probióticos compatibles con bebés y niños pueden estabilizarse con una mezcla que incluye proteína de mamífero hidrolizada y usarse en múltiples entornos ya que los probióticos exhiben una viabilidad mejorada. Ventajosamente, los
45 probióticos estabilizados mediante la presente divulgación pueden incorporarse en productos nutricionales y despacharse a largas distancias, ya que los probióticos mantendrán la viabilidad incluso después de un transporte y tiempo de almacenamiento prolongados debido a la estabilidad mejorada de la matriz estabilizada.

50 Más detalladamente, la invención se refiere a una composición que puede ser ingerida que comprende un probiótico estabilizado contenido en una mezcla de proteína de mamífero hidrolizada, como se define en la reivindicación 1.

Aunque la matriz estabilizada se puede utilizar para una variedad de sustancias, en una realización preferida, se utiliza para probióticos tales como *Lactobacillus rhamnosus*. Se sabe que *Lactobacillus rhamnosus* posee una bioestabilidad relativamente buena al mismo tiempo que tiene una alta aidez por las células de la mucosa intestinal humana. En uso como un probiótico, se cree que *Lactobacillus rhamnosus* coloniza el tracto digestivo y equilibra la
55 microflora intestinal.

60 En la creación de la mezcla estabilizada para el probiótico, se puede usar una proteína de mamífero hidrolizada para aumentar y fortalecer la matriz alrededor del probiótico. La proteína de mamífero hidrolizada puede incluir caseína ampliamente hidrolizada así como otras proteínas de mamífero hidrolizadas y se cree que proporciona el aumento de la resistencia debido a las características asociadas con los péptidos de cadena corta que comprenden la proteína hidrolizada. La proteína hidrolizada se puede lograr hirviendo proteína de mamífero en un ácido fuerte o una base fuerte o mediante una técnica de degradación enzimática para romper la proteína en secuencias más cortas de sus aminoácidos componentes.

65 Otros componentes de la mezcla bacteriana estabilizada pueden incluir carbohidratos que incluyen monosacáridos,

disacáridos y polisacáridos. La trehalosa, un disacárido, se puede utilizar como un carbohidrato en la mezcla de estabilización. Generalmente se sabe que tiene una capacidad de retención de agua relativamente alta y puede formar una fase de gel. La trehalosa es utilizada por plantas y animales durante periodos prolongados de desecación y se entiende que es un agente efectivo en la protección de materiales biológicos en ambientes áridos. La inulina, un polisacárido creado por una planta, es indigerible por las enzimas humanas ptialina y amilasa, ya que están adaptadas para la digestión del almidón. Como resultado, la inulina es un ingrediente útil de la mezcla de estabilización ya que atraviesa gran parte del sistema digestivo intacta y es metabolizada por la microflora en el colon, estimulando así el crecimiento de la flora bacteriana intestinal. Además, la inulina se usa para aumentar la temperatura de transición vítrea de la matriz, desplazando hacia arriba la temperatura a la que la matriz se vuelve gomosa; por lo tanto, se evita un aumento en la movilidad del agua y la degradación del probiótico a temperaturas más bajas.

Un aglutinante compuesto también se puede usar en la mezcla de estabilización, siendo un ejemplo el compuesto químico alginato de sodio. El alginato de sodio puede formar un material similar a la goma y aumentar la viscosidad de las mezclas a las que se agrega. Adicionalmente, el compuesto también puede proporcionar una mayor facilidad en la mezcla de los componentes entre sí ya que el alginato de sodio también puede poseer características de emulsionante.

La mezcla de estabilización proporciona una estabilidad mejorada del probiótico, lo que significa que un mayor porcentaje de las células probióticas son viables después de las condiciones de procesamiento, transporte y almacenamiento. Específicamente, la vida útil de los probióticos se mejora en comparación con las técnicas de encapsulación y estabilización que usan proteína intacta, proteína hidrolizada no de mamífero o proteína que no está tan ampliamente hidrolizada como se usa en el presente documento.

La mezcla de estabilización de la presente divulgación se puede usar en una multiplicidad de procesos para formar un producto probiótico estabilizado. Estos procesos incluyen congelación, secado por congelación, secado al aire ambiental, secado al vacío, secado por aspersion, secado a baja temperatura, secado a alta temperatura y una combinación de los mismos. El probiótico estabilizado resultante, ya sea solo o integrado en un producto nutricional, posee viabilidad efectiva en una amplia gama de temperaturas y condiciones, mientras exhibe una mayor vida útil. Además, el probiótico estabilizado se puede incorporar a una variedad de productos nutricionales prenatales, para bebés y para niños para mejorar su microflora intestinal al mismo tiempo que proporciona nutrición al bebé o al niño.

En consecuencia, en una realización, la divulgación es una estabilización de material biológico que proporciona una mayor estabilidad del material biológico.

Aún otra realización es una mezcla de estabilización para un probiótico.

Otra realización es una mezcla de estabilización para un probiótico que comprende proteína de mamífero hidrolizada.

Incluso otra realización es una mezcla para estabilizar un probiótico que comprende uno o más carbohidratos, un aglutinante compuesto y proteína de mamífero hidrolizada.

Otra realización es un método para aumentar la vida útil de los probióticos que comprende estabilizar el probiótico con una mezcla de estabilización que incluye proteína de mamífero hidrolizada.

Estos aspectos y otros que serán evidentes para el experto en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción se pueden lograr proporcionando una mezcla que incluye proteína de mamífero hidrolizada para la estabilización de material biológico, tal como probióticos, para proporcionar una mayor estabilidad del material biológico, que da como resultado la viabilidad mejorada a largo plazo del material biológico. En una realización, la mezcla de estabilización proporciona ventajosamente una extensión de la vida útil de los probióticos tales como *Lactobacillus rhamnosus* cuando se compara con el uso de proteína que no es de mamífero hidrolizada o no hidrolizada. La mezcla de estabilización se puede combinar con el probiótico en una variedad de métodos que incluyen liofilización, secado al aire, secado al vacío, secado por atomización y combinaciones de los mismos para preservar el probiótico.

Debe entenderse que tanto la divulgación general anterior como la siguiente descripción detallada proporcionan realizaciones de la divulgación y están destinadas a proporcionar una visión general o un marco de comprensión de la naturaleza y el carácter de la divulgación tal como se reivindica.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente divulgación proporciona una nueva fórmula de estabilización que proporciona estabilidad y protección a materiales biológicos para mejorar la viabilidad del microorganismo objetivo. La presente divulgación incluye una mezcla de estabilización que comprende una proteína de mamífero hidrolizada, que en ciertas realizaciones se combina con uno o más carbohidratos y un aglutinante compuesto que juntos proporcionan una matriz protectora que da como resultado una mayor vida útil frente a otros productos de encapsulación y estabilización que utilizan

proteínas no de mamífero hidrolizadas o no hidrolizadas.

Definiciones

5 El término "probiótico" significa un microorganismo con baja o nula patogenicidad que ejerce efectos beneficiosos sobre la salud del huésped.

Como se usa en el presente documento, el término "bebé" generalmente se define como un ser humano desde aproximadamente el nacimiento hasta los 12 meses de edad.

10 Un "bebé prematuro" es un bebé nacido después de menos de aproximadamente 37 semanas de gestación.

Un "bebé a término" tal como se usa en el presente documento significa un bebé nacido después de al menos aproximadamente 37 semanas de gestación.

15 "Niños" se definen como seres humanos mayores de aproximadamente 12 meses hasta aproximadamente 12 años.

Una "cantidad eficaz" como se usa en la presente memoria se define generalmente como una cantidad de un agente que proporciona un resultado observable en el sujeto al que se le ha administrado la misma.

20 El término "producto nutricional" como se usa en el presente documento abarca cualquier materia consumible ya sea de origen vegetal, animal o sintético que pueda contener nutrientes.

Modalidades preferidas

25 En la práctica de la presente divulgación, la proteína de mamífero hidrolizada se utiliza como un componente en una mezcla de estabilización para estabilizar material biológico. Como se usa en este documento, la proteína hidrolizada se usa para describir una molécula de proteína degradada o descompuesta de manera que se proporcionan múltiples fragmentos de péptido. Dentro de la presente divulgación, la proteína hidrolizada y el hidrolizado de proteína se usan de forma intercambiable para describir productos de hidrólisis de proteínas; proteína extensamente hidrolizada se usa para describir productos de hidrólisis de proteínas donde al menos 20%, más preferiblemente al menos 70%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, de la proteína hidrolizada tiene un peso molecular de menos de 2.000 Daltons.

35 La proteína de mamífero hidrolizada se puede crear a partir de una variedad de fuentes de proteína de mamífero, que incluyen productos lácteos y productos de origen animal. Se puede crear mediante un proceso de hidrólisis ácida en el que la proteína de mamífero se somete a un ácido fuerte y se calienta hasta que se crean los intervalos de tamaño deseados de los fragmentos de aminoácidos. Otros tipos de hidrólisis de proteínas incluyen el uso de agentes enzimáticos que digieren moléculas de proteínas para crear cadenas más cortas de aminoácidos. Los procesos comunes para hidrolizar proteínas se conocen en la técnica y se describen en la patente de los Estados Unidos No. 4.377.602 concedida a Conrad; la patente de los Estados Unidos No. 4.443.540 concedida a Chervan et al.; la patente de los Estados Unidos No. 4.545.933 concedida a Ernster; la patente de Estados Unidos No. 4.757.007 concedida a Satoh et al.; la patente de los Estados Unidos No. 4.873.108 concedida a De Rooij et al.; la patente de Estados Unidos No. 5.401.527 concedida a Brown et al.; la patente de Estados Unidos No. 6.214.585 concedida a Kwong et al.; y la patente de Estados Unidos No. 6.221.423 concedida a Cho et al.

45 Las proteínas de mamífero que se pueden hidrolizar para usar en la mezcla de estabilización de la presente divulgación incluyen proteínas de huevo, proteínas animales, aves, carne, albúmina de suero, proteínas de glicol, colágeno, gelatina, proteínas de leche, caseína, proteína de suero de leche, albumen y otros. En una realización preferida, la proteína de mamífero es una proteína bovina. Como se definió previamente, la proteína de mamífero hidrolizada de cualquiera de los tipos anteriores, en una realización preferida, está ampliamente hidrolizada, lo que significa al menos aproximadamente 70% de la proteína hidrolizada que produce péptidos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 Dalton.

55 En una realización, la proteína de mamífero hidrolizada comprende caseína hidrolizada que tiene más de aproximadamente 80%, ventajosamente más de aproximadamente 90%, de los péptidos con un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 Dalton. Se entiende que la caseína es una fosfoproteína que comprende casi el 80% de la proteína total en la leche bovina. La proteína no incluye puentes disulfuro y como resultado tiene poca estructura secundaria o terciaria. La caseína no hidrolizada incluye variantes de caseína que tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 19.000 Daltons a aproximadamente 68.000 Daltons. Una realización de un hidrolizado de proteína de mamífero, tal como hidrolizado de caseína, que se puede usar en la práctica de la presente divulgación es aquella en la que más del 90% de los péptidos tienen un peso molecular de menos de 1.000 Daltons, con más del 97% con un peso molecular de menos de 2.000 Daltons. Menos del 0,3% del hidrolizado de proteína de mamífero en ciertas realizaciones es de más de 5.000 Dalton, lo que ilustra que prácticamente toda la proteína se hidrolizó.

65 El uso de las proteínas de mamífero hidrolizadas que incluyen la caseína hidrolizada anteriormente mencionada

proporciona una protección superior a los probióticos, incluido *Lactobacillus rhamnosus*, más allá de la protección observada mediante el uso de fragmentos de péptidos más grandes o proteínas completas. Aunque sin estar ligado a ninguna teoría, una posibilidad para la mayor protección de los probióticos contra la humedad y el calor puede implicar el aumento en el potencial zeta de la superficie resultante de la proteína de mamífero hidrolizada. El potencial zeta es un valor que indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes cargadas de forma similar dentro de la dispersión. Los compuestos y moléculas más pequeños poseen un alto potencial zeta que confiere estabilidad ya que la solución o dispersión resistirá la agregación. Por el contrario, cuando el potencial zeta es bajo, la atracción supera la repulsión y la dispersión puede romperse y flocular. Mientras que la hidrofobicidad disminuye, la magnitud del potencial zeta aumenta con un grado creciente de hidrólisis. El alto grado de hidrólisis que proporciona muchas secuencias cortas de péptidos puede aumentar el potencial zeta de la interfaz de proteína en contacto con el probiótico y así aumentar la estabilidad del agente biológico tanto al calor como a la humedad. Por supuesto, esto no explica las sorprendentes diferencias entre las proteínas hidrolizadas de mamíferos y las no mamíferas.

En ciertas realizaciones, el componente mayoritario de la mezcla de estabilización basado en el peso seco es uno o más carbohidratos, que pueden incluir polisacáridos, disacáridos y monosacáridos. Los ejemplos de monosacáridos pueden incluir glucosa, fructosa, ribosa, galactosa; los disacáridos pueden incluir trehalosa, sacarosa, maltosa, lactosa, celobiosa; y los polisacáridos pueden incluir polímeros de glucosa, fructosa y galactosa, amilosa, glucógeno, celulosa, inulina, rafinosa y estaquiosa, entre otros ejemplos. En algunas realizaciones, los carbohidratos pueden incluir disacáridos tales como sacarosa y trehalosa, que se sabe que ayudan a la vida vegetal y microbiana durante los períodos de baja disponibilidad de agua. La trehalosa, también conocida como micoso, es sintetizada por hongos, plantas y ciertos animales y funciona como un carbohidrato clave en la anhidrobiosis en la que los organismos biológicos soportan períodos prolongados de desecación. Físicamente, la trehalosa puede formar una fase de gel y es útil para formar la matriz protectora alrededor del probiótico. Una realización adicional permite que pueda incluirse la inulina y proporciona una fibra soluble a menudo considerada como un prebiótico en aplicaciones nutricionales. Ventajosamente, la inulina pasa a través del estómago y el duodeno sin digerir donde está disponible para la digestión por la flora bacteriana intestinal. La incorporación de inulina puede ayudar a proteger al probiótico de las enzimas digestivas y la alta acidez hasta que el probiótico se ubique adecuadamente con la flora bacteriana del intestino donde la inulina puede ser digerida.

Un componente adicional de la mezcla de estabilización en algunas realizaciones puede ser un aglutinante compuesto (también denominado agente gelificante) que puede actuar como un espesante y producir una consistencia similar a un gel. Los ejemplos de aglutinantes compuestos incluyen alginatos tales como alginato de sodio, quitosano, carboximetilcelulosa, entre otros. La incorporación del aglutinante compuesto permite la formación de una consistencia viscosa que ayuda a la formación eficiente de matriz y una calidad estructural adecuada para el secado posterior.

La mezcla de estabilización también puede incluir ingredientes adicionales que proporcionan beneficios adicionales al probiótico o al individuo que ingiere el probiótico estabilizado. Estos ingredientes pueden comprender minerales, vitaminas, antioxidantes, oligoelementos, esteroides, antioxidantes, ácidos grasos, moléculas funcionales y combinaciones de los mismos. Otros ingredientes pueden incluir pectina, almidones resistentes, almidones con alto contenido de amilosa, guar y goma de algarroba, agar, xantano, carragenanos, glucanos, fructooligosacáridos, polifruktosas, maltodextrinas y combinaciones de los mismos.

La formación de espuma de la mezcla se puede controlar disminuyendo la cantidad de aire presente en la suspensión. En ciertas realizaciones, esto se puede lograr mezclando al vacío para producir densidades de suspensión objetivo en el intervalo de 1,0 a 1,2 g/cm³.

La mezcla de estabilización puede usarse para proporcionar estabilidad a un organismo probiótico que puede ejercer un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar de los individuos. Los ejemplos de probióticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, mohos tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* y bacterias tales como *Lactobacillus*. Ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados son: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesii*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacetyllactis*, *E. faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. mundii*, *E. thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. delbrueckii* ss. *bulgaricus*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. gasserii*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei* y *L. salivarius*.

En una realización de la presente divulgación, se utiliza *Lactobacillus rhamnosus* GG como un probiótico que puede estabilizarse mediante la presente divulgación. *Lactobacillus rhamnosus* GG se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 4.839.281, concedida a Sherwood et al. Notablemente, Sherwood et al. describen a *Lactobacillus rhamnosus* GG como una especie en la cual las bacterias tienen una adherencia ávida por las células intestinales mientras que simultáneamente son capaces de sobrevivir a bajos pH y producir grandes cantidades de ácido láctico.

El probiótico seleccionado se concentra preferiblemente hasta una consistencia pastosa húmeda antes de combinarse con la mezcla de estabilización de la presente divulgación. Comenzar con probióticos en forma seca también es una alternativa. Los niveles de concentración de los probióticos seleccionados incluyen concentraciones de aproximadamente 3X a aproximadamente 20X aunque pueden incluir concentraciones menores o mayores dependiendo de la biomasa probiótica específica y las etapas de procesamiento posteriores. Generalmente, la preparación de un probiótico estabilizado incluye las etapas de concentrar el probiótico o los probióticos seleccionados; proporcionar componentes de la mezcla de estabilización en cantidades deseadas; combinar la mezcla de estabilización con el probiótico concentrado; secar el probiótico estabilizado y empacar o combinar el probiótico estabilizado en un producto nutricional que puede incluir una fórmula para bebés.

Para ilustrar mejor los principios y operaciones de la presente divulgación, se proporciona el siguiente ejemplo. Sin embargo, este ejemplo no debe tomarse como limitante en ningún aspecto.

Ejemplo

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) se cultiva en un fermentador. La biomasa se lava posteriormente con regulador y se centrifuga para obtener un sedimento húmedo de LGG. Se mezcla previamente una mezcla de estabilización que comprende, en peso seco, aproximadamente 75% de trehalosa, aproximadamente 16,7% de caseína hidrolizada, 5,2% de inulina y aproximadamente 3,1% de alginato de sodio. A una temperatura de 37°C, el sedimento húmedo de LGG se combina con la mezcla de estabilización y suficiente agua para producir un contenido total de sólidos de aproximadamente 55%. La suspensión se mezcla al vacío para producir una densidad de aproximadamente 1,1 g/cm³.

La combinación de la mezcla de estabilización y LGG se seca a continuación al vacío o se liofiliza hasta un contenido final de humedad de aproximadamente 3%. Se prefiere que la mezcla se extienda en una bandeja en una cantidad que varía de 1076 g/m² a 1614 g/m² (100 g/pie² a 150 g/pie²). La mezcla se seca, asegurando que la temperatura del producto sea inferior a 30°C durante la eliminación del 80% del agua total. La temperatura durante la eliminación del 17% restante de humedad no debe superar los 50°C. El LGG seco y estabilizado puede posteriormente ser molido y el tamaño seleccionado mediante el uso de tamices para obtener un producto que tenga un tamaño deseable.

Al optimizar la estabilización para probióticos, los múltiples constituyentes pueden variarse en algunas realizaciones. Los carbohidratos pueden comprender de aproximadamente 70% a aproximadamente 85% de la mezcla de estabilización en base seca; la proteína de mamífero hidrolizada puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de la mezcla de estabilización en base seca y el aglutinante compuesto puede comprender de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% (es decir, hasta aproximadamente 10%) de la mezcla de estabilización en base seca.

El probiótico estabilizado, con más del 70% de la proteína de matriz que tiene un peso molecular de menos de 2.000 Daltons, se puede envasar y vender comercialmente o se puede combinar en su lugar con una variedad de productos nutricionales. Dichos productos nutricionales pueden incluir tanto fórmulas para lactantes como productos para bebés útiles para aplicaciones en las que se desee incorporar un probiótico a un producto nutricional que requiera una vida útil y estabilidad mejoradas.

Un tipo de producto nutricional para combinación con un probiótico estabilizado puede ser una fórmula para bebés. El término "fórmula para bebés" se aplica a una composición en forma líquida o en polvo que satisface los requisitos de nutrientes de un bebé al ser un sustituto de la leche humana. En los Estados Unidos, el contenido de una fórmula para bebés está dictado por las reglamentaciones federales establecidas en el Código de Regulaciones Federales, título 21, párrafos 100, 106 y 107. Estas regulaciones definen los niveles de macronutrientes, vitaminas, minerales y otros ingredientes en un esfuerzo por simular las propiedades nutricionales y de otro tipo de la leche materna humana. Otro producto nutricional puede ser un fortificante de la leche humana, lo que significa que es una composición que se agrega a la leche humana con el fin de mejorar el valor nutricional de la leche humana. Como un fortificante de leche humana, la composición puede estar en forma de polvo o líquido en combinación con el probiótico estabilizado.

El probiótico estabilizado de la divulgación se puede combinar con un producto nutricional que proporciona un soporte nutricional mínimo, parcial o total. Las composiciones pueden ser suplementos nutricionales o sustitutos de comidas. Las composiciones se pueden administrar junto con una composición alimenticia o nutricional. Las composiciones que contienen el probiótico estabilizado se pueden mezclar con el alimento u otras composiciones nutritivas antes de la ingestión por el sujeto o se pueden administrar al sujeto antes o después de la ingestión de un alimento o composición nutricional. Las composiciones pueden administrarse a bebés prematuros que reciben fórmula para bebés, leche materna, un fortificante de leche humana, o combinaciones de los mismos.

Las composiciones para combinación con el probiótico estabilizado pueden ser, aunque no necesariamente, nutricionalmente completas. El experto en la materia reconocerá que "nutricionalmente completa" varía dependiendo de una serie de factores que incluyen, entre otros, la edad, el estado clínico y la ingesta dietética del sujeto al que se

aplica el término. En general, "nutricionalmente completo" significa que una composición nutricional proporciona cantidades adecuadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y la energía requerida para el crecimiento normal. Aplicado a los nutrientes, el término "esencial" se refiere a cualquier nutriente que no puede ser sintetizado por el cuerpo en cantidades suficientes para el crecimiento normal y para mantener la salud y que, por lo tanto, debe ser suministrado por la dieta. El término "condicionalmente esencial" aplicado a los nutrientes significa que el alimento debe ser suministrado por la dieta en condiciones en las que el cuerpo no dispone de cantidades adecuadas del compuesto precursor para que se produzca la síntesis endógena.

La composición que es "nutricionalmente completa" para el bebé prematuro proporcionará, por definición, cantidades cualitativas y cuantitativamente adecuadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales, y la energía requerida para el crecimiento del bebé prematuro. La composición que es "nutricionalmente completa" para el bebé a término, por definición, proporcionará cantidades cualitativas y cuantitativamente adecuadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía, requeridos para el crecimiento del bebé a término. La composición que es "nutricionalmente completa" para un niño proporcionará, por definición, cantidades cualitativas y cuantitativas adecuadas de todos los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos esenciales, proteínas, aminoácidos esenciales, aminoácidos condicionalmente esenciales, vitaminas, minerales y energía requerida para el crecimiento de un niño.

El probiótico estabilizado creado por la presente divulgación se puede combinar con una composición nutricional proporcionada en cualquier forma conocida en la técnica, que incluye un polvo, un gel, una suspensión, una pasta, un sólido, un líquido, un concentrado líquido, o un producto listo para usar. En una combinación, la composición nutricional es una fórmula para bebés, especialmente una fórmula para bebés adaptada para su uso como única fuente de nutrición para un bebé.

Los productos nutricionales descritos para combinarse con el probiótico estabilizado se pueden administrar por vía enteral. Como se usa en este documento, "enteral" significa a través o dentro del tracto gastrointestinal o digestivo, y la "administración enteral" incluye alimentación oral, alimentación intragástrica, administración transpilórica, o cualquier otra introducción en el tracto digestivo.

Las fuentes adecuadas de grasas o lípidos pueden ser cualquiera de las conocidas o usadas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, fuentes animales, por ejemplo, grasa de la leche, mantequilla, grasa de mantequilla, lípido de yema de huevo; fuentes marinas, tales como aceites de pescado, aceites marinos, aceites de células individuales; aceites vegetales y de plantas, tales como aceite de maíz, canola, girasol, soja, palmoleína, aceite de coco, aceite de girasol alto en oleicos, aceite de onagra, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de linaza (semillas de lino), aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo con alto contenido en oleicos, estearina de palma, aceite de semilla de palma, aceite de germen de trigo; aceites y emulsiones de triglicéridos de cadena media y ésteres de ácidos grasos; y cualquier combinación de los mismos.

La proteína de leche bovina del producto nutricional puede incluir, pero no se limita a, proteínas de leche en polvo, concentrados de proteína de leche, aislados de proteína de leche, sólidos de leche descremada, leche descremada, leche descremada en polvo, proteína de suero, aislados de proteína de suero, concentrados de proteína de suero, suero dulce, suero ácido, caseína, caseína ácida, caseinato (por ejemplo, caseinato de sodio, caseinato de sodio y calcio, caseinato de calcio) y cualquier combinación de los mismos.

El probiótico estabilizado se puede combinar con un producto nutricional que tiene sus proteínas proporcionadas como proteínas intactas. En otras realizaciones, las proteínas del producto nutricional se proporcionan como una combinación de proteínas intactas y proteínas parcialmente hidrolizadas, con un grado de hidrólisis de entre aproximadamente 4% y 10%. Algunas de estas realizaciones pueden ser extremadamente hipoalergénicas ya que tanto el estabilizador como la proteína del producto nutricional contienen solo proteína hidrolizada. En otra realización más, el producto nutricional se puede complementar con péptidos que contienen glutamina.

La relación de suero:caseína de la fuente de proteína del producto nutricional puede ser similar a la encontrada en la leche materna humana. En una realización, la fuente de proteína del producto nutricional comprende de aproximadamente 40% a aproximadamente 80% de proteína de suero de leche. En otra realización, la fuente de proteína puede comprender de aproximadamente 20% a aproximadamente 60% de caseínas.

Cuando el probiótico estabilizado se combina con el producto nutricional, la composición puede incluir una cantidad de probióticos de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) por kg de peso corporal por día. En otras realizaciones, la cantidad del probiótico dentro del probiótico estabilizado puede variar de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 ufc por kg de peso corporal por día. Incluso en realizaciones adicionales, la composición del producto nutricional y el probiótico estabilizado puede incluir una cantidad de probióticos de aproximadamente al menos aproximadamente 10^6 ufc por kg de peso corporal por día. En otra realización, la concentración del probiótico, por ejemplo LGG, en la micromatriz es de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{14} cfu por g, más preferiblemente de aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{11} cfu por

gramo.

En una realización, el probiótico o los probióticos estabilizados pueden ser viables o no viables, aunque los viables son los preferidos. Como se usa en el presente documento, el término "viable" se refiere a microorganismos vivos, es decir, que comprende células microbianas viables. El término "no viable" o "probiótico no viable" significa microorganismos probióticos no vivos, sus componentes celulares y metabolitos de los mismos. Dichos probióticos no viables pueden haber sido eliminados por calor o inactivados de otro modo, pero pueden retener cierta capacidad para influir favorablemente en la salud del huésped. Los probióticos estabilizados útiles en la presente divulgación pueden ser de origen natural, sintéticos o desarrollarse a través de la manipulación genética de organismos, ya sea que se conozca o desarrolle posteriormente tal nueva fuente. Además, el producto nutricional puede incluir probióticos no estabilizados con la composición final que incluye algunos probióticos estabilizados y algunos probióticos no estabilizados.

Los probióticos estabilizados también se pueden combinar con una composición nutricional que contiene uno o más prebióticos. El término "prebiótico" como se usa en el presente documento se refiere a ingredientes alimenticios indigeribles que ejercen beneficios para la salud del huésped. Dichos beneficios para la salud pueden incluir, entre otros, la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de bacterias intestinales beneficiosas, la estimulación del crecimiento y/o la actividad de microorganismos probióticos ingeridos (estabilizados o no), reducción selectiva de patógenos intestinales e influencia favorable en el perfil de ácidos grasos de cadena corta intestinal. Dichos prebióticos pueden ser de origen natural, sintéticos o desarrollarse a través de la manipulación genética de organismos y/o plantas, ya sea que dicha nueva fuente se conozca o se desarrolle posteriormente. Los prebióticos pueden incluir oligosacáridos, polisacáridos y otros prebióticos que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa. Más específicamente, los prebióticos útiles en la presente divulgación pueden incluir lactulosa, lactosacarosa, rafinosa, glucooligosacárido, inulina, polidextrosa, polidextrosa en polvo, galactooligosacárido, fructooligosacárido, isomaltooligosacárido, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilooligosacárido, chitooligosacárido, manooligosacárido, arabinooligosacárido, sialiloligosacárido, fucooligosacárido, y genticooligosacáridos, y combinaciones de los mismos.

En algunas composiciones de productos nutricionales que incluyen probióticos estabilizados, la cantidad total de prebióticos presentes en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 10,0 g/L de la composición (en forma líquida). Como se observa, la cantidad total de prebióticos presentes en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 2,0 g/L y aproximadamente 8,0 g/L de la composición. Al menos el 20% de los prebióticos debería comprender, en una realización preferida, galactooligosacárido (GOS).

Además de galactooligosacárido, la composición prebiótica también puede comprender polidextrosa (PDX). Si se usa polidextrosa como un prebiótico, la cantidad de polidextrosa en la composición nutricional puede, en una realización, estar dentro del intervalo de aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 4,0 g/L.

La cantidad de galactooligosacárido en la composición nutritiva puede ser de aproximadamente 0,2 mg/100 Kcal a aproximadamente 1,0 mg/100 Kcal. En otras composiciones, la cantidad de galactooligosacárido en la composición nutricional puede ser de aproximadamente 0,1 mg/100 Kcal a aproximadamente 0,5 mg/100 Kcal. Si se utiliza polidextrosa como un prebiótico, la cantidad de polidextrosa en la composición nutricional puede, en una realización de la composición que incluye probióticos estabilizados, estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 mg/100 Kcal a aproximadamente 0,5 mg/100 Kcal. En otra composición, la cantidad de polidextrosa puede ser de aproximadamente 0,3 mg/100 Kcal. El galactooligosacárido y la polidextrosa también pueden complementarse en la composición nutritiva que contiene probióticos estabilizados en una cantidad total de aproximadamente 0,6 mg/100 Kcal.

La formulación nutricional en la que se pueden combinar los probióticos estabilizados de la presente divulgación, puede contener una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) que comprende ácido docosahexaenoico (DHA). Otros LCPUFA adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido α -linoleico, ácido γ -linoleico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA).

En una realización, la composición final se puede complementar con DHA y ARA. En esta realización, la relación en peso de ARA:DHA puede ser de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 9:1. En una realización, esta relación es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 4:1.

La cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la composición nutricional puede variar de aproximadamente 5 mg/100 kcal a aproximadamente 100 mg/100 kcal, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/100 kcal a aproximadamente 50 mg/100 kcal.

Una composición nutritiva se puede complementar con aceites que contienen DHA y ARA usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Por ejemplo, DHA y ARA se pueden agregar a la fórmula reemplazando una cantidad equivalente de un aceite, tal como aceite de girasol alto en oleico, normalmente presente en la fórmula. Como otro ejemplo, los aceites que contienen DHA y ARA se pueden agregar reemplazando una cantidad equivalente del resto de la mezcla de grasa general normalmente presente en la fórmula sin DHA y ARA.

Si se utiliza, la fuente de DHA y ARA puede ser cualquier fuente conocida en la técnica, tal como aceite marino, aceite de pescado, aceite de células individuales, lípido de yema de huevo y lípido cerebral. En algunas composiciones, el DHA y el ARA provienen del aceite de Martek de una sola célula, DHASCO®, o variaciones de los mismos. El DHA y el ARA pueden estar en forma natural, siempre que el resto de la fuente de LCPUFA no produzca ningún efecto perjudicial sustancial en el bebé. Alternativamente, el DHA y el ARA se pueden usar en forma refinada.

En una realización de la composición nutricional combinada con probióticos estabilizados, las fuentes de DHA y ARA son aceites de células individuales como se divulga en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.374.567; 5.550.156; y 5.397.591.

En ciertas realizaciones, la composición nutricional puede ser una composición nutricional a base de leche que proporciona beneficios fisicoquímicos y fisiológicos. Como es sabido en la técnica, la proteína de leche bovina comprende dos componentes principales: proteína de suero soluble en ácido y caseína insoluble en ácido, representando esta última aproximadamente el 80% del contenido total de proteína de la leche bovina. Al entrar en el ambiente ácido del estómago, la caseína se precipita y forma complejos con minerales que forman cuajadas semisólidas de diferentes tamaños y firmeza. Las cuajadas más suaves y más pequeñas son más fáciles de digerir por el cuerpo que las cuajadas más grandes y duras. La formación de cuajada puede ser una consideración importante en el desarrollo de composiciones nutricionales, que incluyen, entre otras, fórmulas para bebés, alimentos médicos y fórmulas para bebés prematuros. Como tal, los probióticos estabilizados se pueden combinar con composiciones que incluyen cuajadas más suaves y más pequeñas que las fórmulas estándar para bebés.

En otras realizaciones, los probióticos estabilizados de la presente divulgación se pueden combinar con composiciones nutricionales que incluyen lactoferrina bovina que conserva su estabilidad y actividad en el intestino humano frente a ciertos patógenos bacterianos indeseables. La composición nutricional de la divulgación también puede contener TGF- β . En composiciones nutricionales, el nivel de TGF- β puede ser de aproximadamente 0,0150 (pg/ μ g) ppm a aproximadamente 0,1000 (pg/ μ g) ppm. En otras composiciones nutricionales, el nivel de TGF- β en la composición final que incluye un probiótico estabilizado es de aproximadamente 0,0225 (pg/ μ g) ppm a aproximadamente 0,0750 (pg/ μ g) ppm.

En algunas composiciones, el nivel de TGF- β es de aproximadamente 2.500 pg/mL a aproximadamente 10.000 pg/mL, más preferiblemente de aproximadamente 3.000 pg/mL a aproximadamente 8000 pg/mL.

En una realización, la relación de TGF- β 1:TGF-B2 está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:20, o, más particularmente, en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:15.

En algunas realizaciones, la bioactividad de TGF- β en una composición nutricional se mejora mediante la adición de una fracción bioactiva de suero. Cualquier fracción bioactiva de suero conocida en la técnica se puede usar en esta realización siempre que logre el resultado deseado. En una realización, esta fracción bioactiva de suero puede ser un concentrado de proteína de suero de leche. En una realización particular, el concentrado de proteína de suero de leche puede ser Salibra® 800, disponible a través de Glanbia Nutritionals. En una realización particular, el concentrado de proteína de suero Salibra® 800 tiene una acidificación del 2,5%. En otra realización, el concentrado de proteína de suero Salibra® 800 tiene una acidificación del 5%. En otra realización más, el concentrado de proteína de suero Salibra® 800 tiene una acidificación del 2%. En una realización adicional, el concentrado de proteína de suero Salibra® 800 tiene una acidificación del 3%.

En otra realización, el concentrado de proteína de suero de leche puede ser Nutri Whey 800, disponible a través de DMV International. En otra realización más, el concentrado de proteína de suero de leche puede ser Salibra-850, disponible a través de Glanbia Nutritionals. En otra realización más, el concentrado de proteína de suero de leche puede ser Prolecta Lactalis WPI90, disponible a través de Lactilus Industries U.S.A., Inc. En una realización adicional, el concentrado de proteína de suero de leche puede ser suministrado por MG Nutritionals.

De acuerdo con esto, mediante la práctica de la presente divulgación, se preparan probióticos estabilizados que tienen estabilidad hasta ahora no reconocida. La mezcla bacteriana estabilizada exhibe una estabilidad excepcionalmente alta mediante el uso de proteína de mamífero hidrolizada, especialmente proteína de mamífero hidrolizada con más del 70% de los péptidos con un peso molecular de menos de 2.000 Dalton. Los probióticos estabilizados son excepcionalmente efectivos para aplicaciones nutricionales con niveles de humedad intermedios (tal como una actividad de agua tan alta como 0,4) donde se desea mayor vida útil y estabilidad en ambientes cálidos y húmedos. Los probióticos estabilizados pueden empacarse por separado o combinarse con cualquiera de las realizaciones de las composiciones nutricionales descritas en este documento.

Aunque las realizaciones preferidas de la divulgación se han descrito usando términos, dispositivos y métodos específicos, dicha divulgación es solo para fines ilustrativos. Los términos utilizados son términos con propósitos descriptivos en vez de limitativos. Debe entenderse que los expertos en la técnica pueden realizar cambios y variaciones sin apartarse del alcance de la presente divulgación, que se expone en las siguientes reivindicaciones.

Además, debe entenderse que los aspectos de las diversas realizaciones pueden intercambiarse tanto en su totalidad como en parte. Por ejemplo, aunque se han ejemplificado los métodos para la producción de un suplemento nutricional líquido estéril comercialmente fabricado según estos métodos, se contemplan otros usos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición ingerible que comprende:
 - 5 un probiótico estabilizado contenido en una mezcla de proteína de mamífero hidrolizada, en la que la proteína hidrolizada comprende de aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 20 por ciento de los componentes de la mezcla en base seca y al menos 20% de la proteína de mamífero hidrolizada total está compuesta de proteína que tiene un peso molecular de menos de 2.000 Daltons; uno o más carbohidratos; y
 - 10 un aglutinante compuesto que comprende alginato de sodio.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el probiótico comprende células microbianas viables.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que las células microbianas viables comprenden *Lactobacillus rhamnosus*.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que la proteína de mamífero hidrolizada comprende caseína hidrolizada.
- 20 5. La composición de la reivindicación 1, en la que al menos el 70% de la proteína de mamífero hidrolizada total está compuesta por proteína que tiene un peso molecular de menos de 2.000 Dalton.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que al menos el 90% de la proteína de mamífero hidrolizada total está compuesta por proteína que tiene un peso molecular de menos de 2.000 Daltons.
- 25 7. La composición ingerible de la reivindicación 1, en la que el probiótico comprende un probiótico no viable.
8. La composición ingerible de la reivindicación 7, en la que el probiótico no viable se ha eliminado por calor.
- 30 9. La composición ingerible de la reivindicación 1, en la que la composición es una fórmula para bebés.