

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 538**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/US2011/066461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12088261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11807839 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2654417**

54 Título: **Composiciones crioprotectoras y uso de las mismas**

30 Prioridad:

23.12.2010 US 201061426645 P
23.12.2010 EP 10196808

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2018

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K , DK

72 Inventor/es:

HOLLARD, CHRISTOPHE;
FETT, DAVID y
WEXØE PETERSEN, LARS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 688 538 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

Composiciones crioprotectoras y uso de las mismas

5 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones crioprotectoras y a usos de las mismas.

Antecedentes de la invención

10

La actividad, la viabilidad y la conservación a largo plazo de material biológico, en particular microorganismos y células eucariotas, y de moléculas activas, por ejemplo, enzimas, se pueden ver afectadas por una diversidad de factores ambientales, por ejemplo, temperatura, pH, presencia de agua y oxígeno o agentes oxidantes o reductores. Por lo general, el material biológico y las moléculas activas, y en especial los microorganismos, se deben someter a un proceso de conservación para su conservación a largo plazo, por ejemplo se deben secar, congelar o liofilizar, antes o durante la mezcla con otros ingredientes de productos alimenticios o para el consumo directo como suplementos dietéticos. Estos procesos de conservación a menudo pueden dar como resultado una pérdida significativa de actividad y viabilidad debido a estrés mecánico, químico, y osmótico inducido por el proceso de conservación. Además, la pérdida de actividad y viabilidad se puede producir en muchas otras etapas distintas, por ejemplo el secado durante la fabricación de un producto alimenticio, la preparación del alimento (alta temperatura y alta presión), el transporte y el almacenamiento a largo plazo (temperatura y exposición a humedad), etc. La fabricación de alimentos o productos alimenticios con materiales vivos es particularmente exigente, debido a que los organismos vivos son muy sensibles a los procesos de conservación y a la temperatura y las condiciones de humedad del alimento o producto alimenticio.

25

Como resultado, la mayoría de los materiales biológicos o las moléculas activas pierden viabilidad o actividad durante el proceso de conservación, el proceso de fabricación, el transporte o el almacenamiento. Para compensar tal pérdida, se incluye una cantidad excesiva de material biológico o moléculas activas en el producto con la expectativa de que solo una parte sobreviva o permanezca activa. Además de una viabilidad cuestionable de vida en anaquel para estos productos, sin ninguna duda tales prácticas no son rentables. De ese modo, se han usado diversos agentes protectores en la técnica, con grados variables de éxito. Estos incluyen proteínas, ciertos polímeros, leche desnatada, glicerol, polisacáridos, y oligosacáridos. También se han sometido a ensayo disacáridos, tales como sacarosa y trehalosa (De Antoni, G.L. *et al.*, *Cryobiology* 26, 149-153 (1989); y Leslie, S. B. *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, Octubre de 1995, pág. 3592-3597), como crioprotectores.

35

Sin embargo, ninguno de los crioprotectores disponibles hasta la fecha son satisfactorios en términos de conservación de la viabilidad o de la actividad del material biológico o las moléculas activas. De ese modo, existe la necesidad de nuevos crioprotectores que confieran un aumento de viabilidad o un aumento de conservación de la actividad a material biológico o moléculas activas sometidos a un proceso de conservación, y en especial microorganismos. El documento de Patente US 2007/105186 desvela la conservación de células microbianas usando, entre otros, trehalosa e inositol.

40

Sumario de la invención

45 La invención se refiere a una composición sinérgica. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una combinación particular de un azúcar o azúcares y un poliol o polioles, en una cantidad específica, aumenta la viabilidad y/o conservación de la actividad de material biológico o moléculas activas sometidos a un proceso de conservación, y en especial microorganismos.

50 De ese modo, la invención se refiere a composiciones que comprenden:

- (a) un azúcar no reductor, y
- (b) inositol o un derivado del mismo, en las que dicho derivado es un inositol en el que se ha modificado o sustituido al menos una de las funciones hidroxilo,

55

en las que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es de 1,1 a 1,7, y

- (c) microorganismos.

60 La invención también se refiere a usos de las composiciones de acuerdo con la invención para conservar microorganismos.

La invención también se refiere a métodos para conservar microorganismos, que comprenden las siguientes etapas:

- 65
- preparar una composición de acuerdo con la invención,
 - añadir dicha composición a microorganismos para obtener una composición que comprende material biológico

- y/o moléculas activas,
 - someter dicha composición que comprende microorganismos a al menos una etapa de conservación, en particular una etapa de congelación, secado o liofilización.

5 La invención también se refiere a microorganismos conservados obtenibles mediante un método de acuerdo con la invención.

La invención se refiere además a productos alimenticios, productos alimentarios, productos para el cuidado del consumidor o productos agrícolas que comprenden un material biológico y/o una molécula activa conservados de
 10 acuerdo con la invención.

Definiciones

15 De acuerdo con la invención, un "azúcar no reductor" es cualquier azúcar que, en solución, no contiene ningún carbonilo libre ni carbono anomérico, estando implicado en el enlace glucosídico el carbono carbonílico del grupo aldehído o cetona. El azúcar no reductor es por lo general un "disacárido no reductor" en el que los carbonos anoméricos de las dos unidades están unidos entre sí, tal como, por ejemplo, sacarosa, trehalosa, o los derivados de los mismos.

20 Por "derivado de trehalosa" se pretende indicar un compuesto que se obtiene a partir de trehalosa mediante un proceso químico o físico, en el que dicho compuesto no contiene ningún carbonilo libre ni carbono anomérico, estando implicado en el enlace glucosídico el carbono carbonílico del grupo aldehído o cetona.

25 Por "derivado de sacarosa" se pretende indicar un compuesto obtenido a partir de sacarosa mediante un proceso químico o físico, en el que dicho compuesto no contiene ningún carbonilo libre ni carbono anomérico, estando implicado en el enlace glucosídico el carbono carbonílico del grupo aldehído o cetona.

30 De acuerdo con la invención, "inositol" se refiere a ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol ($C_6H_{12}O_6$), que es un ciclohexano con seis grupos alcohol (poliol). "Inositol" de acuerdo con la invención se refiere a uno cualquiera de sus posibles estereoisómeros, tal como, por ejemplo, myo-, epi-, scylo-, chiro-, muco-, alo-, o meso-inositol.

De acuerdo con la invención, un "derivado de inositol" se refiere a inositol en el que se ha modificado o sustituido al menos una de las funciones hidroxilo. Algunos ejemplos de derivados de inositol son inositol fosfatado, sulfatado o metilado.

35 De acuerdo con la invención, una "composición crioprotectora" es una composición que proporciona a los compuestos o elementos cierta protección frente a los efectos perjudiciales de temperaturas bajas o de congelación, tales como a las que se someten, por ejemplo, en procesos de liofilización o congelación. Además, en el caso de liofilización o secado, confiere a los elementos secos cierta estabilidad a través del proceso de secado. La acción de
 40 la composición crioprotectora reducirá la pérdida de actividad o viabilidad durante el proceso de fabricación y posteriormente su acción mejora la actividad/viabilidad del material biológico o las moléculas activas durante el almacenamiento.

45 De acuerdo con la invención, "material biológico" se refiere a material que es capaz de autorreplicación ya sea directa o indirectamente. Algunos ejemplos representativos incluyen microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos, mohos, levaduras, *archaea*, protistas), algas, protozoos, células eucariotas, líneas celulares, hibridomas, plásmidos, virus, células de tejido de plantas, líquenes y semillas.

50 De acuerdo con la invención, una "molécula activa" se refiere a cualquier molécula que tiene un efecto en un tejido vivo. Algunos ejemplos de moléculas activas son proteínas que tienen actividad biológica, tales como, por ejemplo, enzimas, aminoácidos, proteínas, anticuerpos.

Descripción detallada de la invención

55 Composiciones

Los presentes inventores han descubierto que la presencia de una combinación de al menos un azúcar no reductor con inositol o un derivado de inositol en una composición que comprende material biológico y/o moléculas activas disminuye la pérdida de viabilidad y/o actividad de dicho material biológico y/o moléculas activas observada
 60 generalmente durante o después de un proceso de conservación. De ese modo, la invención se refiere a una composición que comprende:

- (a) un azúcar no reductor, y
 65 (b) inositol o un derivado del mismo, derivado en el que se ha modificado o sustituido al menos una función hidroxilo,

en la que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es de 1,1 a 1,7, y

(c) microorganismos.

5 Mediante el uso de esta combinación de azúcar o azúcares y poliol o polioles en la proporción particular de la invención se obtiene, por ejemplo, una excelente recuperación de células sometidas a un proceso de conservación. Dentro de esta proporción específica, esta combinación de azúcar o azúcares y poliol o polioles actúa como una sinergia.

10 En una realización, dicha composición de acuerdo con la invención consiste en:

(a) un azúcar no reductor, y

(b) inositol o un derivado del mismo, derivado en el que se ha modificado o sustituido al menos una función hidroxilo,

15 en la que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es de 1,1 a 1,7, y

(c) microorganismos.

20 Las composiciones de acuerdo con la invención tienen preferentemente una proporción p/p de (a)/(b) de 1,1 a 1,7. De acuerdo con una realización, las composiciones de acuerdo con la invención tienen una proporción p/p de (a)/(b) de 1,2 a 1,7, particularmente de 1,3 a 1,7, de 1,4 a 1,6, de 1,45 a 1,55 o, más particularmente, de 1,5.

25 En otra realización, en las composiciones de acuerdo con la invención, dicha (a) es una mezcla de azúcares no reductores.

En una realización particular, dicho azúcar o azúcares no reductores se seleccionan entre el grupo que comprende trehalosa, derivados de trehalosa, sacarosa, y derivados de sacarosa.

30 En una realización, en las composiciones de acuerdo con la invención, (a) es trehalosa y (b) es inositol.

Composiciones que comprenden material biológico y/o moléculas activas

35 Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden microorganismos, por lo general seleccionados entre bacterias, hongos, mohos, levaduras, *archaea*, protistas o cualquier mezcla de los mismos.

En una realización, dichos hongos/mohos se seleccionan entre *Penicillium spp*, *Geotrichum spp*, *Lecanicillium spp*, y *Trichothecium spp*.

40 En una realización, dichas levaduras se seleccionan entre *Kluyveromyces spp*, *Debaryomyces spp*, *Yarrowia spp*, *Pichia spp*, *Williopsis spp*, y *Saccharomyces spp*.

45 En una realización preferente, dichos microorganismos se seleccionan entre bacterias. Las bacterias se pueden seleccionar entre cualquier género o especie. Las bacterias preferentes de acuerdo con la invención son bacterias ácido lácticas, *Bacillus* y bacterias del género *Corynebacterium* tales como, por ejemplo, *Arthrobacter spp*, *Corynebacterium spp*, *Brevibacterium spp*. De acuerdo con la invención, la expresión "bacterias ácido lácticas" incluye cualquier bacteria capaz de producir, como producto metabólico final principal de la fermentación de carbohidratos, ácido láctico o al menos uno de sus derivados (que incluyen, pero no se limitan a, ácido propiónico). Por lo tanto, el término pretende incluir bacterias del ácido propiónico (PAB), que producen ácido propiónico como producto de fermentación de carbohidratos. Preferentemente, las bacterias en la presente invención son bacterias ácido lácticas que se reconocen generalmente como seguras para consumo animal o humano (es decir, aprobadas como GRAS).

55 Las bacterias ácido lácticas adecuadas se pueden seleccionar entre los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y las mezclas de los mismos. Por lo general, los microorganismos son probióticos o DFM (microorganismos de alimentación directa, o *Direct Fed Microbials*). De acuerdo con la invención, "probióticos" o "DFM" significa microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable para el hospedador, siendo el hospedador un ser humano en el caso de los probióticos y un animal en el caso de los DFM.

60 En una realización particular, dichas bacterias ácido lácticas se seleccionan entre el grupo que comprende las cepas de las especies y subespecies de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbruckii bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentoseus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus*

acidilactici, *Pediococcus pervulus*, *Propionibacterium freudenreichi*, *Propionibacterium jensenii* y *Streptococcus salivarius*.

5 En una realización, las composiciones que comprenden microorganismos de acuerdo con la invención comprenden microorganismos en una concentración de 1E8 CFU/g de composición a 5E12 CFU/g de composición, particularmente de 1E9 CFU/g de composición a 1E12 CFU/g de composición, más particularmente de 1E10 CFU/g de composición a 1E11 CFU/g de composición.

10 En una realización, las composiciones que comprenden material biológico y/o moléculas activas de acuerdo con la invención comprenden:

- (a) al menos un 4 % en peso de dicho azúcar no reductor, y
- (b) al menos un 3 % en peso de dicho inositol o un derivado del mismo,

15 en las que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es como se ha definido anteriormente.

En una realización particular, las composiciones que comprenden material biológico y/o moléculas activas de acuerdo con la invención comprenden:

20 (a) al menos un 5 %, particularmente al menos un 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, o al menos un 16 % en peso de dicho azúcar no reductor, y
(b) al menos un 4 %, particularmente al menos un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, o al menos un 13 % en peso de dicho inositol o un derivado del mismo,

25 en las que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es como se ha definido anteriormente.

En otra realización, las composiciones que comprenden microorganismos de acuerdo con la invención comprenden:

30 (a) de un 4 % a un 16 %, particularmente de un 4 % a un 15 %, de un 4 % a un 14 %, de un 4 % a un 13 %, de un 4 % a un 12 %, de un 5 % a un 13 %, de un 6 % a un 13 %, o de un 7 % a un 13 % en peso de dicho azúcar no reductor, y
(b) de un 3 % a un 13 %, particularmente de un 3 % a un 12 %, de un 3 % a un 11 %, de un 3 % a un 10 %, de un 3 % a un 9 %, de un 3 % a un 8 %, de un 4 % a un 10 %, de un 4 % a un 9 %, de un 5 % a un 10 %, o de un 5 % a un 9 % en peso de dicho inositol o un derivado del mismo,

35 en las que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es como se ha definido anteriormente.

Formulación de las composiciones de acuerdo con la invención

40 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser sólidas, líquidas o estar en forma pastosa.

En una realización preferente están en forma líquida.

45 Las composiciones líquidas de acuerdo con la invención son por lo general composiciones acuosas (por ejemplo, los componentes están diluidos en agua).

50 Además del azúcar o azúcares y el poliol o polioles crioprotectores, y los microorganismos, las composiciones de acuerdo con la invención también pueden comprender otros componentes tales como, por ejemplo, otros disacáridos (por ejemplo melibiosa, lactulosa), oligosacáridos (por ejemplo rafinosa), oligofructosas, polisacáridos (por ejemplo maltodextrinas, dextrano, PEG, o goma de xantano, alginato, pectina, celulosa), pentosas (por ejemplo ribosa, xilosa), hexosas (por ejemplo fructosa, manosa, sorbosa), sales (fosfato, etc.).

Aplicaciones y métodos

55 Las composiciones de acuerdo con la invención son muy eficaces en la conservación de la viabilidad o la actividad de microorganismos. De ese modo, la invención se refiere al uso de una composición que comprende un azúcar no reductor e inositol o un derivado del mismo de acuerdo con la invención para la conservación de microorganismos. De hecho, gracias a las composiciones de acuerdo con la invención, la viabilidad del material biológico y/o la actividad de las moléculas activas mejoran durante y después del proceso de conservación.

60 En una realización del uso de acuerdo con la invención, la composición que comprende un azúcar no reductor e inositol o un derivado del mismo de acuerdo con la invención se añade a los microorganismos antes de una etapa de conservación, tal como una etapa de congelación, secado o liofilización.

65 Las composiciones de acuerdo con la invención también son muy eficaces en la reducción de la higroscopicidad de microorganismos secos o liofilizados. Por higroscopicidad se pretende indicar la tendencia del material seco a

absorber agua rápidamente y a cambiar sus propiedades físicas cuando su contenido de humedad aumenta.

La invención también se refiere a métodos para la conservación de material biológico o moléculas activas que comprenden las siguientes etapas:

- preparar una composición que comprende un azúcar no reductor e inositol o un derivado del mismo de acuerdo con la invención,
- añadir dicha composición a microorganismos para obtener una composición que comprende microorganismos,
- someter dicha composición que comprende microorganismos a al menos una etapa de conservación.

La etapa de conservación es preferentemente una etapa de congelación, secado o liofilización. La etapa de congelación, secado o liofilización se puede llevar a cabo de acuerdo con procedimientos clásicos bien conocidos por el experto en la materia. Algunos ejemplos de procesos de conservación se desvelan, por ejemplo, en el siguiente documento: "*bactéries lactiques, de la genétique aux ferments*", George Corrieu y Francois-Marie Luquet, Lavoissier. Preferentemente, la etapa de conservación es una etapa de liofilización.

En una realización particular de los usos y los métodos de acuerdo con la invención, dichos microorganismos están en forma de un concentrado de microorganismos.

Un "concentrado de microorganismos" de acuerdo con la invención se refiere a microorganismos que se han sometido a al menos una etapa de concentración antes de su cultivo o síntesis. Algunos ejemplos de etapas de concentración son centrifugación, filtración, evaporación, sedimentación o floculación.

En una realización particular, la composición de acuerdo con la invención se añade al concentrado de microorganismos en las concentraciones que se han definido anteriormente.

La invención también se refiere a microorganismos congelados, secos o liofilizados conservados.

La invención también se refiere a productos alimenticios, productos alimenticios para animales, productos para el cuidado del consumidor o productos agrícolas que comprenden microorganismos conservados obtenibles mediante los métodos de acuerdo con la invención, especialmente microorganismos congelados, secos o liofilizados obtenibles mediante los métodos de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención, por "producto alimenticio" se pretende indicar un producto o una preparación que está destinado para alimentar a un ser humano.

De acuerdo con la invención, por "producto alimenticio para animales" se pretende indicar un producto o preparación que está destinado a alimentar a un animal.

De acuerdo con la presente invención, "productos para el cuidado del consumidor" incluyen suplementos dietéticos, nutracéuticos y productos sin receta médica. Un consumidor puede ser un ser humano y/o un animal.

Un suplemento dietético (también denominado suplemento alimenticio o suplemento nutricional) significa una preparación destinada a proporcionar nutrientes, tales como vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos o aminoácidos, de los que carece, o que no se consumen en una cantidad suficiente en, la dieta de una persona. Un suplemento dietético puede ser para consumo humano y/o animal. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos de acuerdo con la invención se envasan en polvo en sobrecitos o barritas, se incorporan en polvo a un comprimido, se rellenan en polvo en cápsulas.

El término "nutracéutico" significa un alimento funcional que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional y/o una satisfacción de sabor, sino que también es capaz de suministrar efectos terapéuticos (u otros efectos beneficiosos) al consumidor.

Un "producto sin receta médica" significa medicinas sin prescripción que pueden prevenir ciertas enfermedades o reducir síntomas asociados a salud intestinal o salud inmunitaria, estimulando de ese modo la salud intestinal o mejorando la función inmune. Por ejemplo, estos productos permiten la prevención y el tratamiento de alergias, la prevención y el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio y otras aplicaciones nuevas de probióticos y microorganismos de alimentación directa (DFM).

De acuerdo con la presente invención, la expresión "producto agrícola" incluye biopesticidas, biofertilizantes, productos para el cuidado de las plantas, compost y productos secundarios así como productos de bioenergía (bioetanol, bioéster).

En una realización particular de la invención, dicho producto es un producto alimenticio. Más particularmente, el producto alimenticio es un producto lácteo. Algunos ejemplos de productos lácteos de acuerdo con la invención son leche fermentada, un yogur, una crema madurada, un queso, un queso fresco, una bebida de leche, un retentato de

producto lácteo, un queso procesado, un postre de crema, un requesón o una leche para bebés. Más habitualmente, el producto lácteo de acuerdo con la invención incluye leche de origen animal y/o planta.

- 5 Todas las realizaciones específicas y preferentes que se han descrito anteriormente para las composiciones, por ejemplo la naturaleza de los microorganismos, las proporciones preferentes, etc., también se aplican para estos usos, métodos y productos.

Breve descripción de la figura

- 10 Figura 1: recuperación de células después de ensayo acelerado en función de la proporción de trehalosa/inositol.

Ejemplos

Medición de recuentos celulares

- 15 El recuento celular del material liofilizado se evaluó a través de un método de recuento de bacterias habitual usado para bacterias ácido lácticas. En este método, las bacterias liofilizadas se suspendieron en una solución MRS con un homogeneizador Stomacher y se revitalizaron en esa solución durante 30 minutos. A continuación la suspensión se diluyó sucesivamente en botellas de tampón de peptona y finalmente se cultivó en un medio nutritivo MRS durante 20 48 a 72 horas a 38 °C en condiciones aerobias. Durante ese periodo, las bacterias forman colonias en el medio nutritivo. Estas colonias se contaron y los resultados se expresaron en forma de unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo.

Ensayo acelerado de estabilidad

- 25 La estabilidad a largo plazo de las bacterias liofilizadas en función del tiempo es una característica crítica para la aplicación comercial. La estabilidad a largo plazo se puede evaluar mediante ensayo acelerado de estabilidad que consiste en colocar células liofilizadas en una lámina delgada de aluminio laminada sellada en una cámara de temperatura constante mantenida a 38 °C durante catorce días. El recuento celular del material liofilizado se mide 30 antes y después de la exposición a temperatura elevada. Se calcula la tasa de recuperación de las células restando las células medidas después del ensayo acelerado de estabilidad de la medición inicial de células y dividiendo los resultados de la resta por el recuento inicial. La tasa de recuperación del ensayo acelerado de estabilidad da una estimación relativa de la estabilidad de las células a largo plazo.

- 35 Ejemplo 1

- Se mezclaron diversos crioprotectores (véase la Tabla 1) en una suspensión que contenía *Lactobacillus acidophilus* con un recuento celular aproximado de 1E11 CFU/g. La mezcla, denominada concentrado estabilizado, se mantuvo a 4-8 °C durante 1,5 h y se agitó continuamente antes de congelarse mediante dispersión de pequeñas gotas del 40 concentrado estabilizado en nitrógeno líquido. Las gotas congeladas resultantes se denominan microgránulos congelados.

Tabla 1: Formulación de crioprotector basado en trehalosa sometido a ensayo en una suspensión de *Lactobacillus acidophilus*.

45

Solución crioprotectora	Concentración de trehalosa (% p/p de concentrado estabilizado)	Componente crioprotector adicional (% p/p de concentrado estabilizado)
Trehalosa sola del experimento 1	8	0
Trehalosa sola del experimento 2	14	0
Trehalosa con fosfato	13	1 como KHPO ₄
Trehalosa con EDTA	14	0,0021 como EDTA
Inositol solo	0	16,7 como Inositol
Trehalosa con inositol del experimento 1	14	3,4 como Inositol
Trehalosa con inositol del experimento 2	13	6,7 como Inositol
Trehalosa con Inosina Mono Fosfato (IMP)	14	3,4 como IMP

Los microgránulos congelados se liofilizaron en un liofilizador Virtis® a 100 mT y se llevó a cabo una medición de recuento celular justo después de la liofilización llevando a cabo un ensayo acelerado de estabilidad.

La Tabla 2 muestra los recuentos celulares iniciales, los recuentos celulares después del ensayo acelerado de estabilidad y la recuperación de células liofilizadas después del ensayo acelerado.

Tabla 2: Recuentos celulares y resultados de estabilidad acelerada para crioprotector basado en trehalosa sometido a ensayo en una suspensión de *L. acidophilus*.

Solución crioprotectora	Recuentos de células viables después de liofilización (CFU/g)	Recuento de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (CFU/g)	Recuperación de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (%)
Trehalosa sola del experimento 1	7,4E+11	2,2E+11	29,0
Trehalosa sola del experimento 2	6,6E+11	2,4E+11	38,0
Trehalosa con fosfato	6,4E+11	1,3E+11	19,9
Trehalosa con EDTA	7,0E+11	1,9E+11	27,1
Inositol solo	3,2E+11	1,3E+11	41,0
Trehalosa con inositol del experimento 1	5,8E+11	3,2E+11	54,8
Trehalosa con inositol del experimento 2	5,0E+11	4,4E+11	89,0
Trehalosa con Inosina Mono Fosfato (IMP)	5,2E+11	1,2E+11	23,3

La Tabla 2 muestra que la mejor recuperación después del ensayo acelerado se consigue cuando la solución de trehalosa es al 13 % y el inositol es al 6,7 %, con una proporción de trehalosa/inositol = 1,9.

Ejemplo 2

También se sometieron a ensayo diversas proporciones de inositol con respecto a trehalosa. Los crioprotectores se mezclaron durante 1 a 3 h a 10-30 °C hasta una suspensión que contenía *Lactobacillus acidophilus* con un recuento celular aproximado de 1E11 CFU/g. La mezcla se congeló y se liofilizó, y se llevó a cabo un recuento celular justo después de la liofilización llevando a cabo un ensayo acelerado de estabilidad, como se ha desvelado en el Ejemplo 1. La Tabla 3 da los resultados de este ensayo.

Tabla 3: Recuentos celulares y resultados de estabilidad acelerada para crioprotector basado en trehalosa sometido a ensayo en una suspensión *L. acidophilus* incluyendo la proporción de trehalosa con respecto a inositol y el porcentaje de recuperación de células después de ensayo acelerado de estabilidad.

Concentración de trehalosa (% p/p de concentrado estabilizado)	Concentración de inositol (% p/p de concentrado estabilizado)	Proporción trehalosa/ inositol	Recuentos de células viables después de liofilización (CFU/g)	Recuperación de células viables de microgránulos congelados con respecto a microgránulos liofilizados (%)	Recuentos de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (CFU/g)	Recuperación de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (%)
6,7	4,4	1,5	4,03E+11	104,4	3,70E+11	91,81
6,7	4,4	1,5	4,21E+11	75,3	3,71E+11	88,12
6,7	4,4	1,5	4,14E+11	79,3	4,01E+11	96,86
6,7	4,4	1,5	4,15E+11	90,7	3,51E+11	84,58
8,2	2,9	2,8	6,26E+11	83,0	3,05E+11	48,72
8,2	2,9	2,8	5,95E+11	75,2	3,50E+11	58,82

Concentración de trehalosa (% p/p de concentrado estabilizado)	Concentración de inositol (% p/p de concentrado estabilizado)	Proporción trehalosa/ inositol	Recuentos de células viables después de liofilización (CFU/g)	Recuperación de células viables de microgránulos congelados con respecto a microgránulos liofilizados (%)	Recuentos de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (CFU/g)	Recuperación de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (%)
8,2	2,9	2,8	6,20E+11	87,0	3,25E+11	52,42
8,2	2,9	2,8	5,70E+11	67,3	3,77E+11	66,14
0,0	9,1	0,0	5,14E+11	81,2	3,72E+11	72,37
12,0	8,0	1,5	4,53E+11	82,5	3,73E+11	82,34
8,3	8,3	1,0	4,49E+11	81,1	3,99E+11	88,86
4,3	8,7	0,5	5,33E+11	89,0	3,80E+11	71,29
12,1	7,3	1,7	4,41E+11	87,5	4,16E+11	94,33
12,3	5,7	2,1	4,30E+11	84,6	3,54E+11	82,33
12,4	5,0	2,5	4,86E+11	81,9	3,48E+11	71,60
12,5	4,2	3,0	4,58E+11	81,7	3,23E+11	70,52
0,0	20,0	0,0	3,70E+11	94,7	2,42E+11	65,41

La recuperación de células después del ensayo acelerado de estabilidad se representó gráficamente en función de la proporción de trehalosa/inositol y se muestra en la Figura 1. La curva muestra claramente un efecto sinérgico entre la trehalosa y el inositol. Inicialmente, la recuperación aumenta cuando la proporción aumenta. Se consigue un valor óptimo alrededor de 1,5, después de lo cual la recuperación disminuye. Los mejores valores de recuperación se obtuvieron cuando la proporción de trehalosa/inositol está comprendida entre 1,1 y 1,9.

Ejemplo 3:

- 10 Se mezclaron crioprotectores preparados a partir de inositol con azúcar no reductor tal como trehalosa o sacarosa con una suspensión de *Bifidobacterium lactis* con un recuento celular aproximado de 1E11 CFU/g. La mezcla, denominada concentrado estabilizado, se mantuvo a 4 °C y se agitó continuamente antes de congelarse mediante dispersión de pequeñas gotas del concentrado estabilizado en nitrógeno líquido. Las cotas congeladas resultantes se denominan microgránulos. Los microgránulos congelados se liofilizaron a continuación en un liofilizador Virtis® al vacío a 100 mT. Los microgránulos liofilizados se evaluaron por medición de los recuentos celulares justo después de la liofilización y llevando a cabo un ensayo acelerado de estabilidad. Además, se calculó la recuperación de células a partir de los microgránulos congelados con respecto a los microgránulos liofilizados. Las Tablas 4 y 5 dan los resultados del ensayo.

- 20 Tabla 4: Comparación de recuperación después de liofilización y recuperación después de ensayo acelerado de estabilidad para un crioprotector que contiene trehalosa e inositol.

Azúcar no reductor = Trehalosa (% p/p)	Concentración de inositol (% p/p)	Proporción trehalosa/ inositol	Recuperación de células viables de microgránulos congelados con respecto a microgránulos liofilizados (%)	Recuperación de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (%)
8,80	6,7	1,3	91,3	84,9
13,33	6,7	2,0	94,4	81,8

Tabla 5: Comparación de recuperación después de liofilización y recuperación después de ensayo acelerado de estabilidad para un crioprotector que contiene sacarosa e inositol.

Azúcar no reductor = Sacarosa (% p/p)	Concentración de inositol (% p/p)	Proporción sacarosa/ inositol	Recuperación de células viables de microgránulos congelados con respecto a microgránulos liofilizados (%)	Recuperación de células viables después de ensayo acelerado de estabilidad (%)
8,80	6,7	1,3	102,0	82,5
13,33	6,7	2,0	91,1	84,9

- 5 La recuperación de biomasa estabilizada con trehalosa o con sacarosa tiene una recuperación de células similar después de liofilización o después del ensayo acelerado. Se puede usar azúcar no reductor en combinación con inositol para secar y conservar *Bifidobacterium lactis* con éxito.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

- 5 (a) al menos un azúcar no reductor, y
(b) inositol o un derivado del mismo, en la que dicho derivado es un inositol en el que se ha modificado o sustituido al menos una función hidroxilo,

en la que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es de 1,1 a 1,7, y

- 10 (c) microorganismos.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que los microorganismos son bacterias.

15 3. La composición de la reivindicación 1, en la que los microorganismos son bacterias ácido lácticas.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en la que dicha proporción p/p de (a)/(b) es de 1,3 a 1,7.

20 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho (a) es una mezcla de azúcares no reductores.

6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dichos azúcar o azúcares no reductores se seleccionan entre el grupo que comprende trehalosa, 2,3,2',3'-tetra-O-bencil-6,6'-di-O-decanoil-4,4'-bis-O-(difenilfosfona) alfa, alfa trehalosa, 6,6'-di-O-decanoil-4,4'-di-O-fosfona alfa, alfa trehalosa, 2,3,2',3'-tetra-O-bencil-4,4'-bis-O-(difenilfosfona) alfa, alfa trehalosa 6,6', éster de ácido graso, sacarosa, sacarosa-6 benzoato, sacarosa-6 acetato, sacarosa-6 glutarato y sacarosa-6 laurato.

7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho (a) es trehalosa y dicho (b) es inositol.

30 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dichas bacterias ácido lácticas se seleccionan entre el grupo que comprende las cepas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y las mezclas de las mismas.

35 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dichas bacterias ácido lácticas se seleccionan entre el grupo que comprende las cepas de las especies y subespecies *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrückii bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentoseus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*,
40 *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pervulus*, *Propionibacterium freudenreichi*, *Propionibacterium jensenii*, *Streptococcus salivarius* y las mezclas de las mismas.

10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 8 y 9, en la que dicha composición comprende microorganismos en una concentración de 1E8 CFU/g de composición a 5E12 CFU/g de composición.

45 11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, y 8-10, en la que dicha composición comprende:

- 50 (a) al menos un 4 % en peso de dicho azúcar no reductor, y
(b) al menos un 3 % en peso de dicho inositol o un derivado del mismo.

12. Uso de una composición que comprende:

- 55 (a) al menos un azúcar no reductor, y
(b) inositol o un derivado del mismo, en la que dicho derivado es un inositol en el que se ha modificado o sustituido al menos una función hidroxilo,

en la que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es de 1,1 a 1,7, para conservar microorganismos.

60 13. Método para conservar microorganismos, que comprende las siguientes etapas:

preparar una composición que comprende:

- 65 (a) al menos un azúcar no reductor, y
(b) inositol o un derivado del mismo, en la que dicho derivado es un inositol en el que se ha modificado o

sustituido al menos una función hidroxilo,

en la que la proporción p/p de (a)/(b) de dichas composiciones es de 1,1 a 1,7,

- 5
- añadir dicha composición a microorganismos, para obtener una composición que comprende microorganismos,
 - someter dicha composición que comprende microorganismos, a una etapa de congelación, secado o liofilización.

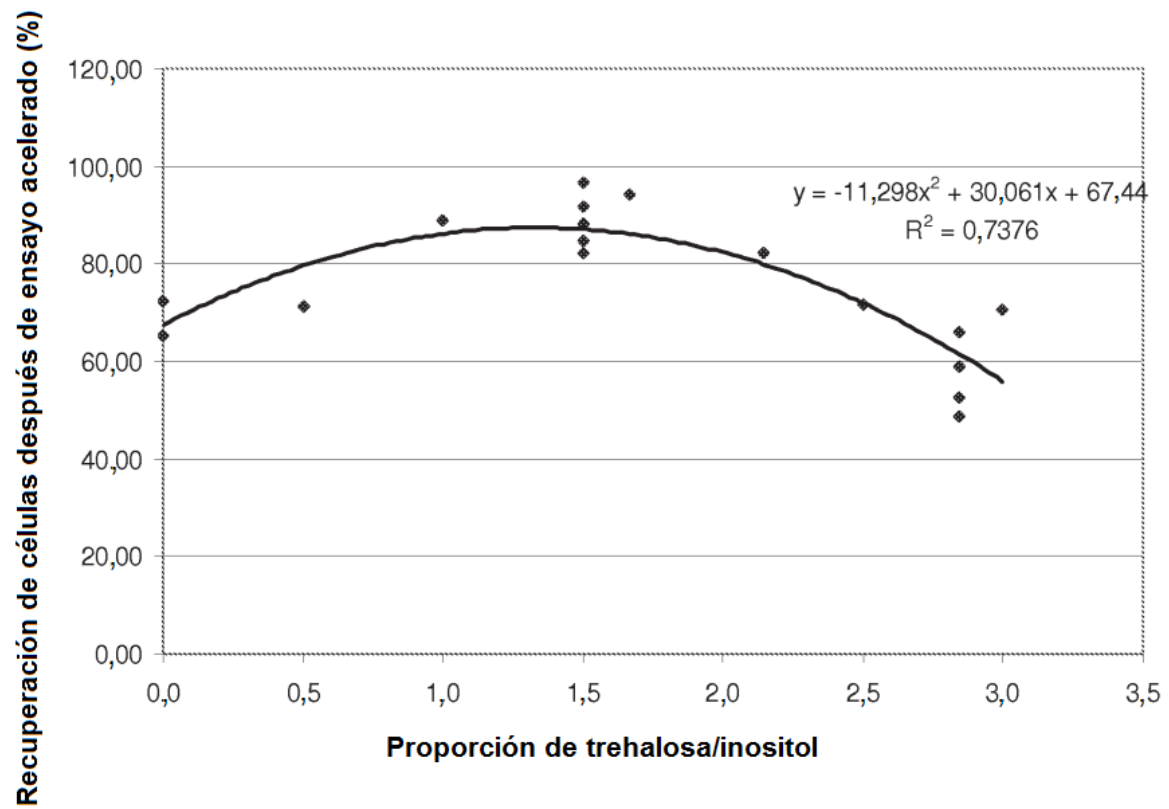


FIGURA 1