(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 700 879**

(51) Int. CI.:

A23G 1/42 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 35/741 (2015.01)
A61K 35/744 (2015.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A23P 10/35 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61K 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2010 PCT/IL2010/000550**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11004375**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2010 E 10796812 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2451300**

(54) Título: **Composiciones probióticas resistentes al calor y alimentos sanos que las comprenden**

(30) Prioridad:

09.07.2009 IL 19978109

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2019

(73) Titular/es:

DEGAMA PROBIOTICS LTD. (100.0%)
C/O Maples Corporate Services Limited, P.O. Box 309, Ugland House
Grand Cayman KY1-1104, US

(72) Inventor/es:

ZOREA, YOHAI y
PENHASI, ADEL

(74) Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

Observaciones:

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

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 PROBIÓTICAS RESISTENTES AL CALOR Y ALIMENTOS SANOS QUE LAS COMPRENDEN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a productos alimenticios sanos, particularmente a productos probióticos de repostería. Se proporciona un método de preparación de un producto que se somete a tratamiento térmico en al menos una fase de su preparación, a la vez que se mantienen vivos una cantidad suficiente de microorganismos probióticos.

Antecedentes de la invención

Los probióticos son suplementos alimenticios microbianos vivos que afectan de manera beneficiosa al huésped reforzando la flora intestinal que se produce de manera natural, compitiendo con microorganismos perjudiciales en el tubo digestivo, ayudando en procesos metabólicos útiles y reforzando la resistencia del organismo huésped contra sustancias tóxicas. Se usan varios organismos en los alimentos probióticos, siendo un ejemplo los géneros microbianos *Lactobacillus* o *Bifidobacterium.* Los organismos probióticos deberían sobrevivir durante toda la duración del producto, con el fin de ser eficaces, y además deberían sobrevivir en todo el recorrido a través del tubo digestivo hasta el colon. Los organismos probióticos se incorporan habitualmente en productos lácteos, tales como yogures. Se advierte la necesidad de suministrar microorganismos beneficiosos en otros tipos de productos alimenticios, por ejemplo en productos horneados. Sin embargo, el principal problema en la preparación de alimentos sanos horneados es la temperatura de tratamiento, que habitualmente es tan alta (superando los 180ºC) que casi esteriliza los productos. El documento WO 94/00019 describe un método de preparación de un producto horneado que contiene microorganismos vivos, que comprende enfriar un producto horneado e inyectarle una suspensión de microorganismos vivos. El documento WO 2009/069122 de los mismos inventores que la presente invención describe un procedimiento para preparar alimentos horneados, que comprende encapsular gránulos probióticos, potenciando de ese modo su estabilidad. Por otro lado, el documento WO 2008/037578 da a conocer compuestos, que son partículas que contienen almidón recubiertas, incluidas o encapsuladas por un biopolímero o una mezcla de biopolímeros en una disposición de múltiples capas, así como su producción y, así como el uso de estas partículas en producto alimenticios. El documento WO 200/035332 da a conocer métodos para preparar composiciones que comprenden la etapa de microencapsular microorganismos vivos para producir una formulación seca y opcionalmente recubrir las microcápsulas, a la vez que se mantiene en un grado significativo la viabilidad de los microorganismos. El documento US2009/092704 da a conocer una composición de alimento para rumiantes, que tiene un núcleo granulado que tiene al menos una sustancia activa y al menos una capa de un material de recubrimiento que rodea el núcleo. ANAL *ET AL*, “Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery”, TRENDS IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, GB, (20070429), vol. 18, n.º 5, doi: 10.1016/J.TIFS.2007.01.004, ISSN 0924-2244, páginas 240 - 251 se refiere a microencapsulación de probióticos para aplicaciones industriales y suministro dirigido. El documento WO 2009/069122 da a conocer un alimento sano horneado así como un procedimiento para elaborarlo, siendo el alimento particularmente pasteles probióticos que comprenden un componente probiótico vivo que puede resistir el calor del horneado, y por tanto afecta de manera beneficiosa al equilibrio microbiano intestinal del consumidor. Y finalmente, el documento US 2005/266069 da a conocer composiciones de microesferas probióticas estables y sus métodos de preparación. Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar una composición nutricionalmente aceptable que comprende microorganismos probióticos, siendo la composición resistente a altas temperaturas.

Otro objeto de la invención es proporcionar un producto de repostería que comprenda microorganismos viables en una cantidad suficiente.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para preparar un producto de repostería probiótico, sin necesidad de inyectar microorganismos viables en el producto de repostería tras el procedimiento de horneado.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar productos de repostería que contenga microorganismos probióticos vivos durante todo el procedimiento de horneado.

Todavía un objeto adicional de la invención es proporcionar productos de repostería que comprendan composición probiótica estabilizada por calor.

También es un objeto de la invención proporcionar productos de repostería probióticos que presenten una vida útil de almacenamiento prolongada.

Otros objetos y ventajas de presente invención surgirán a medida que avance la descripción.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un gránulo probiótico que comprende i) un núcleo que comprende microorganismos probióticos y un sustrato en que se absorben dichos microorganismos; ii) una capa oleosa interior que recubre dicho núcleo; y iii) una primera capa exterior y una segunda capa exterior, capas exteriores que recubren dicho núcleo y dicha capa interior, que comprenden al menos dos polímeros diferentes.

El gránulo probiótico, un método para su producción y un producto alimenticio que comprende dicho gránulo probiótico se definen en las reivindicaciones 1-10 adjuntas. Dicho núcleo puede comprender además uno o más agentes suplementarios para dichos microorganismos. Preferiblemente, los agentes refuerzan el crecimiento de dichos microorganismos, y pueden comprender materiales prebióticos, tales como oligosacáridos. Dicha capa oleosa interior puede comprender un material seleccionado de ácidos grasos, ceras, grasas, aceites y lípidos. Dicha primera capa exterior confiere estabilidad a dichos microorganismos en las condiciones de la parte alta del tubo digestivo, y dicha segunda capa exterior aumenta la estabilidad de dichos microorganismos en dicho núcleo a una temperatura aumentada. Dicho sustrato comprende uno o más componentes seleccionados de sacáridos y agentes adicionales. Dichos agentes se seleccionan de estabilizante, quelante, agente sinérgico, antioxidante y regulador del pH, y dichos sacáridos comprenden preferiblemente oligosacáridos prebioticos.

Dichas dos capas exteriores en los gránulos de la invención comprenden dos polímeros diferentes; los polímeros pueden ser de carácter fibroso o gelatinoso. Se da a conocer que, al menos una de las capas exteriores comprende un polisacárido fibroso, y al menos una de las capas exteriores comprende un polisacárido gelatinoso. Un gránulo probiótico según la invención puede comprender capas adicionales, por ejemplo al menos una capa intermedia colocada entre dicha capa oleosa y dicha segunda capa exterior. El gránulo probiótico de la presente invención comprende un microorganismo probiótico; el organismo es preferiblemente bacteriano. Said microorganismo comprende ventajosamente un género seleccionado de *Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Escherichia, Streptococcus, Diacetilactis* y *Saccharomyces,* o una mezcla de los mismos. Los microorganismos son, en una realización preferida, bacterias probióticas.

La invención proporciona un método para fabricar un gránulo probiótico que comprende un núcleo, que contiene microorganismos probióticos y un sustrato en que se absorben dichos microorganismos, rodeado por una capa oleosa interior y dos capas de polímero exteriores, comprendiendo el método i) mezclar una suspensión de microorganismos probióticos con un sustrato basado en celulosa y con agentes suplementarios para los microorganismos, obteniendo de ese modo una mezcla de núcleo; ii) recubrir las partículas de dicha mezcla de núcleo con una capa oleosa, obteniendo de ese modo partículas recubiertas de aceite; iii) recubrir dichas partículas recubiertas de aceite con una primera capa de polímero, primera capa de polímero que confiere estabilidad a dichos microorganismos en las condiciones de la parte alta del tubo digestivo, obteniendo de ese modo partículas recubiertas con dos capas; y iv) recubrir dichas partículas de dos capas con una segunda capa de polímero, segunda capa de polímero que aumenta la estabilidad de los microorganismos en dicho núcleo en las condiciones de horneado. Dichos microorganismos pueden comprender una o más cepas microbianas, y se mezclan con y se absorben sobre un polímero compatible microbiológicamente, que también es aceptable y puede aprobarse nutricionalmente, siendo un ejemplo un polisacárido, tal como material basado en celulosa. Pueden añadirse a la mezcla materiales que refuerzan la estabilidad o el crecimiento de dichos microorganismos. Se incluyen preferiblemente elementos de refuerzo de probióticos conocidos como prebióticos, por ejemplo maltodextrina, trehalosa, etc. Las etapas de recubrimiento pueden utilizar técnicas conocidas en el campo, incluyendo recubrimiento en lecho fluidizado, pulverización, etc. Cuando se crean las capas recubiertas, pueden emplearse disoluciones o suspensiones, así como polvos, etc. Dichas etapas de recubrimiento ii) a iv) dan como resultado un aumento de masa de desde el 10 hasta el 100% con respecto a la masa del núcleo, por ejemplo de entre el 15 y el 50%. En una realización preferida, un método para fabricar un gránulo probiótico comprende i) mezclar una suspensión acuosa de microorganismos probióticos que comprende al menos un género seleccionado de *Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Escherichia, Streptococcus, Diacetilactis y Saccharomyces,* o una mezcla de los mismos con al menos un polisacárido y al menos un oligosacárido (siendo un ejemplo celulosa microcristalina con maltodextrina y trehalosa), obteniendo de ese modo una mezcla de núcleo; ii) recubrir las partículas de dicha mezcla de núcleo con una capa oleosa, obteniendo de ese modo partículas recubiertas de aceite; iii) recubrir dichas partículas recubiertas de aceite con una primera capa de polímero y con una segunda capa de polímero; iv) en el que dichas dos capas de polímero son diferentes y comprenden al menos dos materiales seleccionados de celulosa, celulosa modificada, polisacárido y/o polímeros sintéticos y una mezcla de los mismos.

Cabe destacar que la invención se refiere a una composición probiótica que comprende gránulos que tienen un núcleo, que contiene microorganismos probióticos y un sustrato en que se absorben dichos microorganismos, rodeado por una capa oleosa interior y dos capas de polímero exteriores. La composición prebiótica según la invención presenta alta resistencia a la temperatura aumentada. Cuando se hace referencia en el presente documento a una alta resistencia a la temperatura aumentada, o cuando se hace referencia a una alta estabilidad térmica, quiere decirse la supervivencia de los microorganismos probióticos dentro de los gránulos en comparación con los microorganismos libres, y particularmente la supervivencia de los microorganismos probióticos dentro de los gránulos mezclados en un producto alimenticio en comparación con los microorganismos libres. En un aspecto de la invención, los microorganismos probióticos en el núcleo de los gránulos de tres capas sobreviven a exposiciones de los gránulos hasta temperaturas superiores a la temperatura ambiental. La estabilidad térmica de la composición

probiótica según la invención es suficientemente alta como para garantizar que una parte de la carga bacteriana inicial mezclada en un producto alimenticio probiótico de la invención permanece viable incluso tras todas las etapas de fabricación necesarias. Tales etapas pueden incluir horneado.

La invención proporciona un producto alimenticio sano o un aditivo alimenticio que comprende una composición probiótica, tal como se describió anteriormente, que comprende los gránulos probióticos estables. Dicho producto puede comprender preferiblemente un producto de repostería, por ejemplo pasteles o pan. Dicho producto también puede comprender atún, chocolate, zumos de frutas y productos lácteos.

La invención proporciona un producto alimenticio sano que comprende pasteles, pan, harina, productos a base de harina, productos horneados, productos congelados para hornear, yogur, productos lácteos, chocolate, néctares, zumos de frutas y atún. El producto alimenticio según la invención, que comprende gránulos probióticos, puede exponerse a una temperatura superior a la ambiental durante el procedimiento de producción.

Breve descripción de los dibujos

Las características y ventajas anteriores y otras de la invención resultarán más fácilmente evidentes a través de los siguientes ejemplos, y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra un esquema de una cápsula de múltiples capas según una realización de la invención, que va a quedar comprendida en alimentos sanos; la encapsulación está diseñada para proporcionar microorganismos probióticos con resistencia al calor máxima durante la etapa de calentamiento del procedimiento de fabricación, cuando se proporciona dicho alimento, y también con alta eficacia biológica en la parte inferior del tubo digestivo tras dejar el estómago intacto; el núcleo blanco comprende microorganismos probióticos y sustrato de absorción; la primera capa oscura adyacente al núcleo es una capa oleosa; una capa clara adyacente a la capa oleosa es una capa resistente a ácido; una capa oscura adyacente a la capa resistente a ácido es una capa intermedia opcional; y la capa clara exterior es una capa resistente al calor.

Descripción detallada de la invención

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que pueden formularse microorganismos probióticos en los núcleos de gránulos que tienen al menos tres capas, proporcionando así composiciones probióticas de organismos probióticos viables incluso tras el horneado, siendo las composiciones estables adicionalmente en almacenamiento y pudiendo administrar microorganismos viables al colon tras la administración oral.

La invención proporciona probióticos granulares que van a usarse como aditivos alimenticios sanos. La presente invención se refiere particularmente a un procedimiento para la preparación de alimentos horneados, tal como pasteles probióticos. Una suspensión de microorganismos probióticos se mezcla y se granula con un material portador adecuado para formar una parte de núcleo de las partículas que van a recubrirse. El microorganismo probiótico puede seleccionarse de *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086; *Bacillus subtilis* var natt; *Bifidobacterium sp* LAFTI B94; *Bifidobacterium bifidum; Bifidobacterium bifidum* rosell-71; *Bifidobacterium breve; Bifidobacterium breve* Yakult; *Bifidobacterium breve* Rosell-70; *Bifidobacterium infantis; Bifidobacterium infantis* 35624; *Bifidobacterium lactis; Bifidobacterium longum; Bifidobacterium longum Rosell-175; Bifidobacterium longum* BB536; *Bifidobacterium animalis; Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12; *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019; *Escherichia coli M-17; Escherichia coli Nissle* 1917; *Lactobacillus acidophilus; Lactobacillus acidophilus* DDS-1; *Lactobacillus acidophilus* LAFTI® L10; *Lactobacillus acidophilus* LA-5; *Lactobacillus acidophilus* NCFM; *Lactobacillus casei; Lactobacillus casei* LAFTI® L26; *Lactobacillus casei* CRL431; *Lactobacillus casei* DN114-001 *(Lactobacillus casei Immunitas(s) / Defensis); Lactobacillus brevis; Lactobacillus bulgaricus; Lactobacillus gasseri; Lactobacillus paracasei; Lactobacillus casei* F19; *Lactobacillus casei Shirota; Lactobacillus paracasei* St11 (o NCC2461); *Lactobacillus plantarum; Lactobacillus plantarum* 299V; *Lactobacillus reuteri* ATTC 55730 *(Lactobacillus reuteri* SD2112); *Lactobacillus rhamnosus; Lactobacillus salivarius; Lactobacillus delbrueckii; Lactobacillus fermentum; Lactococcus lactis; Lactococcus lactis L1A; Lactococcus lactis subsp; Lactococcus lactis* Rosell-1058; *Lactobacillus paracasei* St11 (o NCC24610; *Lactobacillus johnsonii* La1 *(= Lactobacillus* LC1); *Lactobacillus johnsonii* Lal (= *Lactobacillus* LC1, *Lactobacillus johnsonii NCC533); Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11; *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52; *Streptococcus thermophilus; Diacetilactis; Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53013 (descubierto por Gorbach & Goldin (=LGG)); *Lactobacillus rhamnosus* LB21; *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 & *Lactobacillus reuteri* RC-14; *Lactobacillus acidophilus* NCFM & *Bifidobacterium bifidum* BB-12; *Saccharomyces cerevisiae; Saccharomyces cerevisiae (boulardii)* lyo; y una mezcla de los mismos.

El procedimiento de granulación puede emplear un granulador adecuado, o alternativamente un lecho fluidizado. El procedimiento de secado puede comprender liofilización. Los gránulos probióticos según la invención pueden tener un amplio intervalo de dimensiones. Un ejemplo no limitativo de un gránulo probiótico según la invención es una partícula esencialmente esférica que tiene un diámetro medio de aproximadamente desde 0,1 hasta aproximadamente 1000 micrómetros. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que mezclar los microorganismos probióticos con un polímero microbiológicamente aceptable, tal como un derivado de celulosa, en un núcleo de partícula que va a recubrirse adicionalmente con una triple capa de materiales microbiológicamente

aceptables da como resultado una resistencia al calor aumentada del microorganismo, en el que la resistencia aumentada puede resultar tanto de la conductividad térmica disminuida como de la estabilización celular. Los microorganismos probióticos procesados según la invención resisten el calor de horneado para una temperatura de horneado y un tiempo de horneado predeterminados. Se cree que la capa oleosa interior y la primera capa exterior (capa de recubrimiento entérico) protegen adicionalmente los microorganismos probióticos durante su paso a través de la parte alta del tubo digestivo, permitiendo la liberación de los probióticos o bien en el intestino delgado o bien en el colon, o en ambos. La estructura de la composición probiótica granular de la invención garantiza una estabilidad relativamente alta (viabilidad microbiana) en almacenamiento antes de su uso en la preparación de productos alimenticios, así como dentro del producto alimenticios en su almacenamiento. Además, dicha estructura garantiza la liberación deseable de los microorganismos viables en la parte inferior del tubo digestivo de una persona que ingiere los alimentos sanos, por ejemplo productos de repostería sanos. Además, todo el efecto beneficioso puede potenciarse adicionalmente cuando también se incluyen en la composición probiótica oligosacáridos (denominados prebióticos) que refuerzan el crecimiento del microorganismo beneficioso. Opcionalmente, dicha primera capa exterior (la capa de recubrimiento resistente al tubo digestivo, denominada la capa de recubrimiento entérico) puede estar separada de dicha segunda capa exterior (la capa de recubrimiento exterior resistente al calor) por una capa de recubrimiento inerte intermedia con el fin de impedir cualquier posible reacción entre ellas.

Dicha capa interior oleosa puede seleccionarse del grupo que consiste en cera de abeja, cera de carnauba, cera de Japón, cera ósea, cera de parafina, cera de China, lanolina (cera de lana), cera de goma laca, esperma de ballena, cera de arrayán, cera de candelilla, cera de ricino, cera de esparto, aceite de jojoba, cera de uricuri, cera de salvado de arroz, cera de soja, ceras de ceresina, cera Montana, ozoquerita, ceras de turba, cera microcristalina, vaselina, ceras de polietileno, ceras de Fischer-Tropsch, ceras modificadas químicamente, ceras de amida sustituida, α-olefinas polimerizadas, aceite vegetal, aceite vegetal hidrogenado, aceite de ricino hidrogenado, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, dioles grasos esterificados, ácido graso hidroxilado, ácido esteárico, estearato de sodio, estearato de calcio, estearato de magnesio, palmitato, palmitoleato, hidroxipalmitato, ésteres de oleato de cadena larga, alcoholes alifáticos, hidroxiestearato de hidroxil-octacosanilo, fosfolípidos, lecitina, fosfatidil-colina.

Dicha primera capa exterior puede comprender uno o más recubrimientos sensibles a pH, denominados comúnmente en la técnica “recubrimientos entéricos,” según procedimientos convencionales con el fin de retrasar la liberación de los microorganismos probióticos. Los polímeros sensibles al pH adecuados incluyen los que son relativamente insolubles e impermeables al pH del estómago, pero que son más solubles o disgregables o permeables al pH del intestino delgado y el colon. Tales polímeros sensibles al pH incluyen poliacrilamidas, derivados de ftalato tales como ftalato ácido de hidratos de carbono, ftalato ácido de amilosa, acetato-ftalato de celulosa (CAP), otros ftalatos de éster de celulosa, ftalatos de éter de celulosa, ftalato de hidroxipropilcelulosa (HPCP), ftalato de hidroxipropiletilcelulosa (HPECP), ftalato de hidroxilpropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCAS, ftalato de metilcelulosa (MCP), poli(acetato-ftalato de vinilo) (PVAcP), poli(acetato-hidrogenoftalato de vinilo), CAP de sodio, ftalato ácido de almidón, acetato-trimelitato de celulosa (CAT), copolímero de estireno-ácido maleico-ftalato de dibutilo, copolímero de estireno-ácido maleico/poli(acetato-ftalato de vinilo), copolímeros de estireno y ácido maleico, derivados de poli(ácido acrílico) tales como copolímeros de ácido acrílico y éster acrílico, poli(ácido metacrílico) y ésteres de los mismos, copolímeros de poli(ácido acrílico) y ácido metacrílico, goma laca y copolímeros de acetato de vinilo y ácido crotónico. Los polímeros sensibles al pH preferidos incluyen goma laca, derivados de ftalato, CAT, HPMCAS, derivados de poli(ácido acrílico), particularmente copolímeros que comprenden ácido acrílico y al menos un éster de ácido acrílico, poli(metacrilato de metilo) combinado con copolímeros de ácido acrílico y éster acrílico, y acetato de vinilo, copolímeros de ácido crotónico, ácido algínico y alginatos tales como alginato de amonio, alginato de sodio, potasio, magnesio o calcio. Un grupo de polímeros sensibles al pH particularmente preferido incluye CAP, PVAcP, HPMCP, HPMCAS, copolímeros acrílicos aniónicos de ácido metacrílico y metacrilato de metilo, y polímeros osmóticos que comprenden ácido acrílico y al menos un éster de ácido acrílico. Puede aplicarse acetato-ftalato de celulosa como un recubrimiento entérico a las composiciones probióticas encapsuladas de la invención para proporcionar liberación retardada de los microorganismos probióticos hasta que la forma farmacéutica haya salido del estómago. La disolución de recubrimiento de CAP también puede contener uno o más plastificantes, tales como ftalato de dietilo, polietilenglicol-400, triacetina, citrato de triacetina, propilenglicol y otros, tal como se conoce en la técnica. Plastificantes preferidos son ftalato de dietilo y triacetina. La formulación de recubrimiento de CAP también puede contener uno o más emulsionantes, tales como polisorbato-80.

Los copolímeros acrílicos aniónicos de ácido metacrílico y metacrilato de metilo también son materiales de recubrimiento entérico particularmente útiles para retardar la liberación de los microorganismos probióticos hasta que hayan llegado a una posición en el tubo digestivo que esté lejos del estómago. Los copolímeros de este tipo están disponibles de Rohm America, Inc., con los nombres comerciales EUDRAGIT-L y EUDRAGIT-S. EUDRAGIT-L y EUDRAGIT-S son copolímeros aniónicos de ácido metacrílico y metacrilato de metilo. La razón de grupos carboxilo libres con respecto a los ésteres es de aproximadamente 1:1 en EUDRAGIT-L y de aproximadamente 1:2 en EUDRAGIT-S. También pueden usarse mezclas de EUDRAGIT-L y EUDRAGIT-S. Para el recubrimiento, estos polímeros de recubrimiento acrílicos pueden disolverse en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos o suspenderse en medios acuosos. Disolventes útiles para este fin son acetona, alcohol isopropílico y cloruro de metileno. Generalmente es aconsejable incluir el 5-20% en peso de plastificante en las formulaciones de recubrimiento de copolímeros acrílicos. Los plastificantes útiles incluyen polietilenglicoles, propilenglicoles, ftalato de

dietilo, ftalato de dibutilo, aceite de ricino y triacetina. Se prefiere EUDRAGIT-L porque se disuelve relativamente rápido al pH intestinal. Además de los polímeros sensibles al pH enumerados anteriormente, los recubrimientos de liberación retardada pueden consistir en una mezcla o combinación de dos o más polímeros sensibles al pH o pueden consistir en una mezcla de uno o más polímeros sensibles al pH y uno o más polímeros no sensibles al pH. La adición de un polímero no sensible al pH al polímero sensible al pH es útil para modular la duración del retardo o la velocidad de liberación de los microorganismos probióticos del gránulo, la perla o los microgránulos. Por ejemplo, el retardo puede prolongarse combinando un polímero insoluble en agua con los polímeros sensibles al pH, mientras que el retardo puede acortarse combinando un polímero soluble en agua con los polímeros sensibles al pH. Los polímeros insolubles en agua no sensibles al pH preferidos incluyen ésteres de celulosa, éteres de celulosa, poliacrilatos, poliamidas, poliésteres y polímeros de vinilo. Los polímeros solubles en agua no sensibles al pH incluyen compuestos celulósicos sustituidos con hidroxialquilo tales como copolímeros de HPC, HEC y HPMC, PVA, PEG, PEO, PEG/PPG, y poliamidas, polisacáridos y poliacrilatos solubles en agua.

Pueden incluirse varios aditivos en tales recubrimientos, incluyendo emulsionantes, plastificantes, tensioactivos, cargas y tampones. Finalmente, el recubrimiento polimérico puede describirse como “cuasi-entérico” en el sentido de que permanece sustancialmente intacto durante un periodo de tiempo significativo (por ejemplo, mayor de una hora) una vez que la forma farmacéutica ha salido del estómago, llegando a ser después suficientemente permeable a los microorganismos probióticos como para permitir la liberación gradual de microorganismos probióticos mediante difusión a través del recubrimiento.

Según la invención, la primera capa exterior comprende una capa de recubrimiento entérico seleccionada del grupo que consiste en ácido algínico, alginato de amonio, alginato de sodio, alginato de potasio, alginato de magnesio y alginato de calcio.

Opcionalmente, una formulación según la presente invención presenta una capa intermedia entre la capa entérica y la capa exterior resistente al calor. La capa de recubrimiento intermedia de la composición según la presente invención recubre sustancialmente en su totalidad el recubrimiento entérico de cada unidad individual. La capa intermedia se proporciona con el fin de impedir el contacto directo entre la capa entérica y la capa exterior resistente al calor, impidiendo así cualquier interacción entre ellas. La capa de recubrimiento intermedia según cualquiera de las realizaciones de la presente invención comprende opcional y preferiblemente uno de los polímeros solubles en agua que incluye, pero no se limita a, polivinilos tales como povidona (PVP: polivinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), copolímero de PVP y poli(acetato de vinilo), polivinilos reticulados, HPC (hidroxipropilcelulosa) (más preferiblemente de peso molecular bajo), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) (más preferiblemente de peso molecular bajo), CMC (carboxilmetilcelulosa) (más preferiblemente de peso molecular bajo), etilcelulosa, MEC (metiletilcelulosa), CMEC (carboxilmetiletilcelulosa), HEC (hidroxietilcelulosa) HEMC (hidroximetiletilcelulosa), poli(óxido de etileno), goma arábiga, dextrina, silicato de aluminio y magnesio, almidón, poli(ácido acrílico), poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), polimetacrilatos y sus copolímeros, goma, goma soluble en agua, polisacáridos, polisacáridos reticulados, péptidos o péptidos reticulados, proteínas o proteínas reticuladas, gelatina o gelatina reticulada, gelatina hidrolizada o gelatina hidrolizada reticulada, colágeno o colágeno reticulado, celulosa modificada, poli(ácido acrílico) o poli(ácido acrílico) reticulado y/o mezclas de los mismos.

Dicha segunda capa exterior, el recubrimiento exterior resistente al calor, puede comprender polímeros lineales, ramificados o reticulados. Pueden ser homopolímeros o copolímeros o copolímeros de injerto o copolímeros de bloque, individuales o una combinación. Aunque pueden ser polímeros sintéticos, preferiblemente, tales polímeros pueden ser polímeros que se producen de manera natural tales como polisacáridos, polisacáridos reticulados, gomas, polisacáridos modificados, almidón modificado y celulosa modificada. El polisacárido puede seleccionarse del grupo que consiste en quitina, quitosano, dextrano, pululano, goma agar, goma arábiga, goma karaya, goma garrofín, goma tragacanto, carragenanos, goma ghatti, goma guar, goma xantana y escleroglucano, almidones, dextrina y maltodextrina, coloides hifrófilos tales como pectina, pectina altamente metoxilada y pectina escasamente metoxilada. Pueden emplearse en la composición fosfátidos tales como lecitina. El polisacárido reticulado puede seleccionarse del grupo que consiste en sales metálicas insolubles o derivados reticulados de alginato, pectina, goma xantana, goma guar, goma tragacanto y goma garrofín, carragenano, sales metálicas de los mismos, y derivados reticulados covalentemente de los mismos. La celulosa modificada puede seleccionarse del grupo que consiste en derivados reticulados de hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, y sales metálicas de carboximetilcelulosa. Más preferiblemente, tales polímeros pueden ser polímeros catiónicos. Las muestras de polímeros catiónicos incluyen poliaminas catiónicas, poliacrilamida catiónica, polietilenimina catiónica, poli(alcohol vinílico) catiónico que es una sal cuaternaria de cloruro de metilo de copolímero de injerto de poli(acrilato de dimetilaminoetilo)/poli(alcohol vinílico) o una sal cuaternaria de sulfato de metilo de copolímero de injerto de poli(acrilato de dimetilaminoetilo)/poli(alcohol vinílico), una serie de combinaciones secas de PVA con cloruro de N-(3-cloro-2-hidroxipropil)-N,N,N-trimetilamonio, disponible de Dow Chemical Company con el nombre QUAT.RTM.-188, que contiene diversas cantidades de agua y de NaOH, polivinilpirrolidona catiónica, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímero de poli(acetato de vinilo) y polivinilpirrolidona, copolímero de poli(alcohol vinílico) y polivinilpirrolidona, polietilenimina, polialilamina y sus sales, polivinilamina y sus sales, condensado de diciandiamida-polialquilenpoliamina, condensado de polialquilenpoliamina-diciandiamida-amonio, condensado de diciandiamida-formalina, un polímero de adición de epiclorhidrina-dialquilamina, un polímero de cloruro de dialildimetilamonio (“DADMAC”), un copolímero de metacrilato de dimetilaminoetilo y ésteres

metacrílicos neutros disponibles de Rohm Pharma (Degusa) con el nombre Eudragit E, un copolímero de cloruro de dialildimetilamonio-SO2, polivinilimidazol, polivinilpirrolidona, un copolímero de vinilimidazol, poliamidina, quitosano, almidón cationizado, polisacáridos catiónicos tales como goma guar catiónica e hidroxipropil-goma guar catiónica, polímeros de cloruro de vinilbenciltrimetilamonio, cloruro de (2-metacriloiloxietil)trimetil-amonio, polímeros de metacrilato de dimetilaminoetilo, un poli(alcohol vinílico) con una sal de amonio cuaternario colgante, polivinilformamida catiónica polivinilacetamida catiónica, polivinilmetilformamida catiónica, polivinilmetilacetamida catiónica, poli(dimetilaminopropilmetacrilamida) (DMAPMAM), poli(acrilato de dimetiloaminoetilo), poli(cloruro de acriloiletiltrimetilamonio), poli(cloruro de acrilamidopropiltrimetilamonio) (poliAPTAC), poli (cloruro de metacrilamidopropiltrimetilamonio) (poliMAPTAC), y sus sales, poli(vinilpiridina) y sus sales, poli(dimetilamina-co-epiclorhidrina), poli(dimetilamina-co-epiclorhidrina-co-etilendiamina), poli(amidoamina-epiclorhidrina), almidón catiónico, copolímeros que contienen N-vinilformamida, alilamina, cloruro de dialildimetilamonio, N-vinilacetamida, N-vinilpirrolidona, N-metil-N-vinilformamida, N-metil-N-vinilacetamida, dimetilaminopropilmetacrilamida, acrilato de dimetilaminoetilo, acrilato de dietilaminoetilo, cloruro de acriloil-etiltrimetilamonio o cloruro de metacrilo-amidopropiltrimetilamonio en forma de unidades polimerizadas y, si se requiere, en forma escindida, y sales de los mismos y combinaciones de los mismos. El quitosano puede tener un grado de desacetilación que oscila entre el 80% y más del 95%. El quitosano también puede tener opcionalmente una viscosidad que oscila entre 50 mpa y 800 mpa. El quitosano según la invención es trimetilquitosano o quitosano cuaternizado. El polímero también puede ser opcionalmente poliglucosamina, uno de los componentes del quitosano. Por ejemplo, el polímero puede ser opcionalmente el polímero β-1,4 de D-glucosamina o el polímero β-1,4 de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Según la invención, la segunda capa exterior es una capa de recubrimiento exterior resistente al calor que comprende al menos un polímero seleccionado del grupo que consiste en quitosano y derivados reticulados de hidroxipropilcelulosa. Según una realización preferida de la invención, los microorganismos probióticos en dicho núcleo de gránulos se mezclan con un sustrato. Dicho sustrato puede comprender monosacáridos tales como triosas que incluyen cetotriosa (dihidroxiacetona) y aldotriosa (gliceraldehído), tetrosas tales como cetotetrosa (eritrulosa), aldotetrosas (eritrosa, treosa) y cetopentosa (ribulosa, xilulosa), pentosas tales como aldopentosa (ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa), desoxiazúcar (desoxirribosa) y cetohexosa (psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa), hexosas tales como aldohexosa (alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa), desoxiazúcar (fucosa, fuculosa, ramnosa) y heptosa tal como (sedoheptulosa), y octosa y nonosa (ácido neuramínico). El sustrato puede comprender múltiples sacáridos tales como 1) disacáridos, tales como sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, turanosa y celobiosa, 2) trisacáridos tales como rafinosa, melecitosa y maltotriosa, 3) tetrasacáridos tales como acarbosa y estaquiosa, 4) otros oligosacáridos tales como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y manano-oligosacáridos (MOS), 5) polisacáridos tales como polisacáridos basados en glucosa/glucano incluyendo glucógeno-almidón (amilosa, amilopectina), celulosa, dextrina, dextrano, beta-glucano (zimosano, lentinano, sizofirano), y maltodextrina, polisacáridos basados en fructosa/fructano incluyendo inulina, levano beta 2-6, polisacáridos basados en manosa (manano), polisacáridos basados en galactosa (galactano) y polisacáridos basados en N-acetilglucosamina incluyendo quitina. Pueden comprender otros polisacáridos, incluyendo gomas tales como goma arábiga.

Según una realización preferida de la invención, los microorganismos probióticos en dicho núcleo interior se mezclan con un sustrato que puede comprender además componentes adicionales. Los componentes pueden seleccionarse de agentes quelantes. Preferiblemente, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en antioxidantes, edetato de dipotasio, edetato de disodio, edetato de calcio-disodio, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, maltol, edetato de sodio, edetato de trisodio.

Según algunas realizaciones de la presente invención, el núcleo comprende además tanto un quelante como un agente sinérgico (secuestrante). Sin desear limitarse a una sola hipótesis o teoría, los agentes quelantes y secuestrantes pueden diferenciarse opcionalmente tal como sigue. Se pretende que un agente quelante, tal como ácido cítrico ayude en la quelación de cantidades traza de metales, ayudando de ese modo a impedir la pérdida del/de los componente(s) activo(s), tales como simvastatina, por oxidación. Un secuestrante tal como ácido ascórbico, tiene opcional y preferiblemente varios grupos hidroxilo y/o ácido carboxílico, que pueden proporcionar un suministro de hidrógeno para la regeneración del radical libre antioxidante inactivado. Un secuestrante actúa por tanto preferiblemente como un suministrador de hidrógeno para el rejuvenecimiento del antioxidante primario. Según las realizaciones preferidas de la presente invención, el núcleo comprende además un antioxidante. Preferiblemente, el antioxidante se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato de cisteína, 4,4(2,3-dimetiltetrametilen-dipirocatecol), extracto rico en tocoferol (vitamina E natural), α-tocoferol (vitamina E sintética), β-tocoferol, γ-tocoferol, δ-tocoferol, butilhidroxinona, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, galato de octilo, galato de dodecilo, butilhidroquinona terciaria (TBHQ), ácido fumárico, ácido málico, ácido ascórbico (vitamina C), ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, ascorbato de potasio, palmitato de ascorbilo y estearato de ascorbilo. En el núcleo puede comprenderse ácido cítrico, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de calcio, lactato de magnesio, anoxómero, ácido eritórbico, eritorbato de sodio, ácido de eritorbina, eritorbina de sodio, etoxiquina, glicina, goma guayaca, citratos de sodio (citrato de monosodio, citrato de disodio, citrato de trisodio), citratos de potasio (citrato de monopotasio, citrato de tripotasio), lecitina, polifosfato, ácido tartárico, tartratos de sodio (tartrato de monosodio, tartrato de disodio), tartratos de potasio (tartrato de monopotasio, tartrato de dipotasio), tartrato de sodio y potasio, ácido fosfórico, fosfatos de sodio (fosfato de monosodio, fosfato de disodio, fosfato de trisodio), fosfatos de potasio (fosfatos de monopotasio, fosfato de dipotasio, fosfato de tripotasio), etilendiaminatetraacetato de calcio y disodio (EDTA de calcio y disodio), ácido láctico, trihidroxibutirofenona y ácido tiodipropiónico. Según una

realización preferida, el antioxidante es BHA.

Según las realizaciones preferidas de la presente invención, el núcleo comprende además un estabilizante. Preferiblemente, el estabilizante puede ser una sustancia básica que puede elevar el pH de una disolución o dispersión acuosa de la formulación hasta al menos aproximadamente 6,8. Los ejemplos de tales sustancias básicas incluyen, pero no se limitan a, antiácidos tales como aluminometasilicato de magnesio, aluminosilicato de magnesio, aluminato de magnesio, hidróxido de aluminio seco, hidrotalcita sintética, silicato de aluminio sintético, carbonato de magnesio, carbonato de calcio precipitado, óxido de magnesio, hidróxido de aluminio e hidrogenocarbonato de sodio, y mezclas de los mismos; y agentes reguladores del pH tales como L-arginina, fosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, fosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio, citrato de disodio, succinato de sodio, cloruro de amonio y benzoato de sodio y mezclas de los mismos. La sustancia básica puede seleccionarse del grupo que consiste en un compuesto soluble en agua inorgánico o insoluble en agua inorgánico. Los ejemplos de sustancia básica soluble en agua inorgánica incluyen, pero no se limitan a, sal de carbonato tal como carbonato de sodio o potasio, bicarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio, sales de fosfato seleccionadas de, por ejemplo, fosfato dibásico de sodio, potasio o calcio anhidro, fosfato de trisodio, hidróxidos de metales alcalinos, seleccionados de hidróxido de sodio, potasio o litio, y mezclas de los mismos. El bicarbonato de sodio sirve ventajosamente para neutralizar grupos ácido en la composición en presencia de humedad que puede adsorberse sobre partículas de la composición durante el almacenamiento. El carbonato de calcio ejerce una acción tamponante en la composición almacenada, sin efecto aparente sobre la liberación del material tras la ingestión. Se ha descubierto además que las sales de carbonato estabilizan suficientemente la composición. Los ejemplos de sustancia básica insoluble en agua inorgánica incluyen, pero no se limitan a, compuestos alcalinos adecuados que pueden conferir la basicidad necesaria, incluyen determinados compuestos inorgánicos farmacéuticamente aceptables empleados habitualmente en composiciones antiácidas por ejemplo, óxido de magnesio, hidróxido de magnesio o carbonato de magnesio, hidrogenocarbonato de magnesio, hidróxido o carbonato de aluminio o calcio, compuestos constituidos por material compuesto de aluminio-magnesio, tales como hidróxido de aluminio y magnesio, compuestos de silicato tales como silicato de aluminio y magnesio (Veegum F), aluminometasilicato de magnesio (Nesulin FH2), aluminosilicato de magnesio (Nisulin A); así como sales farmacéuticamente aceptables de ácido fosfórico tales como fosfato de calcio tribásico; y mezclas de los mismos.

La invención permite fabricar diversos productos alimenticios sanos sin separar las etapas de calentamiento de mezclado. Por ejemplo, se permite la preparación de masa de pan que contiene los gránulos probióticos, evitando cualquier etapa de inyección engorrosa de los métodos de la técnica anterior. La razón de masa entre la composición probiótica y el resto de la masa puede ser, por ejemplo, de 1:100.

Los microorganismos probióticos encapsulados según la presente invención pueden incorporarse en harina, productos a base de harina, productos horneados, yogur, atún, productos congelados para hornear, chocolate, bebidas calientes, néctares y zumos de frutas, y otros productos que durante el procedimiento de manipulación y/o producción pueden exponerse a una temperatura superior a la ambiental (temperatura ambiente).

La invención se describirá y se ilustrará adicionalmente en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1 (no según la invención)

Materiales

Materiales:	Función:
Lactobacillus acidophilus	Microorganismos probióticos
Bifidobacterium	Microorganismos probióticos
Celulosa microcristalina (MCC)	Sustrato de núcleo
Maltodextrina	Agente suplementario para los microorganismos
Trehalosa	Agente suplementario para los microorganismos
Aceite vegetal hidrogenado	Agente de primera capa de recubrimiento
Etilcelulosa E100	Polímero de segunda capa de recubrimiento
Alginato de sodio	Polímero de segunda capa de recubrimiento y polímero resistente al calor
Cloruro de calcio	Componente resistente al calor (agente de endurecimiento)

Método

1. Absorción de microorganismos sobre sustrato de núcleo microcristalino

Se absorbieron *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* sobre sustrato de MCC basándose en una razón de 38:62 respectivamente. Para este fin, se preparó una suspensión acuosa del 30% de los microorganismos y

maltodextrina y trehalosa. La concentración de microorganismos fue de aproximadamente el 15% (p/p) en esa suspensión. El procedimiento de absorción se llevó a cabo a una temperatura de salida <35ºC.

2. La primera capa de recubrimiento usando un aceite vegetal hidrogenado

Se llevó a cabo el recubrimiento usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado basándose en un método de fusión en caliente. Para este fin, se pulverizó aceite vegetal hidrogenado sobre el sustrato de MCC con bacterias absorbidas a 40ºC para obtener un aumento de peso del 40%. Se ajustó el flujo de aire de entrada para que fuera bajo.

3. La segunda capa de recubrimiento - un recubrimiento entérico

Se llevó a cabo el recubrimiento usando una disolución de etilcelulosa E100 y alginato de sodio con una razón de 85:15 respectivamente en etanol con una concentración de sólido total del 6% (p/p). Se dirigió el punto final del procedimiento de recubrimiento para obtener un aumento de peso del 20% por el recubrimiento. El procedimiento de recubrimiento se realizó usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado a 40ºC.

4. La tercera capa de recubrimiento - recubrimiento resistente al calor

Se usó alginato de calcio como polímero resistente al calor para la tercera capa de recubrimiento. En primer lugar, se preparó por separado una disolución acuosa de alginato de sodio (3% p/p) y cloruro de calcio (5% p/p). Entonces se pulverizaron alternativamente tanto la disolución de alginato de sodio como la de cloruro de calcio sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 20% (p/p).

Ejemplo 2

Materiales

Componentes	Función
Lactobacillus acidophilus	Microorganismos probióticos
Bifidobacterium	Microorganismos probióticos
Celulosa microcristalina (MCC)	Sustrato de núcleo
Maltodextrina	Agente suplementario para los microorganismos
Trehalosa	Agente suplementario para los microorganismos
Aceite vegetal hidrogenado	Agente de primera capa de recubrimiento
Alginato de sodio de alta viscosidad	Polímero de segunda capa de recubrimiento
Quitosano	Polímero resistente al calor
Ácido clorhídrico (HCl)	Agente de ajuste del pH

Método

1. Absorción de microorganismos sobre sustrato de núcleo microcristalino

Se absorbieron *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* sobre sustrato de MCC basándose en una razón de 38:62 respectivamente. Para este fin, se preparó una suspensión acuosa del 30% de los microorganismos y maltodextrina y trehalosa. La concentración de microorganismos fue de aproximadamente el 15% (p/p) en esa suspensión. El procedimiento de absorción se llevó a cabo a una temperatura de salida <35ºC con el fin de evitar la exposición de los microorganismos a altas temperaturas y por tanto, el daño por alta temperatura.

2. La primera capa de recubrimiento usando un aceite vegetal hidrogenado

Se llevó a cabo el recubrimiento usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado basándose en un método de fusión en caliente. Para este fin, se pulverizó aceite vegetal hidrogenado sobre el sustrato de MCC con microorganismos absorbidos a 40ºC para obtener un aumento de peso del 40%. Se ajustó el flujo de aire de entrada para que fuera bajo.

3. La segunda capa de recubrimiento - un recubrimiento entérico

Se usó alginato de sodio como polímero entérico. Se preparó una disolución acuosa de alginato de sodio (2% p/p). Se pulverizó la disolución de alginato de sodio sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 15%.

4. La tercera capa de recubrimiento- recubrimiento resistente al calor

Se usó quitosano como polímero resistente al calor para la tercera capa de recubrimiento. En primer lugar, se

preparó una disolución acuosa de quitosano (4% p/p) en pH 5 usando HCl. Se pulverizó la disolución resultante sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 20% (p/p).

Ejemplo 3

Materiales

Componentes	Función
Lactobacillus acidophilus	Microorganismos probióticos
Bifidobacterium	Microorganismos probióticos
Celulosa microcristalina (MCC)	Sustrato de núcleo
Maltodextrina	Agente suplementario para los microorganismos
Trehalosa	Agente suplementario para los microorganismos
Aceite vegetal hidrogenado	Agente de primera capa de recubrimiento
Alginato de sodio de alta viscosidad	Polímero de segunda capa de recubrimiento
Quitosano	Polímero resistente al calor
Ácido clorhídrico (HCl)	Agente de ajuste del pH

Método 1.

1. Absorción de microorganismos sobre sustrato de núcleo microcristalino

Se absorbieron *Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium* sobre sustrato de MCC basándose en una razón de 38:62 respectivamente. Para este fin, una suspensión acuosa del 30% de las bacterias y maltodextrina y trehalosa. La concentración de bacterias fue de aproximadamente el 15% (p/p) en esa suspensión. El procedimiento de absorción se llevó a cabo a una temperatura de salida <35ºC con el fin de evitar la exposición de las bacterias a altas temperaturas y por tanto, el daño por alta temperatura.

2. La primera capa de recubrimiento usando un aceite vegetal hidrogenado

Se llevó a cabo el recubrimiento usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado basándose en un método de fusión en caliente. Para este fin, se pulverizó aceite vegetal hidrogenado sobre el sustrato de MCC con microorganismos absorbidos a 40ºC para obtener un aumento de peso del 40%. Se ajustó el flujo de aire de entrada para que fuera bajo.

3. La segunda capa de recubrimiento - un recubrimiento entérico

Se usó alginato de sodio como polímero entérico. Se preparó una disolución acuosa de alginato de sodio (2% p/p). Se pulverizó la disolución de alginato de sodio sobre las bacterias recubiertas resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 15%.

4. La tercera capa de recubrimiento- recubrimiento resistente al calor

Se usó quitosano como polímero resistente al calor para la tercera capa de recubrimiento. En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de quitosano (4% p/p) en pH 5 usando HCl. Se pulverizó la disolución resultante sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 20% (p/p).

Ejemplo 4

Materiales

Componentes	Función
Lactobacillus acidophilus	Microorganismos probióticos
Bifidobacterium	Microorganismos probióticos
Celulosa microcristalina (MCC)	Sustrato de núcleo
Maltodextrina	Agente suplementario para los microorganismos
Trehalosa	Agente suplementario para los microorganismos
Aceite vegetal saturado	Agente de primera capa de recubrimiento
Alginato de sodio de alta viscosidad	Polímero de segunda capa de recubrimiento
Quitosano	Polímero resistente al calor
Dióxido de silicio	Deslizante
Ácido clorhídrico (HCl)	Agente de ajuste del pH

Método

1. Absorción de microorganismos sobre sustrato de núcleo microcristalino

Se absorbieron *Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium* sobre sustrato de MCC basándose en una razón de 38:62 respectivamente. Para este fin, se preparó una suspensión acuosa del 30% de los microorganismos y maltodextrina y trehalosa. La concentración de microorganismos fue de aproximadamente el 15% (p/p) en esa suspensión. El procedimiento de absorción se llevó a cabo a una temperatura de salida <35ºC con el fin de evitar la exposición de los microorganismos a altas temperaturas y por tanto, el daño por alta temperatura.

2. La primera capa de recubrimiento usando un aceite vegetal saturado

Se llevó a cabo el recubrimiento usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado basándose en un método de fusión en caliente. Para este fin, se pulverizó aceite vegetal saturado sobre el sustrato de MCC con microorganismos absorbidos a 40ºC para obtener un aumento de peso del 40%. Se ajustó el flujo de aire de entrada para que fuera bajo.

3. La segunda capa de recubrimiento - un recubrimiento entérico

Se usó alginato de sodio como polímero entérico. Se preparó una disolución acuosa de alginato de sodio (2% p/p). Se pulverizó la disolución de alginato de sodio sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 15%.

4. La tercera capa de recubrimiento- recubrimiento resistente al calor

Se usó quitosano como polímero resistente al calor para la tercera capa de recubrimiento. En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de quitosano (4% p/p) en pH 5 usando HCl. Entonces, tras completarse la disolución de quitosano, se añadió dióxido de silicio (1% p/p). Se pulverizó la disolución resultante sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 25% (p/p).

Ejemplo 5

Materiales:

Componentes	Función
Lactobacillus acidophilus	Microorganismos probióticos
Bifidobacterium	Microorganismos probióticos
Celulosa microcristalina (MCC)	Sustrato de núcleo
Maltodextrina	Agente suplementario para los microorganismos
Trehalosa	Agente suplementario para los microorganismos
Aceite vegetal hidrogenado	Agente de primera capa de recubrimiento
Alginato de sodio de alta viscosidad	Polímero de segunda capa de recubrimiento
Quitosano	Polímero resistente al calor
Ácido clorhídrico (HCl)	Agente de ajuste del pH

Método: 1.

1. Absorción de microorganismos sobre sustrato de núcleo microcristalino

Se absorbieron *Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium* sobre sustrato de MCC basándose en una razón de 38:62 respectivamente. Para este fin, se preparó una suspensión acuosa del 30% de los microorganismos y maltodextrina y trehalosa. La concentración de microorganismos fue de aproximadamente el 15% (p/p) en esa suspensión. El procedimiento de absorción se llevó a cabo a una temperatura de salida <35ºC con el fin de evitar la exposición de los microorganismos a altas temperaturas y por tanto, el daño por alta temperatura.

2. La primera capa de recubrimiento usando un aceite vegetal hidrogenado

Se llevó a cabo el recubrimiento usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado basándose en un método de fusión en caliente. Para este fin, se pulverizó aceite vegetal hidrogenado sobre el sustrato de MCC con microorganismos absorbidos a 40ºC para obtener un aumento de peso del 40%. Se ajustó el flujo de aire de entrada para que fuera bajo.

3. La segunda capa de recubrimiento - un recubrimiento entérico

Se usó alginato de sodio como polímero entérico. Se preparó una disolución acuosa de alginato de sodio (2% p/p). Se pulverizó la disolución de alginato de sodio sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 15%.

4. La tercera capa de recubrimiento- recubrimiento resistente al calor

Se usó quitosano como polímero resistente al calor para la tercera capa de recubrimiento. En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de quitosano (4% p/p) en pH 5 usando HCl. Se pulverizó la disolución resultante sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 30% (p/p).

Ejemplo 6

Materiales

Componentes	Función
Lactobacillus acidophilus	Microorganismos probióticos
Bifidobacterium	Microorganismos probióticos
Celulosa microcristalina (MCC)	Sustrato de núcleo
Maltodextrina	Agente suplementario para los microorganismos
Trehalosa	Agente suplementario para los microorganismos
Aceite vegetal hidrogenado	Agente de primera capa de recubrimiento
Alginato de sodio de alta viscosidad	Polímero de segunda capa de recubrimiento
Quitosano	Polímero resistente al calor
Ácido clorhídrico (HCl)	Agente de ajuste del pH

Método 1.

1. Absorción de microorganismos sobre sustrato de núcleo microcristalino

Se absorbieron *Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium* sobre sustrato de MCC basándose en una razón de 38:62 respectivamente. Para este fin, se preparó una suspensión acuosa del 30% de los microorganismos y maltodextrina y trehalosa. La concentración de microorganismos fue de aproximadamente el 15% (p/p) en esa suspensión. El procedimiento de absorción se llevó a cabo a una temperatura de salida <35ºC con el fin de evitar la exposición de los microorganismos a altas temperaturas y por tanto, el daño por alta temperatura.

2. La primera capa de recubrimiento usando un aceite vegetal hidrogenado

Se llevó a cabo el recubrimiento usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado basándose en un método de fusión en caliente. Para este fin, se pulverizó aceite vegetal hidrogenado sobre el sustrato de MCC con microorganismos absorbidos a 40ºC para obtener un aumento de peso del 40%. Se ajustó el flujo de aire de entrada para que fuera bajo.

3. La segunda capa de recubrimiento - un recubrimiento entérico

Se usó alginato de sodio como polímero entérico. Se preparó una disolución acuosa de alginato de sodio (2% p/p). Se pulverizó la disolución de alginato de sodio sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 25%.

4. La tercera capa de recubrimiento- recubrimiento resistente al calor

Se usó quitosano como polímero resistente al calor para la tercera capa de recubrimiento. En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de quitosano (4% p/p) en pH 5 usando HCl. Se pulverizó la disolución resultante sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 20% (p/p).

Ejemplo 7

Se sometieron a prueba gránulos de microorganismos probióticos encapsulados para determinar la resistencia al calor. Por consiguiente, los microorganismos encapsulados del ejemplo 6 se expusieron a 85ºC durante 45 minutos. Entonces se determinaron las UFC/g usando un procedimiento de recuento descrito a continuación.

Procedimiento de recuento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bifidus*:

Se suspendieron 10 g de muestra en 90 ml de tampón fosfato y se colocaron en un dispositivo Stomacher durante 10 min. Entonces se agitó la suspensión resultante durante 90 min. Entonces se realizaron diluciones en serie (de manera decimal) de la mezcla y finalmente se vertieron sobre medios de cultivo en placa apropiados. Se usaron medios de crecimiento MRS que contenían o bien cisteína o bien maltosa respectivamente para *acidophilus* y *bifidus*. Entonces se incubaron las placas resultante durante 3 días en condiciones anaerobias. Finalmente, se contaron los microorganismos y se calcularon las UFC/g en consecuencia.

Resultados:

	Lactobacillus acidophilus	*Bifidobacterium bifidum*
Sin recubrir – antes del procedimiento de recubrimiento* (UFC/g iniciales)	$3,6 \times 10^{10}$	$7,2 \times 10^{9}$
Tras recubrimiento **(UFC/g)	$1,6 \times 10^{7}$	$1,2 \times 10^{7}$
Tras calentamiento ***(UFC/g)	$1,4 \times 10^{7}$	$5,4 \times 10^{6}$
* La razón en peso entre dos tipos de microorganismos en el producto final es de 1:1. ** La combinación de microorganismos constituye el 10% (p/p) del producto final *** El procedimiento de calentamiento se llevó a cabo a 80ºC durante 45 minutos.		

Ejemplo 8

Una galleta probiótica

Esta galleta probiótica está constituida por 0,3 g de relleno y 30 g de galleta. Relleno: Se mezclaron los siguientes ingredientes a temperatura ambiente (los porcentajes son porcentajes en peso, basándose en el peso de relleno total): Receta de galleta: 1 parte de azúcar, 2 partes de margarina, 3 partes de harina mezclada con el 1 por ciento de polvo probiótico.

Supervivencia de los microorganismos

La temperatura máxima fue de aproximadamente 200ºC, aplicada durante hasta 4,5 minutos; lo que se adecua a la mayor parte de la producción industrial de galletas. Aproximadamente el 50% de los microorganismos vivos se mantuvieron tras el horneado.

Ejemplo 9

Pan probiótico

Este pan probiótico está constituido por 0,3 g de relleno y 30 g de pan.

Supervivencia de los microorganismos

El nivel de supervivencia de los microorganismos obtenido en la simulación fue de entre el 50% y el 80%. Se obtuvo hasta el 83% de microorganismos vivos tras 10 minutos de horneado a 200ºC con un punto de partida de 10^{9} microorganismos por gramo.

Ejemplo 10

Evaluación de la resistencia al calor de microorganismos probióticos encapsulados según la presente invención en condición seca

Objetivo

Evaluar la resistencia al calor y la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados usando la tecnología basada en la presente invención en comparación con microorganismos probióticos sin recubrir en una condición seca.

Resumen

Se colocaron microorganismos probióticos tanto encapsulados como no encapsulados (*L. acidophillus* y *Bifidobacteria*) en un horno que se precalentó hasta 80 ºC durante o bien 30 minutos o bien 45 minutos. Entonces se extrajeron los probióticos y se realizó la prueba de UFC para determinar la supervivencia de los microorganismos microencapsulados frente a los no encapsulados. Los resultados mostraron que la exposición de probióticos no encapsulados a tales condiciones de calor puede ser catastrófica, en los que no pudieron calcularse UFC/g, lo que indica que se produjo la destrucción total de los microorganismos no encapsulados. Por el contrario, los probióticos encapsulados basados en el procedimiento de microencapsulación según la presente invención no mostraron reducción significativa en la prueba de vitalidad tras tales condiciones de tratamiento térmico. Basándose en estos resultados, puede concluirse que el procedimiento de microencapsulación usando recubrimiento de múltiples capas basado en la presente invención proporciona resistencia al calor a probióticos en las condiciones descritas anteriormente.

Materiales

2 gramos de microorganismos en mezcla probióticos recubiertos (*L. Acidophillus* y *Bifidobacteria*) según la presente invención. La composición de las capas de recubrimiento se ha representado en la tabla 1.

2 Gramos de bacterias en mezcla no recubiertas (*L. Acidophillus* y *Bifidobacteria*)

Método

El procedimiento de microencapsulación se llevó a cabo según el procesamiento maestro de fabricación, números de lote de registro RDEN 904051 y RDEN 904051.

Tabla 1: Los componentes de diferentes etapas del procedimiento de microencapsulación

Componentes	Etapa
Celulosa microcristalina (MCC)	Núcleo interior granulado
Trehalosa deshidratada	Núcleo interior granulado
Maltodextrina DE15	Núcleo interior granulado
Lactobacillus acidophilus	Núcleo interior granulado
Bifidobacterium	Núcleo interior granulado
Aceite vegetal hidrogenado (HVO)	1ª capa de recubrimiento
Alginato de sodio de alta densidad	2ª capa de recubrimiento
Quitosano	3ª capa de recubrimiento

Prueba de calentamiento

Se introdujeron probióticos tanto microencapsulados como no encapsulados (de control) en un horno que se precalentó hasta 80 ºC durante o bien 30 o bien 45 minutos.

Prueba de UFC

Se realizaron pruebas de UFC para las bacterias antes y después del procedimiento de calentamiento usando el método descrito tal como sigue;

1) 10 g de muestra con 90 ml de tampón fosfato.

2) Stomacher 10 min.

3) Agitación de las muestras durante 90 min.

4) Diluciones decimales.

5) Métodos de vertido en placa.

6) Para *acidophilus*, se usa MRS con cisteína.

7) Para *bifidus*, se usa MRS con maltosa en lugar de lactosa.

8) Incubación de 3 días en condiciones anaerobias.

9) Recuento de bacterias y cálculo de las UFC/g. El método se ha descrito en detalle en otro lugar (K. G. de C. Lima *et al.* / LWT - Food Science and Technology 42 (2009), 491-494).

Para las bacterias probióticas encapsuladas, en primer lugar se rompió la envuelta de múltiples capas que rodea a los microorganismos usando un mortero y una mano de mortero antes de aplicar el método de UFC anterior.

Resultados

Tabla 2. El efecto del procedimiento de encapsulación sobre las UFC

	Lactobacillus acidophilus (UFC/g)	*Bifidobacterium bifidum* (UFC/g)
Microorganismos no encapsulados* (microorganismos puros iniciales)	$3{,}6 \times 10^{10}$	$7{,}2 \times 10^{9}$
Tras recubrimiento (microorganismos microencapsulados)**	$1{,}6 \times 10^{7}$	$1{,}2 \times 10^{7}$

* La razón en peso entre dos tipos microorganismos en el producto final es de 1:1.
** El compuesto de combinación de microorganismos constituye el 10% (p/p) del producto final

Tabla 3. El efecto del tratamiento térmico en la condición seca en la supervivencia de los microorganismos probióticos

	Lactobacillus acidophilus (UFC/g)	*Bifidobacterium bifidum* (UFC/g)
Microorganismos encapsulados tras tratamiento térmico, condición seca (80ºC, 30 minutos)	$1{,}0 \times 10^7$	$8{,}6 \times 10^6$
Microorganismos encapsulados tras tratamiento térmico, condición seca (80ºC, 45 minutos)	$1{,}4 \times 10^7$	$5{,}4 \times 10^6$
Microorganismos no encapsulados (80ºC, 30 minutos)	0	0

Conclusión

Basándose en los resultados de la tabla 3, puede concluirse que el procedimiento de microencapsulación usando el procedimiento de recubrimiento de múltiples capas según la presente invención proporciona resistencia al calor a los probióticos en condición seca.

Ejemplo 11

Evaluación de la resistencia al calor de microorganismos probióticos encapsulados según la presente invención en condición de semi-horneado

Objetivo

Evaluar la resistencia al calor y la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados usando la tecnología según la presente invención en comparación con microorganismos probióticos sin recubrir en una condición de semi-horneado.

Resumen

Se mezclaron microorganismos probióticos tanto encapsulados como no encapsulados (*L. Acidophillus* y *Bifidobacteria*) los ingredientes del pan blanco y se sometieron a horneado a 180ºC, humedad del 70% durante 40 minutos. Con el fin de permitir la recogida de los microorganismos de la masa horneada, se insertaron microorganismos tanto encapsulados como no encapsulados en la masa usando dos métodos diferentes que se denominan “estopilla” y “ravioli”. Por consiguiente, los microorganismos se añadieron a la masa o bien indirectamente mediante el uso de la estopilla para aislar los microorganismos de la masa (método de estopilla, experimento I) o bien directamente creando una cavidad separada (método de ravioli, experimento II), compuesta por la propia masa, que contenía previamente los microorganismos. Según el método de estopilla, los microorganismos o bien se revistieron previamente en una estopilla que luego se insertó en la masa antes del procedimiento de horneado (experimento Ia) o bien los microorganismos se colocaron sobre una pieza fina de estopilla que se había insertado previamente en la masa creando un pequeño cuenco en el centro de la barra de masa y rellenándolo mediante la pieza fina de estopilla (experimento Ib). Según el método de “ravioli”, en primer lugar se formó una pequeña cavidad como un ravioli a partir de la masa, en la que se colocaron 2 gramos de microorganismos en mezcla recubiertos, y se cierra. Entonces se coloca la cavidad en el centro de la barra de masa. De este modo también puede impedirse la adherencia de la masa a los microorganismos tras el procedimiento de horneado. Es importante impedir la adherencia de la masa a los microorganismos puesto que en un experimento de este tipo, la masa puede constituir una barrera mecánica contra la fuerza de aplastamiento, durante el procedimiento de aplastamiento, actuando como un “absorbedor de choques”. De este modo, puede asegurarse de que el recubrimiento está completamente roto durante el procedimiento de aplastamiento antes de someter a prueba para determinar las UFC. Tras el horneado, se retiraron los microorganismos y se determinaron las UFC/g para cada cepa de microorganismos, tanto de microorganismos encapsulados como no encapsulados.

Los resultados de las UFC muestran claramente que los microorganismos no recubiertos no pudieron sobrevivir a la condición de horneado, mientras que los microorganismos encapsulados demostraron resistencia al calor durante el procedimiento de horneado y un alto valor de supervivencia tras el procedimiento de horneado.

Materiales

3 Tazas de harina

10 Gramos de levadura

2 Cucharadas de aceite de oliva

1/8 Cucharada de sal

Agua

2 Gramos de microorganismos en mezcla probióticos recubiertos (*L. Acidophillus* y *Bifidobacteria*)

2 Gramos de bacterias en mezcla no recubiertas (*L. Acidophillus* y *Bifidobacteria*)

Métodos

Procedimiento de horneado

Se mezclaron los ingredientes del pan entre sí y tras algunos minutos de amasado, se dejó que la masa subiera. Entonces se dividió la masa en barras separadas. Se insertaron los microorganismos en las barras de masa usando dos métodos diferentes de “estopilla” y “ravioli” tal como se describe a continuación (señalado como experimento I y experimento II, respectivamente).

Experimento I- Método de “estopilla”

Experimento Ia – Se insertaron microorganismos tanto encapsulados como no encapsulados en la masa cuando se revistieron previamente en una “estopilla”. Se colocaron 2 g de microorganismos o bien encapsulados o bien no encapsulados en el medio de cada barra de masa.

Experimento Ib- Se colocaron 2 g de microorganismos encapsulados sobre la superficie de una pieza fina de estopilla que se había insertado previamente en el medio de la barra de masa creando un cuenco y rellenándolo con la pieza fina de estopilla. Entonces se cubrió el cuenco con la masa restante.

Experimento II- Método de “ravioli”

En primer lugar se formó una pequeña cavidad como un ravioli a partir de la masa, en la que se colocaron 2 gramos de microorganismos en mezcla encapsulados y se cerró. Entonces se colocó la cavidad en el centro de la barra de masa.

Se dejó que la masa subiera durante 15 minutos adicionales.

Se llevó a cabo el horneado a 180ºC durante 40 minutos.

En la balda inferior del horno, se colocó una bandeja de metal con 1/2 litro de agua para crear humedad dentro del horno antes de introducir las barras de pan en el horno. La humedad creada dentro del horno se midió antes de introducir las barras de pan en el horno. Con el fin de obtener el patrón de humedad de horneado óptimo, las barras de pan se introdujeron en el horno cuando la humedad alcanzó entre el 60-70%. Una vez horneadas las barras de masa, se retiraron fácilmente los microorganismos y se enviaron a la prueba de UFC.

Prueba de UFC

Se realizaron pruebas de UFC para los microorganismos antes y después del procedimiento de horneado usando el método descrito tal como sigue;

1. 10 g de muestra con 90 ml de tampón fosfato.

2. Stomacher 10 min.

3. Agitación de las muestras durante 90 min.

4. Diluciones decimales.

5. Métodos de vertido en placa.

6. Para *acidophilus*, se usa MRS con cisteína.

7. Para *bifidus*, se usa MRS con maltosa en lugar de lactosa.

8. Incubación de 3 días en condiciones anaerobias.

9. Recuento de microorganismos y cálculo de las UFC/g.

El método se ha descrito en detalle en otro lugar (K. G. de C. Lima *et al.* / LWT - Food Science and Technology 42 (2009), 491-494).

Para los microorganismos probióticos encapsulados, en primer lugar se rompió la envuelta de múltiples capas que rodea a los microorganismos usando un mortero y una mano de mortero antes de aplicar el método de UFC anterior.

Resultados

Tabla 4. UFC/g de microorganismos encapsulados y no encapsulados antes y después de la condición de horneado

	L. acidophilus	*Bifidobacteria*
Bacterias probióticas encapsuladas antes del horneado	5×10^5	5×10^5
Bacterias probióticas no encapsuladas antes del horneado	5×10^5	5×10^5
Bacterias probióticas encapsuladas después del horneado – Experimento Ia	5×10^5	$3{,}1 \times 10^5$
Bacterias probióticas no encapsuladas después del horneado – Experimento Ia	0	0
Bacterias probióticas encapsuladas después del horneado – Experimento Ib	1×10^5	1×10^5
Bacterias probióticas encapsuladas después del horneado – Experimento II	1×10^5	1×10^5

Conclusión

Los resultados obtenidos anteriormente muestran que los microorganismos probióticos encapsulados usando la tecnología según la presente invención son resistentes al calor de horneado al exponerse a la humedad existente en la masa durante el procedimiento de horneado.

Ejemplo 12

Evaluación de la resistencia al calor de microorganismos probióticos encapsulados según la presente invención en condición de horneado completo

Objetivo

Evaluar la resistencia al calor y la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados usando la tecnología según la presente invención en una condición de horneado completo usando un procedimiento comercial. Este estudio se diseñó para mostrar la viabilidad del concepto de probióticos encapsulados según la presente invención que son resistentes a un procedimiento de horneado en que se someten a fuerzas de cizalladura, humedad y calor.

Resumen

El fin de este estudio fue evaluar la resistencia de los probióticos encapsulados según la presente invención en un procedimiento de horneado usado comercialmente. Por consiguiente, los probióticos encapsulados se añadieron directamente a la masa que se había expuesto primero a fuerzas de cizalladura por amasado y posteriormente al calor y la humedad del procedimiento de horneado. Este procedimiento se planeó con el fin de imitar el procedimiento de horneado que se realiza en un procedimiento comercial. Para este fin, los probióticos encapsulados según la presente invención se añadieron directamente a harina y otros ingredientes, a los que se añadió luego agua (método de adición directa) y posteriormente se amasó y se horneó. Por consiguiente, los probióticos encapsulados se añadieron directamente a los ingredientes que constituyen la masa y luego se distribuyeron homogéneamente en la masa a través del amasado, donde se expusieron a un entorno húmedo durante la etapa de obtención de masa, seguido por calentamiento del procedimiento de horneado. Tras el procedimiento de horneado, se realizó la prueba de UFC para determinar la supervivencia de los microorganismos encapsulados. Los resultados de UFC mostraron de manera obvia que los microorganismos encapsulados demostraron un alto valor de supervivencia tras el procedimiento de horneado. Por tanto, puede concluirse que los probióticos encapsulados según la presente invención son resistentes de manera definitiva al entorno de humedad con la alta cizalladura existente durante el amasado de la masa, así como al calor del procedimiento de horneado.

Materiales

Ingredientes del pan:

Harina blanca: 231 gramos

Aceite de oliva: 18,7 gramos

Sal: 2 gramos

Levadura: 5 gramos

Probióticos encapsulados: 2 gramos

Masa antes del horneado: 398,7 gramos

Pan tras el horneado: 364,5 gramos

Método general del procedimiento de horneado

Se mezclaron homogéneamente los microorganismos probióticos encapsulados *L. Acidophillus* y *Bifidobacteria* con el resto de los ingredientes del pan (pan blanco). Se añadió agua y entonces se amasó la masa. Entonces se horneó la masa resultante a 180ºC, humedad del 70% durante 40 minutos. El procedimiento fue tal como sigue:

Equipos

Mezcladora Kenwood: cuenco de 5 litros.

Preparación de masa

Se coloca harina, levadura y microorganismos encapsulados en un cuenco de mezclado. Se mezclan todos los ingredientes entre sí.

Se añade aceite y sal.

Se añade agua gradualmente hasta que la mezcla de harina forma una masa firme.

Se deja que la mezcladora amase la masa durante 10 minutos.

Se apaga la mezcladora y se deja reposar la masa en el cuenco se cubre y se deja que suba durante 30 minutos.

Se conecta la mezcladora durante varios segundos para “perforar” la masa.

Procedimiento de horneado

En primer lugar, se precalentó el horno hasta 180ºC antes de introducir la masa. Se llevó a cabo el horneado a 180 ºC durante 40 minutos. Se colocó una bandeja de metal que contenía 1/2 litro de agua sobre la balda inferior del horno para crear la humedad apropiada (-70% de HR) dentro del horno antes de introducir la masa. Se midió la humedad creada dentro del horno antes del horneado. Se dio forma a la masa en un molde para horneado y se horneó durante 40 minutos (180 ºC y 70% de HR). Al final del horneado se comprobó de nuevo la humedad.

Condiciones de horneado

Humedad antes del horneado: 70% (HR).

Humedad tras el horneado: 70% (HR).

Temperatura de horneado: 180 ºC.

Duración de horneado: 40 minutos.

Tras el horneado, se tomó una muestra del pan horneado para determinar las UFC/g para los microorganismos encapsulados.

Prueba de UFC

Se realizaron pruebas de UFC para los probióticos encapsulados tras el procedimiento de horneado usando el método de UFC descrito tal como sigue:

1) Se tomaron 20 g de muestra (pan horneado) al que se añadieron 90 ml de tampón fosfato estéril.

2) Entonces se aplastó la mezcla usando un mortero y una mano de mortero durante algunos minutos.

3) Se añadieron 160 ml adicionales de tampón fosfato estéril a la bolsa estéril desechable de un dispositivo Stomacher.

Entonces se homogeneizó la mezcla durante 2 min usando el dispositivo Stomacher.

Se realizó la prueba de UFC/g usando el siguiente procedimiento habitual:

1- Diluciones decimales.

2- Métodos de vertido en placa.

3. Para *acidophilus*, se usa MRS con cisteína.

4. Para *bifidus*, se usa MRS con maltosa el lugar de lactosa.

5. Incubación de 3 días en condiciones anaerobias.

6. Recuento de microorganismos y cálculo de las UFC/g.

El método se ha descrito en detalle en otro lugar (K. G. de C. Lima *et al*. / LWT - Food Science and Technology 42 (2009), 491-494).

Resultados

Los resultados de las UFC antes y después del horneado se resumen en la tabla 5. Los resultados de las UFC muestran claramente que los microorganismos encapsulados demostraron resistencia al calor durante el procedimiento de horneado completo y un alto valor de supervivencia tras el procedimiento de horneado.

Tabla 5. UFC/g de probióticos encapsulados en condiciones de horneado completo

	L. acidophilus	*Bifidobacteria*
Bacterias probióticas encapsuladas antes del horneado	5×10^5	5×10^5
Bacterias probióticas encapsuladas después del horneado	$1{,}4 \times 10^5$	$1{,}3 \times 10^5$

Conclusión

Los probióticos encapsulados según la presente invención son resistentes al calor de horneado durante una preparación comercial donde los probióticos encapsulados se añaden directamente a todos los ingredientes y luego se someten al procedimiento de amasado con la humedad existente en la masa y posteriormente al calor del procedimiento de horneado. Estos hallazgos indican visiblemente que las formulaciones de capas de recubrimiento de la invención dotan a los probióticos de la protección necesaria para resistir todas las fases de la preparación del producto horneado, incluyendo las fuerzas de cizalladura del amasado, la humedad relativamente alta y el calor del horneado.

Ejemplo 13

Materiales:

Componentes	Función
Lactobacillus acidophilus	Microorganismos probióticos
Bifidobacterium	Microorganismos probióticos
Celulosa microcristalina (MCC)	Sustrato de núcleo
Maltodextrina	Agente suplementario para los microorganismos
Trehalosa	Agente suplementario para los microorganismos
Ácido esteárico	Agente oleoso de primera capa de recubrimiento
Alginato de sodio de alta viscosidad	Polímero de segunda capa de recubrimiento
Quitosano	Polímero resistente al calor
Ácido clorhídrico (HCl)	Agente de ajuste del pH

Método:

1. Absorción de microorganismos sobre sustrato de núcleo microcristalino

Se absorbieron *Lactobacillus acidophilus y Bifidobacterium* sobre sustrato de MCC basándose en una razón de 38:62 respectivamente. Para este fin, se preparó una suspensión acuosa del 30% de los microorganismos y maltodextrina y trehalosa. La concentración de microorganismos fue de aproximadamente el 15% (p/p) en esa suspensión. El procedimiento de absorción se llevó a cabo a una temperatura de salida <35ºC con el fin de evitar la exposición de los microorganismos a altas temperaturas y por tanto, el daño por alta temperatura.

2. La primera capa de recubrimiento usando ácido esteárico

Se llevó a cabo el recubrimiento usando un dispositivo de recubrimiento de lecho fluidizado basándose en un método de fusión en caliente. Para este fin, se pulverizó ácido esteárico sobre el sustrato de MCC con microorganismos absorbidos a 40ºC para obtener un aumento de peso del 40%. Se ajustó el flujo de aire de entrada para que fuera bajo.

3. La segunda capa de recubrimiento - un recubrimiento entérico

Se usó alginato de sodio como polímero entérico. Se preparó una disolución acuosa de alginato de sodio (2% p/p). Se pulverizó la disolución de alginato de sodio sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 15%.

4. La tercera capa de recubrimiento- recubrimiento resistente al calor

Se usó quitosano como polímero resistente al calor para la tercera capa de recubrimiento. En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de quitosano (4% p/p) en pH 5 usando HCl. Se pulverizó la disolución resultante sobre los microorganismos recubiertos resultantes hasta que se obtuvo una ganancia de peso del 30% (p/p).

Aunque esta invención se ha descrito en lo que se refiere a algunos ejemplos específicos, son posibles muchas modificaciones y variaciones. Por tanto, se entiende que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede realizarse de otro modo distinto al descrito específicamente.

REIVINDICACIONES

1. Gránulo probiótico que comprende un núcleo y al menos tres capas que comprenden

i) un núcleo que comprende microorganismos probióticos y un sustrato en el que se absorben dichos microorganismos;

ii) una capa oleosa interior que recubre dicho núcleo; y

iii) una primera capa exterior que comprende una capa de recubrimiento entérico seleccionada del grupo que consiste en ácido algínico, alginato de amonio, alginato de sodio, alginato de potasio, alginato de magnesio y alginato de calcio;

iv) una segunda capa exterior que es una capa de recubrimiento exterior resistente al calor que comprende al menos un polímero seleccionado del grupo que consiste en quitosano y derivados reticulados de hidroxipropilcelulosa; y

en el que dichas capas exteriores primera y segunda recubren dicho núcleo y dicha capa interior, y comprenden al menos dos polímeros diferentes.

2. Gránulo probiótico según la reivindicación 1, en el que dichos microorganismos probióticos se absorben en un sustrato, comprendiendo dicho sustrato uno o más componentes seleccionados de sacáridos y agentes adicionales.

3. Gránulo probiótico según la reivindicación 2, en el que dichos agentes se seleccionan de estabilizante, quelante, agente sinérgico, antioxidante, y regulador del pH, y en el que dichos sacáridos comprenden oligosacáridos prebioticos.

4. Gránulo probiótico según la reivindicación 1, que comprende además una capa intermedia entre la capa entérica y la capa exterior resistente al calor.

5. Gránulo probiótico según la reivindicación 4, en el que dicha capa intermedia comprende uno o más polímeros solubles en agua.

6. Gránulo probiótico según la reivindicación 1, en el que dichos microorganismos comprenden un género seleccionado de *Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Escherichia, Streptococcus, Diacetilactis,* y *Saccharomyces*, o una mezcla de los mismos.

7. Método para fabricar el gránulo de la reivindicación 1, que comprende: mezclar una suspensión de microorganismos probióticos con un sustrato basado en celulosa, obteniendo de ese modo una mezcla de núcleo; recubrir las partículas de dicha mezcla de núcleo con una capa oleosa, obteniendo de ese modo partículas recubiertas de aceite; recubrir dichas partículas recubiertas de aceite con una primera capa de polímero, obteniendo de ese modo partículas recubiertas con dos capas; y recubrir dichas partículas de dos capas con una segunda capa de polímero.

8. Método para fabricar el gránulo de la reivindicación 1, que comprende mezclar una suspensión acuosa de microorganismos probióticos que comprende al menos un género seleccionado del grupo que consiste en *Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Escherichia, Streptococcus, Diacetilactis*, y *Saccharomyces* y una mezcla de los mismos con al menos un polisacárido y al menos un oligosacárido, obteniendo de ese modo una mezcla de núcleo.

9. Producto alimenticio o aditivo alimenticio que comprende un gránulo probiótico según la reivindicación 1.

10. Producto alimenticio según la reivindicación 9, seleccionado del grupo que consiste en pasteles, pan, harina, productos a base de harina, productos horneados, productos congelados para hornear, yogur, productos lácteos, chocolate, néctares, zumos de frutas y atún.

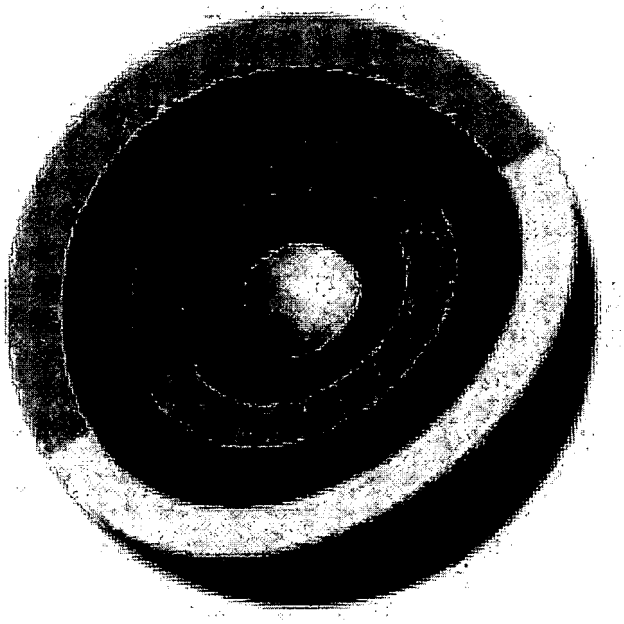

Fig. 1