

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 984**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012** **PCT/US2012/063246**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013** **WO13067305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012** **E 12845470 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2773744**

54 Título: **Composiciones de caldos para promover el desarrollo bacteriano y el crecimiento fúngico**

30 Prioridad:

02.11.2011 US 201161554813 P

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

07.06.2019

73 Titular/es:

**TEXAS TECH UNIVERSITY SYSTEM (100.0%)
Office of Technology Transfer And Intellectual
Property Box 42007
Lubbock, TX 79409-2007, US**

72 Inventor/es:

LYTE, MARK

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

Observaciones:

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

ES 2 715 984 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 de caldos para promover el desarrollo bacteriano y el crecimiento fúngico

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención versa en general sobre el campo de los caldos para promover el desarrollo de bacterias y levaduras y, más en particular, sobre la preparación de un caldo a partir de frutos para promover el desarrollo bacteriano y fúngico.

Técnica antecedente

- 10 Sin limitar el alcance de la invención, sus antecedentes están descritos en composiciones para promover o potenciar el desarrollo de microorganismos *in vitro*. La publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2009/0087517 da a conocer la producción y el uso de un extracto obtenido de *Musa* spp., preferentemente de plátanos, en la promoción del desarrollo de bacterias grampositivas, como las bacterias del ácido láctico. El extracto también es útil para la potenciación del desarrollo de bacterias gramnegativas con estrés ambiental. También se describen alimentos fermentados que contienen tales extractos.

- 15 La patente estadounidense nº 6.617.126 versa sobre un procedimiento para mejorar el desarrollo y la detección de bacterias, levaduras, hongos o cocos, añadiendo extracto de levadura filtrado en condiciones estériles y/o violeta de p-yodonitrotetrazolio al medio de cultivo. El procedimiento de la patente de Horn es especialmente adecuado para la detección de micobacterias o gérmenes en condiciones de estrés, tales como gérmenes transportados por vía aérea después del estrés de la desecación en el aire.

- 20 Sutherland y otros, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2009, 60(8): 717-727, describen los efectos de los extractos alimenticios en bacterias probióticas y patógenas seleccionadas.

El documento WO 2007/052081 describe un extracto de plátano para promover el desarrollo de bacterias del ácido láctico.

- 25 Otros, como Chan-Blanco, y otros, en su publicación "Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation", *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* (2003) 63:147-152, han usado plátanos pasados para generar ácido láctico mediante fermentación por lotes, usando *Lactobacillus casei* en tres tratamientos. Dos tratamientos consistieron en sustratos de puré de plátano diluido, uno que fue enriquecido con sales y aminoácidos. Cuando la fermentación fue evaluada en el tiempo, se hallaron diferencias significativas en los tres tratamientos para cada una de las cinco variables analizadas (generación y productividad de ácido láctico, y consumo de glucosa, fructosa y sacarosa). El experto reconocerá que la fermentación es un proceso bioquímico que no depende del crecimiento o la división celular. Además, la referencia halló una disminución en el desarrollo de las bacterias cuando eran expuestas a un extracto de plátano. Pese a las enseñanzas de la técnica, sigue habiendo una necesidad en la técnica de un medio potente y de suplementos de medios que puedan ser usados para desarrollarse de manera vigorosa y sistemática en una amplia diversidad de organismos para una aplicación comercial o de otro tipo.

Divulgación de la invención

- 35 La presente invención da a conocer composiciones y procedimientos para preparar extractos de plátano a partir de plantas de la familia vegetal *Musaceae* (géneros *Musa*) para promover o potenciar el desarrollo bacteriano y fúngico por sí mismo o como componentes de un medio de cultivo. La presente invención puede ser usada con frutos y plantas de banano procesados según se describe en la presente memoria. La presente invención está definida en las reivindicaciones.

- 40 En una realización, la presente invención incluye composiciones y procedimientos de preparación de un extracto de plátano que comprende las etapas de: combinar con agua destilada el corazón de un fruto de una planta de la familia de las musáceas, estando el corazón del fruto sustancialmente libre de la cáscara del fruto, de los extremos del fruto y de cualquier decoloración o magulladuras; batir la fruta y el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla uniforme; separar la fruta batida y el agua destilada en un sobrenadante y un sedimento, desechándose el sedimento y procesándose adicionalmente el sobrenadante; esterilizar el sobrenadante; opcionalmente, llevar a cabo una segunda separación en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y aclarar el sobrenadante esterilizado por filtración por membrana con un procedimiento de filtración en membrana laminar plana o de fibras huecas, una membrana tubular, enrollada en espiral, de fibra hueca, a presión, sumergida o cerámica con un corte molecular de 1000 daltones. Se dan a conocer una o más técnicas en las que la clarificación da lugar a un aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos desarrollados en un caldo que comprende el sobrenadante filtrado.

La presente invención proporciona una composición obtenible por el procedimiento descrito. Se da a conocer una composición secada por pulverización para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de uno o más microorganismos que tiene un extracto secado por pulverización obtenido de una o más plantas con flores, creado por un procedimiento que comprende: combinar con agua destilada el corazón de un fruto de una planta con flores, estando el corazón del fruto sustancialmente libre de la cáscara del fruto, de los extremos del fruto y de cualquier decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; batir la fruta y el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla uniforme; separar la fruta batida y el agua destilada en un sobrenadante y un sedimento, desechándose el sedimento y procesándose adicionalmente el sobrenadante; esterilizar el sobrenadante; opcionalmente, llevar a cabo una segunda separación en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y filtrar el sobrenadante esterilizado mediante un procedimiento de filtración en membrana laminar plana o de fibras huecas, dando lugar la filtración por membrana al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos desarrollados en un caldo que comprende el sobrenadante filtrado. El extracto secado por pulverización puede ser convertido en un polvo y/o ser usado como un polvo o ser disuelto formando una mezcla o una solución.

La composición puede ser encapsulada en forma de una perla, un recubrimiento, una cápsula, una píldora o una combinación de los mismos. Además, la composición puede incluir múltiples capas combinadas para formar una sola composición; por ejemplo, la composición y el probiótico encapsulados en una perla que, a continuación, es recubierta con un primer recubrimiento de modificación de la liberación que es recubierto con un probiótico que es recubierto nuevamente con un recubrimiento de modificación de la liberación que es similar al primer recubrimiento de modificación de la liberación o diferente del mismo. El material de encapsulación y el recubrimiento de modificación de la liberación pueden ser un material permeable al agua, un material de recubrimiento de barrera de difusión, un material de recubrimiento polimérico o una combinación de los mismos, y formar un recubrimiento de liberación extendida, un recubrimiento de liberación controlada, un recubrimiento de liberación retardada, un recubrimiento de liberación inmediata o una combinación de los mismos. La composición también puede incluir uno o más probióticos seleccionados de *B. subtilis*, esporas de *B. subtilis*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Musaceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Rosaceae*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, especies de *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12, *Saccharomyces*, mohos, especies de *Aspergillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Nelissococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Campylobacter*, *Peptococcus*, *Heliobacter*, *Hemophylus*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Shigella*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Toxoplasmosis* y *Rotavirus* o esporas de los mismos.

Se da a conocer una composición encapsulada para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de uno o más microorganismos que comprende uno o más probióticos y uno o más extractos obtenidos de una o más plantas con flores encapsulados por un material de encapsulación, creándose los uno o más extractos obtenidos de una o más plantas con flores mediante un procedimiento que comprende: combinar con agua destilada el corazón de un fruto de una planta con flores, estando el corazón del fruto sustancialmente libre de la cáscara del fruto, de los extremos del fruto y de cualquier decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; batir la fruta y el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla uniforme; separar la fruta batida y el agua destilada en un sobrenadante y un sedimento, desechándose el sedimento y procesándose adicionalmente el sobrenadante; esterilizar el sobrenadante; opcionalmente, llevar a cabo una segunda separación en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y filtrar el sobrenadante esterilizado mediante un procedimiento de filtración en membrana laminar plana o de fibras huecas, dando lugar la filtración por membrana al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos desarrollados en un caldo que comprende el sobrenadante filtrado.

En un aspecto, el procedimiento comprende, además, las etapas opcionales de: procesar el extracto con los uno o más componentes activos mediante una o más técnicas seleccionadas entre liofilización, centrifugación al vacío, secado por pulverización o combinaciones cualesquiera de los mismos; y llevar a cabo uno o más ensayos analíticos o ensayos de análisis químico en el extracto vegetal, seleccionándose al menos uno de los ensayos del grupo constituido por perfil glucémico, contenido hídrico, análisis de vitamina A, estimación de proteína bruta, análisis mineral completo, nitrógeno no proteico (NPN) equivalente a proteína, índice de Brix, peso específico, vitamina C, análisis de fibra bruta, pH, composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (GC), y combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la clarificación se logra mediante un procedimiento de filtración con

una membrana laminar plana o de fibras huecas, una membrana tubular, enrollada en espiral, de fibra hueca, a presión, sumergida o cerámica. En otro aspecto, la fracción que comprende los componentes activos comprende uno o más componentes en el intervalo de pesos moleculares de 250-1.000 o incluso 500-1.000 daltones. En otro aspecto, los microorganismos comprenden bacterias, levaduras, hongos o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, los microorganismos comprenden bacterias seleccionadas entre bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, bacterias del ácido láctico, bacterias aerobias, bacterias anaerobias o combinaciones cualesquiera de las mismas. En otro aspecto, los microorganismos comprenden una bacteria seleccionada de una o más bacterias pertenecientes a un género *Bacillus* seleccionado del grupo constituido por *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la composición es añadida a un caldo de desarrollo, esporulación o fermentación para promover o potenciar la germinación de esporas, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos, comprendiendo el medio de cultivo caldo nutriente (NB), agar nutriente (NA), caldo Luria-Bertani (LB), caldo de ajuste catiónico de Mueller-Hinton (MH), caldo de esporulación, agar de eosina-azul de metileno (EMB), levadura y moho (YM), agar sangre, agar de MacConkey, agar entérico de Hektoen (HE), agar de sal de manitol (MSA), caldo formidable (TB), desoxicolato de lisina de xilosa (XLD), caldo RPMI-1640, caldos a base de melaza (por ejemplo, melaza de remolacha y de caña), agar de extracto de levadura en carbón tamponado, caldos mínimos, o combinaciones o modificaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la composición es añadida al medio de cultivo a una concentración que oscila de 0,01%-15%, 0,5%-10% o 1%-5%. En otro aspecto, la planta con flores se selecciona de una planta perteneciente a una familia seleccionada del grupo constituido por *Poaceae*, *Fabaceae*, *Musaceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Rosaceae* y combinaciones cualesquiera de las mismas. En otro aspecto, el inóculo de los microorganismos es subóptimo. En otro aspecto, el fruto es madurado y luego congelado antes de su procesamiento.

Otra realización de la invención incluye un procedimiento para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de uno o más microorganismos que comprende las etapas de: proporcionar un medio de fermentación o de cultivo para el cultivo o el desarrollo de los uno o más microorganismos; añadir un inóculo o esporas de los uno o más microorganismos necesitados de una promoción o potenciación de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos, comprendiendo el inóculo los uno o más microorganismos en una fase de latencia o una fase exponencial de un ciclo de desarrollo microbiano; y añadir un extracto vegetal según la invención, pudiendo añadirse la composición al medio de cultivo antes de la adición del inóculo o las esporas, o periódicamente durante una fase exponencial o estacionaria del ciclo de desarrollo microbiano. En un aspecto, el procedimiento comprende, además, las etapas de: monitorizar el desarrollo de los uno o más microorganismos a través de las fases del ciclo de desarrollo microbiano; y recoger los uno o más microorganismos cuando se logran un desarrollo, una viabilidad o una producción deseados, se alcanza un nivel deseado de producción de metabolitos, se alcanza una fase de muerte del ciclo de desarrollo microbiano, o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, los microorganismos comprenden bacterias, levaduras, hongos o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, los microorganismos comprenden bacterias seleccionadas entre bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, bacterias del ácido láctico, bacterias aerobias, bacterias anaerobias o combinaciones cualesquiera de las mismas. En otro aspecto, los microorganismos comprenden bacterias seleccionadas entre una o más bacterias pertenecientes a un género *Bacillus* seleccionados del grupo constituido por *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, el medio de cultivo comprende caldo nutriente (NB), agar nutriente (NA), caldo Luria-Bertani (LB), caldo de ajuste catiónico de Mueller-Hinton (MH), caldo de esporulación, agar de eosina-azul de metileno (EMB), levadura y moho (YM), agar sangre, agar de MacConkey, agar entérico de Hektoen (HE), agar de sal de manitol (MSA), caldo formidable (TB), desoxicolato de lisina de xilosa (XLD), caldo RPMI-1640, caldos mínimos, caldos a base de melaza, agar de extracto de levadura en carbón tamponado o combinaciones o modificaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, el extracto es añadido al medio de cultivo a una concentración que oscila, por ejemplo, de 0,01-15%, 0,1-10%, 0,5-5% 0,1%-15% v/v. En ciertos aspectos, es añadido al 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5,0, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15%. En otro aspecto, el extracto es obtenido de uno o más frutos de la planta perteneciente a la familia *Musaceae*, en la que el fruto comprende plátanos. En otro aspecto, el extracto está hecho de uno o más plátanos o plátanos macho mediante un procedimiento que comprende las etapas de: batir los plátanos o plátanos macho con agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla homogénea; centrifugar la mezcla para separar el sobrenadante y el sedimento, desechándose el sedimento y tomándose el sobrenadante para un procesamiento adicional; esterilizar el sobrenadante; llevar a cabo una segunda centrifugación, si es necesario, en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y purificar el sobrenadante esterilizado por un procedimiento de filtración por membrana, dando lugar la filtración por membrana al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos. En otro aspecto, el procedimiento comprende, además, la etapa adicional de procesar el extracto con los uno o más componentes activos mediante una o más técnicas seleccionadas entre liofilización, centrifugación al vacío, secado por pulverización o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro

aspecto, la fracción que comprende los componentes activos comprende uno o más componentes activos en el intervalo de pesos moleculares de 250 a 100 o incluso 500-1.000 daltones. En otro aspecto, el procedimiento de filtración por membrana se lleva a cabo usando un sistema de filtración por membrana laminar plana o de fibras huecas, una membrana tubular, enrollada en espiral, de fibra hueca, a presión, sumergida o cerámica. En otro aspecto, el inóculo de los microorganismos es subóptimo. En otro aspecto, el fruto es madurado y luego congelado antes de su procesamiento. En otro aspecto, en la etapa previa al batido de los plátanos, los plátanos son congelados y descongelados y luego procesados por lotes.

Se divulga un procedimiento de preparación de un extracto vegetal de uno o más plátanos o plátanos macho para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de uno o más microorganismos que comprende las etapas de: proporcionar uno o más plátanos o plátanos macho; preparar los plátanos o plátanos macho para su procesamiento mediante un procedimiento que comprende las etapas de: inspeccionar los plátanos o plátanos macho en busca de cualquier porción que presente decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; cortar y desechar cualquier porción de los plátanos o plátanos macho que presente decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; cortar y desechar los extremos de los plátanos o plátanos macho; y poner los plátanos o plátanos macho en una batidora o un robot de cocina junto con agua destilada; batir los plátanos o plátanos macho con el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla homogénea; centrifugar la mezcla para separar el sobrenadante y el sedimento, desechándose el sedimento y tomándose el sobrenadante para un procesamiento adicional; esterilizar el sobrenadante; llevar a cabo una segunda centrifugación, si es necesario, en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y purificar el sobrenadante esterilizado por un procedimiento de filtración por membrana laminar plana o de fibras huecas, dando lugar la filtración por membrana al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos. En un aspecto, el procedimiento comprende, además, las etapas opcionales de: procesar el extracto con los uno o más componentes activos mediante una o más técnicas seleccionadas entre liofilización, centrifugación al vacío, secado por pulverización o combinaciones cualesquiera de los mismos, y llevar a cabo uno o más ensayos analíticos o ensayos de análisis químico en el extracto vegetal, seleccionándose al menos uno de los ensayos del grupo constituido por perfil glucémico, contenido hídrico, análisis de vitamina A, estimación de proteína bruta, análisis mineral completo, nitrógeno no proteico (NPN) equivalente a proteína, índice de Brix, peso específico, vitamina C, análisis de fibra bruta, pH, composición de ácidos grasos mediante GC, y combinaciones cualesquiera de los mismos. En un aspecto, la fracción que comprende los componentes activos comprende uno o más componentes activos en el intervalo de pesos moleculares de 250-1.000 daltones. En otro aspecto, los microorganismos comprenden una o más de bacterias, levaduras o ambas. En otro aspecto, los microorganismos comprenden una bacteria seleccionada de una o más bacterias pertenecientes a un género *Bacillus* seleccionado del grupo constituido por *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la composición es añadida a un caldo de desarrollo, esporulación o fermentación para promover o potenciar la germinación de esporas, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos, comprendiendo el medio de cultivo caldo nutriente (NB), agar nutriente (NA), caldo Luria-Bertani (LB), caldo de ajuste catiónico de Mueller-Hinton (MH), caldo de esporulación, caldo RPMI-1640, caldos a base de melaza o combinaciones o modificaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, el extracto es añadido al medio de cultivo a una concentración que oscila de 0,01%-15%, 0,5%-10% o 1%-5%. En otro aspecto, el fruto es madurado y luego congelado antes de su procesamiento. En otro aspecto, el procedimiento de filtración por membrana se lleva a cabo usando una filtración por membrana laminar plana o de fibras huecas, membrana tubular, enrollada en espiral, de fibra hueca, a presión, sumergida o cerámica.

Otra realización adicional de la presente invención incluye un procedimiento para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de una o más bacterias *Bacillus*, levaduras o ambas que comprende las etapas de: proporcionar un medio de fermentación o crecimiento para el cultivo o el desarrollo de las una o más bacterias *Bacillus*, levaduras o ambas; añadir un inóculo o esporas de las una o más bacterias *Bacillus*, levaduras o ambas; añadir un inóculo o esporas de las una o más bacterias *Bacillus*, levaduras o ambas necesitadas de una proporción o potenciación de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos, comprendiendo el inóculo los uno o más microorganismos en una fase de latencia o una fase exponencial de un ciclo de desarrollo microbiano; y añadir una composición según la invención, pudiendo añadirse la composición al medio de cultivo antes de la adición del inóculo o las esporas, o periódicamente durante una fase exponencial o estacionaria del ciclo de desarrollo microbiano. En un aspecto, el procedimiento comprende, además, las etapas de monitorizar la fermentación o el desarrollo de las una o más bacterias de las especies *Bacillus*, levaduras o ambas a través de las fases del ciclo de desarrollo microbiano; y recoger las una o más bacterias de las especies *Bacillus*, levaduras o ambas cuando se logran un desarrollo, una viabilidad o una producción deseados, se alcanza un nivel deseado de producción de metabolitos, se alcanza una fase de muerte del ciclo de desarrollo microbiano, o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, las bacterias *Bacillus* comprenden una o

más bacterias pertenecientes a un género *Bacillus* seleccionado del grupo constituido por *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, el medio de cultivo comprende caldo nutriente (NB), agar nutriente (NA), caldo Luria-Bertani (LB), caldo de ajuste catiónico de Mueller-Hinton (MH), caldo de esporulación, caldo RPMI-1640, caldos a base de melaza o combinaciones o modificaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, el extracto es añadido al medio de cultivo a una concentración que oscila de 0,01%-15%, 0,5%-10% o 1%-5%. En otro aspecto, el extracto de los uno o más plátanos o plátanos macho es preparado mediante un procedimiento que comprende las etapas de: proporcionar uno o más plátanos para formar una mezcla homogénea; preparar los plátanos o plátanos macho para su procesamiento mediante un procedimiento que comprende las etapas de: inspeccionar los plátanos o plátanos macho en busca de cualquier porción que presente decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; cortar y desechar cualquier porción de los plátanos o plátanos macho que presente decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; cortar y desechar los extremos de los plátanos o plátanos macho; y poner los plátanos o plátanos macho en una batidora o un robot de cocina junto con agua destilada; batir los plátanos o plátanos macho con el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla homogénea; centrifugar la mezcla para separar el sobrenadante y el sedimento, desechándose el sedimento y tomándose el sobrenadante para un procesamiento adicional; esterilizar el sobrenadante; llevar a cabo una segunda centrifugación, si es necesario, en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y purificar el sobrenadante esterilizado por un procedimiento de ultrafiltración que dé lugar al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos. En un aspecto, el procedimiento comprende, además, las etapas opcionales de: procesar el extracto con los uno o más componentes activos mediante una o más técnicas seleccionadas entre liofilización, centrifugación al vacío, secado por pulverización o combinaciones cualesquiera de los mismos; y llevar a cabo uno o más ensayos analíticos o ensayos de análisis químico en el extracto vegetal, comprendiendo los ensayos el perfil glucémico, el contenido hídrico, el análisis de vitamina A, la estimación de proteína bruta, el análisis mineral completo, el nitrógeno no proteico (NPN) equivalente a proteína, el índice de Brix, el peso específico, la vitamina C, el análisis de fibra bruta, el pH, la composición de ácidos grasos mediante GC o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la fracción que comprende los componentes activos comprende uno o más componentes en el intervalo de pesos moleculares de 250-1.000 daltones. En otro aspecto, el plátano es madurado y luego congelado antes de su procesamiento.

Se da a conocer una composición para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de uno o más microorganismos que comprende un extracto obtenido de una o más plantas con flores, creado por un procedimiento que comprende: combinar con agua destilada el corazón de un fruto de una planta con flores, estando el corazón del fruto sustancialmente libre de la cáscara del fruto, de los extremos del fruto y de cualquier decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; batir la fruta y el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla homogénea; separar la fruta batida y el agua destilada en un sobrenadante y un sedimento, desechándose el sedimento y procesándose adicionalmente el sobrenadante; esterilizar el sobrenadante; opcionalmente, llevar a cabo una segunda separación en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y filtrar el sobrenadante esterilizado mediante un procedimiento de filtración en membrana laminar plana o de fibras huecas, dando lugar la filtración por membrana al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos desarrollados en un caldo que comprende el sobrenadante filtrado. En un aspecto, la planta con flores se selecciona de una planta perteneciente a una familia seleccionada del grupo constituido por *Poaceae*, *Fabaceae*, *Musaceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Rosaceae* y combinaciones cualesquiera de las mismas. En otro aspecto, la planta con flores es una planta perteneciente a la familia *Musaceae*. En otro aspecto, el extracto se obtiene de un fruto de la planta con flores de la familia *Musaceae*, seleccionándose el fruto de plátanos, plátanos macho, *Ensete*, *Musella* y combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, los microorganismos comprenden bacterias, levaduras, hongos o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, los microorganismos comprenden una bacteria seleccionada entre bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, bacterias del ácido láctico, bacterias aerobias, bacterias anaerobias o combinaciones cualesquiera de las mismas. En otro aspecto, los microorganismos comprenden una bacteria seleccionada entre una o más bacterias pertenecientes a un género *Bacillus* seleccionado del grupo constituido por *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la composición es añadida a un caldo de desarrollo, esporulación o fermentación para promover o potenciar la germinación de esporas, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos, comprendiendo el medio de cultivo caldo nutriente (NB), agar nutriente (NA), caldo Luria-Bertani (LB), caldo de ajuste catiónico de Mueller-Hinton (MH), caldo de esporulación, agar de eosina-azul de metileno (EMB), levadura y moho (YM), agar sangre, agar de MacConkey, agar entérico de Hektoen (HE), agar de sal de manitol (MSA), caldo formidable (TB), desoxicolato de lisina de xilosa (XLD), caldo RPMI-1640, caldos mínimos, caldos a base de melaza, agar de extracto

de levadura en carbón tamponado, o combinaciones o modificaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la composición es añadida al medio de cultivo a una concentración que oscila de 0,01%-15%, 0,5%-10% o 1%-5%. En otro aspecto, el extracto es creado por un procedimiento que comprende las etapas de: batir la fruta con agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla homogénea; centrifugar la mezcla para separar el sobrenadante y el sedimento, desechándose el sedimento y tomándose el sobrenadante para un procesamiento adicional; esterilizar el sobrenadante; llevar a cabo una segunda centrifugación, si es necesario, en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y purificar el sobrenadante esterilizado por un procedimiento de filtración por membrana, dando lugar la filtración por membrana al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos. En un aspecto, el procedimiento comprende, además, la etapa adicional de procesar el extracto con los uno o más componentes activos mediante una o más técnicas seleccionadas entre liofilización, centrifugación al vacío, secado por pulverización o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, la fracción que comprende los componentes activos comprende uno o más componentes activos en el intervalo de pesos moleculares de 250-1.000 daltones. En otro aspecto, el procedimiento de filtración por membrana se lleva a cabo usando un sistema de filtración por membrana laminar plana o de fibras huecas, una membrana tubular, enrollada en espiral, de fibra hueca, a presión, sumergida o cerámica. En otro aspecto, el fruto es madurado y luego congelado antes de su procesamiento.

Se da a conocer un procedimiento para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de una o más cepas bacterianas, cepas de levadura o ambas que comprende las etapas de: proporcionar al medio de fermentación o de cultivo un medio de fermentación o de cultivo para el cultivo o el desarrollo de las una o más bacterias, levaduras o ambas que comprende un extracto obtenido de uno o más plátanos o plátanos macho; añadir un inóculo o esporas de las una o más cepas bacterianas, cepas de levadura o ambas; y monitorizar el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de una o más cepas bacterianas, cepas de levadura o ambas. En un aspecto, las cepas bacterianas, las cepas de levadura o ambas en el inóculo comprenden cepas desconocidas o cepas previamente catalogadas. En otro aspecto, el procedimiento comprende, además, las etapas opcionales de: aislar las una o más cepas bacterianas, cepas de levadura o ambas del medio de fermentación o de cultivo; separar o aislar los metabolitos de las cepas bacterianas, las cepas de levadura o ambas; llevar a cabo una catalogación genética para identificar una o más cepas desconocidas a partir de las cepas bacterianas, las cepas de levadura o ambas. En un aspecto, la cepa bacteriana es una especie *Bacillus*. En otro aspecto, la cepa de levadura es una especie *Saccharomyces*. En otro aspecto, los metabolitos comprenden proteínas, antibióticos, lípidos, tensioactivos, azúcares, alcoholes o combinaciones cualesquiera de los mismos. En otro aspecto, el extracto se crea mediante un procedimiento que comprende las etapas de: proporcionar uno o más plátanos o plátanos macho; preparar los plátanos o plátanos macho para su procesamiento mediante un procedimiento que comprende las etapas de: inspeccionar los plátanos o plátanos macho en busca de cualquier porción que presente decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; cortar y desechar cualquier porción de los plátanos o plátanos macho que presente decoloración, magulladuras, desarrollo microbiano, estrés ambiental o combinaciones cualesquiera de los mismos; cortar y desechar los extremos de los plátanos o plátanos macho; poner los plátanos o plátanos macho en una batidora o un robot de cocina junto con agua destilada; batir los plátanos o plátanos macho con el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla homogénea; centrifugar la mezcla para separar el sobrenadante y el sedimento, desechándose el sedimento y tomándose el sobrenadante para un procesamiento adicional; esterilizar el sobrenadante; llevar a cabo una segunda centrifugación, si es necesario, en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y purificar el sobrenadante esterilizado por un procedimiento de filtración por membrana laminar plana o de fibras huecas, dando lugar la filtración por membrana al aislamiento de una fracción del sobrenadante de un intervalo deseado de pesos moleculares que comprende uno o más componentes activos responsables de la promoción o el potenciamiento de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de los uno o más microorganismos. En otro aspecto, el inóculo de los microorganismos es subóptimo. En otro aspecto, los microorganismos comprenden microorganismos viables, pero no cultivables (VBNC). En otro aspecto, el inóculo comprende los uno o más microorganismos en una fase de latencia o una fase exponencial de un ciclo de desarrollo microbiano. En otro aspecto, el fruto es madurado y luego congelado antes de su procesamiento.

Descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de las características y las ventajas de la presente invención, se hace referencia ahora a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas, y en las cuales:

la FIGURA 1 es una fotografía que muestra la diferencia visual entre la materia prima inicial (tubo izquierdo) y el aspecto tras la TFF usando un filtro de corte de peso molecular de 1.000 (MWCO) (tubo derecho);

la FIGURA 2 muestra la actividad de promoción bacteriana en ensayo de desarrollo bacteriano basado en el *Bacillus subtilis*;

la FIGURA 3 demuestra la capacidad de concentraciones crecientes de BACLYTE™ para aumentar la germinación de esporas de *B. thuringiensis* obtenidas de una colección de cultivos mantenida por una universidad estatal en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ según realizaciones de la divulgación;

5 la FIGURA 4 demuestra la capacidad del BACLYTE™ de aumentar la germinación de esporas de *B. subtilis* obtenidas de una fuente de una colección federal de cultivos en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ según realizaciones de la divulgación;

10 la FIGURA 5 demuestra la capacidad del BACLYTE™ en tres medios microbiológicos diferentes para aumentar la germinación de esporas de *B. subtilis* obtenidas de una colección federal de cultivos en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ de los tres medios microbiológicos diferentes según realizaciones de la divulgación;

15 la FIGURA 6 demuestra la capacidad del BACLYTE™ para aumentar la germinación de esporas de *B. subtilis* obtenidas de una preparación convencional de laboratorio en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ según realizaciones de la divulgación;

20 la FIGURA 7 demuestra la capacidad del BACLYTE™ para aumentar la germinación de esporas de *B. thuringiensis* obtenidas de una preparación convencional de laboratorio en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ según realizaciones de la divulgación;

25 la FIGURA 8 demuestra la capacidad del BACLYTE™ para aumentar la germinación de esporas de *B. subtilis* obtenidas de una colección de cultivos mantenida por una universidad estatal en una colección de medios a base de agar en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ según realizaciones de la divulgación;

30 la FIGURA 9 demuestra la capacidad del BACLYTE™ para aumentar la germinación de esporas de *B. amyloliquefaciens* obtenidas de una colección de cultivos mantenida por una universidad estatal en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ según realizaciones de la divulgación;

35 la FIGURA 10 demuestra la capacidad del BACLYTE™ para aumentar la germinación de esporas de *B. licheniformis* obtenidas de una colección de cultivos mantenida por una universidad estatal en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ según realizaciones de la divulgación;

la FIGURA 11 demuestra la capacidad del BACLYTE™ en caldo RPMI-1640 para aumentar el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ del caldo según realizaciones de la divulgación; y

40 la FIGURA 12 demuestra la capacidad del BACLYTE™ en un caldo a base de melaza para aumentar el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 en un medio líquido en comparación con ausencia de suplementación ("Puro") con BACLYTE™ del caldo microbiológico según realizaciones de la divulgación;

45 la FIGURA 13 muestra la capacidad de diferentes preparaciones de BACLYTE™ preparadas a partir de plátanos Cavendish pasados que habían sido congelados a dos temperaturas diferentes o no y luego descongelados antes de su procesamiento con BACLYTE™;

50 la FIGURA 14 muestra la suplementación de esporas de *B. subtilis* con BACLYTE™ secado por pulverización que muestra un aumento en la germinación de esporas reflejado en la mayor D.O. en comparación con las no suplementadas ("PURO").

Descripción de la invención

55 A continuación, para facilitar la comprensión de esta invención, se definen varios términos. Los términos definidos en la presente memoria tienen significados comúnmente entendidos por una persona con un dominio normal de la técnica en áreas relevantes a la presente invención. No se contempla que términos como "un", "una", "el" y "la" se refieran únicamente a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la que puede usarse un ejemplo específico para la ilustración. La terminología es usada en la presente memoria para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, salvo en lo indicado en las reivindicaciones.

60 Según se usa en la presente memoria, el término plátano se refiere al fruto obtenido de cualquier miembro perteneciente al género *Musa*. La expresión "plátano verde" se refiere al aspecto de una piel de plátano con una cantidad de verdor de más del 80%, dura al tacto. La expresión "plátano maduro" se refiere a un plátano que tiene una piel uniformemente amarilla, pocas manchas marrones, firme al tacto. La expresión "plátano pasado" se refiere a una piel de plátano uniformemente marrón, muy blanda al tacto.

La expresión “filtración de flujo tangencial (TFF)” usada en la presente memoria se refiere a un procedimiento en el que se hace que una corriente de alimentación pase tangencialmente sobre una membrana en la que las partículas mayores que el tamaño de los poros de la membrana pasan (fluyen) sobre el filtro y las partículas menores que el tamaño de los poros fluyen a través del filtro y son recogidas como permeado. La metodología también es denominada filtración de flujo cruzado.

Según se usa en la presente memoria, el término “BACLYTE™” o “BACLYTE” se refiere a composiciones de extractos de la presente invención y a realizaciones de las mismas.

Con la presente invención puede usarse una amplia variedad de caldos que son muy conocidos para los expertos en la técnica y enseñados en muchos manuales de referencia de biología molecular, como Maniatis, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, o *Current Protocols In Molecular Biology*, porciones y recetas relevantes de los cuales están incorporadas en la presente memoria por referencia. Un ejemplo de caldo es un caldo “mínimo”, que es un caldo que está generalmente libre de ingredientes complejos, tales como proteínas animales que sean indefinidas. Los caldos mínimos generalmente incluyen sales, una fuente de energía (carbono) y tampones necesarios cualesquiera que sean ajustados para permitir el desarrollo del microorganismo diana y en los que se añade la presente invención.

La presente invención describe un extracto de plátano o de cualquier miembro del género *Musa* (familia *Musaceae*) y un procedimiento de preparación del mismo para ser usado en la potenciación o promoción del desarrollo de bacterias, levaduras u otros microorganismos por sí mismo o como parte de un medio de cultivo. La filtración de flujo tangencial (TFF) es el procedimiento para el procesamiento de la materia prima de la presente invención para potenciar o promover el desarrollo de bacterias, levaduras y otros microorganismos.

Una de las mayores ventajas en el uso del extracto preparado según se ha descrito en lo que antecede (y denominado BACLYTE™) es que puede utilizarse caldo mínimo, lo que hace la tarea de purificación del producto comercialmente disponible a partir de los caldos mucho más fácil y provechosa, dado que pueden eliminarse las etapas necesarias para deshacerse de los ingredientes del caldo. Además, la composición de la presente invención promueve el desarrollo en un caldo que no contiene productos animales, permitiendo por ello que se desarrollen bacterias/levaduras que pueden ser entonces incorporadas, así como los productos que se crean, en productos vegetarianos, que constituyen un mercado enorme. En la actualidad, los fabricantes de productos vegetarianos necesitan resolver problemas asociados con el desarrollo de microbios en caldos que contienen productos de origen animal, y la composición del BACLYTE™ de la presente invención aborda este problema.

El procedimiento de preparación de una materia prima ha sido descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense número 2009/0087517. Se pelaron plátanos Cavendish maduros y las pieles fueron desechadas. El fruto del plátano fue inspeccionado a continuación en busca de decoloración o magulladuras y, si se hallaban, las partes eran cortadas y no usadas. También se cortaron y descartaron los extremos del fruto (una longitud de aproximadamente 0,635 cm). A continuación el fruto fue pesado y puesto en un procesador estándar de alimentos de alta calidad (VitaMix, Cleveland, Ohio). Se añadió al procesador de alimentos un volumen igual de agua destilada, y la mezcla fue batida a la máxima velocidad disponible en la batidora durante 90 segundos. Tras la mezcla, el jugo batido fue vertido en recipientes de centrifugación y centrifugado a 3900 rpm correspondiente a un valor de “fuerza g” de 3230 (velocidad de 3900 rpm y radio de 18 cm). Tras una centrifugación de 30 minutos, el sobrenadante fue recogido en un gran frasco de vidrio de 1L y se descartó el resto sólido en el fondo del recipiente. El sobrenadante fue sometido entonces a un autoclave a una temperatura estándar de autoclave (121°C, 25 minutos, presión de 138 kPa) para lograr la esterilidad.

En consecuencia del sometimiento al autoclave, se produce cierta precipitación en el sobrenadante. Para eliminar este material precipitado, se dejó que el sobrenadante sometido al autoclave se enfriara y luego fue sometido a una ronda de centrifugación según los mismos parámetros para el procesamiento inicial de la fruta batida. El experto en la técnica entenderá que la centrifugación para eliminar la precipitación en el sobrenadante puede no ser siempre necesaria. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue recogido y cualquier resto sólido sedimentado como consecuencia de la centrifugación fue desechado.

Procedimiento de TFF para la preparación de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) a partir de la materia prima: La materia prima procesada según se ha descrito con anterioridad fue cargada en 2 sistemas de TFF diferentes. El primero fue un sistema de TFF de lámina plana fabricado por Pall Corporation (Exton, Pensilvania) y el segundo un sistema de TFF de fibras huecas fabricado por Spectrum Laboratories (Rancho Domínguez, California). El MWCO de los sistemas de filtro oscilaba entre un peso molecular de 1000 y 3000. La muestra fue aplicada directamente a los sistemas de TFF según las especificaciones del fabricante y sometida a la presión recomendada para la membrana de TFF particular. El material que contenía el permeado fue recogido durante la tanda de separación. La FIGURA 1 muestra la diferencia visual entre la materia prima inicial (tubo izquierdo) y el aspecto tras la TFF usando un filtro de MWCO de 1.000 (tubo derecho). Para catalogar adicionalmente las diferencias químicas entre estas preparaciones, se llevaron a cabo análisis químicos usando una batería de ensayos analíticos efectuados por SDK Laboratories (Hutchinson, Kansas), según se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados del análisis químico en muestras antes y después de la prep. por TFF

Análisis	Tubo nº 1 (antes de la prep. por TFF)	Tubo nº 2 (después de la prep. por TFF)
Materia seca	4,90%	2,90%
Proteína, en bruto	0,35%	0,11%
Ceniza	1,04%	Menos del 0,1%
Calorías	15	12
Hidratos de carbono	4	3
Potasio	0,17%	0,10%
Magnesio	0,02%	0,01%
Cobre	0,41 ppm	Menos de 0,2 ppm
Hierro	0,91 ppm	0,42 ppm
Manganeso	0,52 ppm	0,32 ppm
Brix	10,40 s.u.	6,50 s.u.
Vitamina C	15,8 mg/100 ml	2,7 mg/100 ml

A continuación, las preparaciones mostradas en la FIGURA 1 fueron sometidas a ensayo en busca de su actividad de promoción bacteriana en un ensayo de desarrollo bacteriano basado en el *Bacillus subtilis* (FIGURA 2). Según se muestra en la FIGURA 2, el permeado de 1000 daltones fue significativamente mejor en la inducción de la germinación y el desarrollo subsiguiente del *Bacillus subtilis*.

- 5 El trabajo presentado en lo que antecede se llevó a cabo con plátanos verdes, maduros y pasados, demostrando que todas las fases de madurez contienen cantidades significativas de actividad potenciadora de desarrollo bacteriano y de levaduras. Además, parece que los plátanos pasados proporcionan el procedimiento más fácil de preparación, debido a que menos sólidos interfieren en el procedimiento de TFF y, al mismo tiempo, produce la actividad específica más alta por volumen en comparación con otras fases de madurez.
- 10 El trabajo con otros miembros no Cavendish de *Musa*, como los plátanos macho, mostró una capacidad de preparación similar a lo anterior y de obtener fracciones de elevada actividad tras la TFF.

Separación de tamaños para aclarar adicionalmente el intervalo molecular de actividad de máxima potencia: Para definir adicionalmente el intervalo molecular en el que residen las fracciones más activas para potenciar la actividad bacteriana, el permeado de MWCO de 1000 Da fue cargado en cápsulas de diálisis con un MWCO de 500 Da. Se entenderá que, aunque los presentes inventores eligieron fracciones en el intervalo de pesos moleculares de 500-1000 daltones para los estudios de la presente invención, también pueden usarse otras fracciones que tengan intervalos moleculares mayores o menores para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de uno o más microorganismos. Tras una diálisis de un día para otro, el retenido fue sometido a comprobación en un ensayo de desarrollo bacteriano basado en *Bacillus subtilis*. Los resultados mostrados en la FIGURA 2 demuestran que la mayoría de la actividad reside en una ventana de tamaños moleculares de aproximadamente 500-1000 Da MWCO. Una vez que se obtiene el permeado de TFF, puede ser concentrado adicionalmente mediante el uso de centrifugación al vacío y/o liofilización seguido por su reconstitución en un volumen mínimo de agua. Esto producirá una actividad de potenciación específica de desarrollo bacteriano/de levaduras más altamente concentrada por volumen que el volumen original del permeado. Otros procedimientos que pueden ser empleados incluyen, sin limitación, el secado por pulverización.

El extracto preparado según se ha descrito en lo que antecede promueve o potencia la germinación de esporas bacterianas, el desarrollo bacteriano y el desarrollo de otros microorganismos, incluyendo levaduras y otras especies fúngicas, como se ilustra en los ejemplos presentados a continuación. Debe señalarse que, en todos estos ejemplos presentados en la presente memoria, se usa un inóculo bajo del microbio. Actualmente, se usan generalmente dosis elevadas de microbios para poner el proceso en marcha. La ventaja de usar cantidades bajas de microbios es que habrá ahorros significativos para las empresas que produzcan el inóculo, ya que el BACLYTE™ puede ser empaquetado con el producto, aumentando con ello los márgenes de ingresos del producto y logrando mayores ahorros en costes. El experto en la técnica comprenderá que cabe esperar que los resultados presentados en lo que sigue para las bajas cantidades de microbios se apliquen para las dosis de inóculo más elevadas.

EJEMPLO I. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) se emplearon para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus*. Las esporas de especies *Bacillus* pueden obtenerse de colecciones de universidades estatales, tales como el Centro de Reservas Genéticas de *Bacillus* en la Universidad Estatal de Ohio (Columbus, Ohio) en forma de discos de filtro impregnados con esporas. Se colocó un disco de filtro individual impregnado con esporas que contenía las esporas de *Bacillus* de la especie *Bacillus thuringiensis* (Centro de Reservas Genéticas de *Bacillus* (BGSC), Universidad Estatal de Ohio, Columbus, Ohio, catálogo 4A3) en dos mililitros de agua destilada estéril a temperatura ambiente. A continuación, el disco fue agitado mediante vórtice a alta velocidad durante unos segundos cada minuto durante cinco minutos para desprender en la solución las esporas del disco. A continuación, se retiraron del tubo partes alícuotas de diez microlitros de la solución que contenía las esporas y se las introdujo en tubos separados que contenían diez mililitros de caldo Luria-Bertani (caldo LB) que había sido complementado ya fuera con diluyente ("Puro"), una concentración final del uno por ciento de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™), una concentración final del dos y medio por ciento de las

composiciones de la presente invención (BACLYTE™) o una concentración final del cinco por ciento de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™). A continuación, los tubos fueron lavados a fondo usando un mezclador vorticial y se pipetearon seis mililitros de cada tubo en cuadrantes individuales de una placa de Petri con cuadrantes en X. La placa de Petri fue incubada a continuación en una incubadora a 37°C que estaba humectada con una humedad relativa del 85% usando agua destilada como fuente de humedad. El crecimiento de los cuadrantes individuales fue monitorizado usando un sistema de documentación basado en cámaras que capturaba imágenes del desarrollo a intervalos definidos según un programa de soporte lógico (UVP ColonyDoc-It™ Imaging Station). En la FIGURA 3 se muestra una captura representativa de imágenes 22,75 horas tras el inicio de la incubación. Según se ve en la FIGURA 3, las concentraciones crecientes de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dieron lugar a una mayor cantidad de germinación de esporas en un desarrollo vegetativo (en crecimiento) de *B. thuringiensis*, puesto de manifiesto por la mayor opacidad del líquido en los cuadrantes en comparación con el cultivo sin BACLYTE™ (o "Puro").

EJEMPLO II. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) se emplearon para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus*. Las esporas de especies *Bacillus* pueden obtenerse de empresas comerciales de suministros, como Microbiologics (St. Cloud, Minnesota) en forma de gránulos liofilizados, como los del producto LYFO DISK®. Se extrajo un único gránulo liofilizado de *Bacillus coagulans* del producto nº 7050 de LYFO DISK® del frasco del fabricante y se lo colocó en un tubito estéril de plástico. Según las instrucciones del fabricante, se añadieron 0,5 ml de solución salina estéril al tubo que contenía el gránulo de esporas y el gránulo fue triturado usando un hisopo estéril. A continuación, se extrajeron 0,1 ml de la suspensión de esporas y fueron añadidos a 3,9 ml de caldo nutriente (NB) que contenía ya fuera diluyente ("Puro") o las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) a una concentración final del 1%, el 2,5% o el 5%. Tras la mezcla completa de todos los tubos, se extrajeron alícuotas de 0,2 ml y fueron colocadas en pocillos de fondo plano de una placa de 96 pocillos estériles. A continuación, la placa fue colocada en una incubadora a 37°C y retirada a las 48 horas para medir cambios en la densidad óptica (D.O.) de los pocillos de cultivo usando un lector de microplacas regulado a una longitud de onda de 600 nm (BioTek, Winooski, Vermont). Según se muestra en la Tabla 2, la suplementación del NB con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dio lugar a la mayor germinación de las esporas de *B. Coagulans*, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) con respecto a los no suplementados ("Puros").

Tabla 2: Capacidad de las concentraciones crecientes de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) de aumentar la germinación de esporas de *B. coagulans* obtenidas de una fuente comercial de una colección de cultivos con respecto a la ausencia de suplementación con BACLYTE™ ("Puro").

Suplementación del tubo	D.O. (580 nm)
Puro	0,104
1,0% BACLYTE™	0,334
2,5% BACLYTE™	0,452
5,0% BACLYTE™	0,357

EJEMPLO III. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) pueden emplearse para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus*. Las esporas de especies *Bacillus* pueden obtenerse de colecciones federales de cultivos como la USDA ARS Collection, también denominada Northern Regional Research Laboratory Collection, en forma de ampollas selladas que contienen esporas.

Se serró una ampolla individual de vidrio que contenía un disco de filtro impregnado que contenía esporas de la especie de *Bacillus subtilis* (NRRL catálogo B21974) con un cortador de vidrio para retirar la parte superior de la ampolla. A continuación, el contenido con esporas de la ampolla fue puesto en un tubito estéril de plástico y se añadió 1 ml de solución salina para rehidratar el gránulo. Tras una mezcla vigorosa, se extrajeron del tubo alícuotas de 0,1 ml y fueron añadidas a 9,9 ml de caldo LB que contenía diluyente ("Puro") o las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) a una concentración final del 1,5%. Acto seguido, ambos tubos fueron mezclados a fondo usando un mezclador vorticial y se pusieron 8 ml de cada tubo individualmente en un cuadrante separado de una placa de Petri con cuadrantes en X. La placa de Petri fue incubada a continuación en una incubadora a 37°C que estaba humectada con una humedad relativa del 85% usando agua destilada como fuente de humedad. El crecimiento de los cuadrantes individuales fue monitorizado usando un sistema de documentación basado en cámaras que capturaba imágenes del desarrollo a intervalos definidos según un programa de soporte lógico (UVP ColonyDoc-It™ Imaging Station). En la FIGURA 4 se muestra una captura representativa de imágenes 12,75 horas tras el inicio de la incubación. Según se ve en la FIGURA 4, la presencia de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) aumentó muchísimo la germinación de esporas en un desarrollo vegetativo (en crecimiento) del *Bacillus subtilis*, puesto de manifiesto por el crecimiento denso y exuberante en comparación con el cultivo sin BACLYTE™ (o "Puro").

EJEMPLO IV. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) pueden emplearse para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus*. Las esporas de especies *Bacillus* pueden obtenerse de colecciones federales de cultivos como la USDA ARS Collection, también denominada Northern Regional Research Laboratory Collection, en forma de ampollas selladas que contienen esporas. Se serró una ampolla individual de vidrio que

contenía un disco de filtro impregnado que contenía esporas de la especie de *Bacillus subtilis* (NRRL catálogo B21974) con un cortador de vidrio para retirar la parte superior de la ampolla. A continuación, el contenido con esporas de la ampolla fue puesto en un tubito estéril de plástico y se añadió 1 ml de solución salina para rehidratar el gránulo. Tras una mezcla vigorosa, se extrajeron del tubo alícuotas de 0,1 ml y fueron añadidas a 9,9 ml ya fuera de caldo LB, NB o caldo de ajuste catiónico de Mueller-Hinton (MH). Se añadieron 2,5 microlitros ya fuera de diluyente ("Puro") o las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) a una placa aplanada de 100 pocillos de fondo plano. A continuación, se añadieron a los pocillos 195 microlitros de LB, NB o MH que contenía *B. subtilis* NRRL nº B21974, y la placa fue colocada en un analizador microbiológico capaz de una medición continua de la D.O. de pocillos individuales en momentos especificados con control de la temperatura y de la agitación (Bioscreen, Growth Curves USA, Haverhill, Massachusetts). La placa fue incubada en el analizador microbiológico Bioscreen a 37°C con agitación antes de la medición de la D.O. durante 24 horas. Según se muestra en la FIGURA 5, la suplementación de LB, NB o MH con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dio lugar a la mayor germinación de las esporas, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en comparación con las no suplementadas ("Puro").

EJEMPLO V. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) pueden emplearse para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus* que pueden ser obtenidas de cultivos vegetativos que han sido cultivados en un caldo convencional de esporulación que es usado comúnmente para preparar esporas. Se inoculó un mililitro de un cultivo de caldo LB de un día de antigüedad de bacterias vegetativas de cultivos de *Bacillus thuringiensis* (BGSC catálogo 4A3) y NRRL *B. subtilis* (NRRL catálogo B21974) en 50 ml de caldo de esporulación (HiMedia, Bombay, India) en un frasco de 100 ml. A continuación, el frasco fue puesto en un baño de agua con agitador a 37°C y fue rotado a aproximadamente 100 rpm durante 5 días. Tras 5 días de incubación, el contenido fue extraído del frasco y centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos a 18°C para sedimentar las bacterias. A continuación, el sedimento bacteriano fue resuspendido en 20 ml de solución salina y luego calentado hasta 70°C durante 30 minutos para destruir cualquier célula vegetativa, dejando intactas únicamente las esporas. De esta suspensión de esporas, se extrajeron 20 microlitros y fueron añadidos a 20 ml de LB y mezclados a fondo. Se añadieron 300 microlitros de LB que contenía esporas de *B. thuringiensis* (BGSC catálogo 4A3) al pocillo apropiado de una placa aplanada de 100 pocillos de fondo plano. A continuación, se añadieron a los pocillos apropiados que contenían esporas en LB ya fuera diluyente ("Puro") o las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) para dar una concentración final del 5%. A continuación, la placa fue colocada en un analizador microbiológico capaz de una medición continua de la D.O. de pocillos individuales en momentos especificados con control de la temperatura y de la agitación (Bioscreen, Growth Curves USA, Haverhill, Massachusetts). La placa fue incubada en el analizador microbiológico Bioscreen a 37°C con agitación antes de la medición de la D.O. durante 24 horas para *B. subtilis* y de 48 horas para *B. thuringiensis*. Según se muestra en la FIGURA 6, la suplementación de esporas de *B. subtilis* con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dio lugar a la mayor germinación de las esporas, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en comparación con las no suplementadas ("Puro"). Además, según se muestra en la FIGURA 7, la suplementación de esporas de *B. thuringiensis* con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) también dio lugar a la mayor germinación de las esporas, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en comparación con las no suplementadas ("Puro").

EJEMPLO VI. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) pueden emplearse para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus*. Las esporas de especies *Bacillus* pueden obtenerse de colecciones de universidades estatales, tales como el Centro de Reservas Genéticas de *Bacillus* en la Universidad Estatal de Ohio (Columbus, Ohio) en forma de discos de filtro impregnados con esporas. Se colocó un disco de filtro individual impregnado con esporas que contenía las esporas de *Bacillus* de la especie *Bacillus subtilis* (BGSC catálogo 1A698) en 2 ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente. A continuación, el disco fue agitado mediante vórtice a alta velocidad durante unos segundos cada minuto durante 5 minutos para desprender en la solución las esporas del disco. A continuación, se retiraron del tubo partes alícuotas de cien microlitros de la solución que contenía las esporas y se las introdujo en tubos separados, cada uno de los cuales contenía 9,9 ml de agar nutriente (NA) fundido (52°C) que había sido suplementado ya fuera con diluyente ("Puro"), una concentración final del 1% de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™), una concentración final del 2,5% de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) o una concentración final del 5% de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™). A continuación, los tubos fueron lavados a fondo usando un mezclador vortical y se vertió el contenido de cada tubo en cuadrantes individuales de una placa de Petri con cuadrantes en X. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, durante los cuales el agar fundido se endureció, dando lugar a agar sólido, la placa de Petri fue incubada a continuación en una incubadora a 37°C que estaba humectada con una humedad relativa del 80% usando agua destilada como fuente de humedad. El crecimiento de los cuadrantes individuales fue monitorizado usando un sistema de documentación basado en cámaras que capturaba imágenes del desarrollo a intervalos definidos según un programa de soporte lógico (UVP ColonyDoc-It™ Imaging Station). En la FIGURA 8 se muestra una captura representativa de imágenes 15 horas tras el inicio de la incubación. Según se ve en la FIGURA 8, las concentraciones crecientes de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dieron lugar a una mayor cantidad mucho mayor de germinación de esporas en un desarrollo vegetativo (en crecimiento) de *Bacillus subtilis*, puesto de manifiesto por la mayor opacidad del líquido en los cuadrantes con agar en comparación con el cultivo sin BACLYTE™ (o "Puro").

EJEMPLO VII. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) pueden emplearse para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus* para un uso directo en cultivos de fermentación que pueden obtenerse de cultivos de esporas en reservas preparadas en laboratorios. Se inoculó un mililitro de un cultivo de caldo LB de un día de antigüedad de bacterias vegetativas de cultivos de *Bacillus subtilis* (NRRL catálogo B21974) en 50 ml de caldo de esporulación (HiMedia, Bombay, India) en un frasco de 100 ml. A continuación, el frasco fue puesto en un baño de agua con agitador a 37°C y fue rotado a aproximadamente 100 rpm durante 5 días. Tras 5 días de incubación, el contenido fue extraído del frasco y centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos a 18°C para sedimentar las bacterias. A continuación, el sedimento bacteriano fue resuspendido en 20 ml de solución salina y luego calentado hasta 70°C durante 30 minutos para destruir cualquier célula vegetativa, dejando intactas únicamente las esporas.

De esta suspensión de esporas, se extrajeron alícuotas de 50 microlitros de la solución que contenía las esporas y fueron introducidos en frascos separados de fermentación, cada uno de los cuales contenía 50 ml de caldo LB que habían sido suplementados ya fuera con diluyente ("Puro") o con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) para dar una concentración final del 2,5%. A continuación, los frascos fueron colocados en un baño de agua con agitador a 37°C y fue rotado a aproximadamente 100 rpm durante 18,5 horas. Al inicio y el fin del periodo de incubación, se extrajeron alícuotas de 0,2 ml y fueron puestas en pocillos de fondo plano de una placa estéril de 96 pocillos. A continuación, la placa fue colocada en un lector de microplacas regulado a una longitud de onda de 600 nm (BioTek, Winooski, Vermont) para medir cambios en la densidad óptica (D.O.) de los pocillos de cultivo. Según se muestra en la Tabla 3, la suplementación del LB con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dio lugar a la mayor germinación de las esporas durante el curso de la fermentación, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) con respecto a los no suplementados ("Puros").

Tabla 3: Capacidad de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) para aumentar la germinación de esporas de *B. subtilis* empleadas directamente en un sistema de cultivos de fermentación con respecto a la ausencia de suplementación con BACLYTE™ ("Puro").

Suplementación de la fermentación	D.O. (600 nm) al inicio	D.O. (600 nm) tras 18,5 horas
Puro	0,045	0,889
2,5% BACLYTE™	0,051	1,137

EJEMPLO VIII. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) pueden emplearse para aumentar la germinación de esporas de especies *Bacillus*. Las esporas de especies *Bacillus* pueden ser obtenidas de colecciones de universidades estatales, tales como el Centro de Reservas Genéticas de *Bacillus* en la Universidad Estatal de Ohio (Columbus, Ohio) en forma de discos de filtro impregnados con esporas. Se colocó un disco de filtro individual impregnado con esporas que contenía ya fuera las esporas de *Bacillus* de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* (BGSC catálogo 10A18) o *Bacillus licheniformis* (BGSC catálogo 5A37) en tubos individuales de 2 mililitros de agua destilada estéril a temperatura ambiente. A continuación, los discos se agitaron mediante vórtice a alta velocidad durante unos segundos cada minuto durante 5 minutos para desprender en la solución las esporas del disco. Se retiraron de esta suspensión de esporas 100 microlitros y se los añadió a 9,9 ml de LB y se mezclaron a fondo. En una placa aplanada de 100 pocillos de fondo plano se añadieron alícuotas de 300 microlitros de LB que contenía esporas de *B. amyloliquefaciens* y de LB que contenía esporas de *B. licheniformis* a pocillos apropiados que contenían ya fuera diluyente ("Puro") o las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) para dar una concentración final del 5%. A continuación, la placa fue colocada en un analizador microbiológico capaz de una medición continua de la D.O. de pocillos individuales en momentos especificados con control de la temperatura y de la agitación (Bioscreen, Growth Curves USA, Haverhill, Massachusetts). La placa fue incubada en el analizador microbiológico Bioscreen a 37°C con agitación antes de la medición de la D.O. a una longitud de onda de 600 nm y monitorizada durante 24 horas. Según se muestra en la FIGURA 9, la suplementación de esporas de *B. amyloliquefaciens* con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dio lugar a la mayor germinación de las esporas, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en comparación con las no suplementadas ("Puro"). Además, según se muestra en la FIGURA 10, la suplementación de esporas de *B. licheniformis* con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) también dio lugar a la mayor germinación de las esporas, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) con respecto a los no suplementados ("Puros").

EJEMPLO IX. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) pueden emplearse en estudios de desarrollo de levaduras. Se colocaron aproximadamente 0,35 g de *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 obtenida de Lallemand (Montreal, Canadá) en un tubo de polipropileno de 50 ml y se añadieron 10 ml de agua doblemente destilada (DDW). A continuación, el contenido del tubo fue mezclado a fondo. Tras dejar reposar durante 10 minutos con una agitación suave intermitente del contenido del tubo cada 2-3 minutos, se añadieron 20 microlitros de la suspensión de *S. cerevisiae* K1-V1116 a 20 ml de caldo RPMI-1640 sin rojo de fenol y sin L-glutamina (Lonza catálogo nº 12-918F, Lonza, Walkersville, Maryland) y se añadieron 20 microlitros en 20 ml de un caldo de melaza al 10%. El caldo de melaza al 10% fue creado mezclando 2,5 ml de melaza (Grandma's Original Molasses, Gold Label, B&G Foods, Parsippany, Nueva York) con 22,5 ml de DDW. A continuación, en una placa aplanada de 100 pocillos

de fondo plano se añadieron 300 microlitros de RPMI-1640 que contenía *S. cerevisiae* K1-V1116 o 300 microlitros de RPMI-1640 (RPMI-1640 sin rojo de fenol y sin L-glutamina, Lonza catálogo nº 12-918F, Lonza, Walkersville, Maryland) con un 10% de melaza que contenía *S. cerevisiae* K1-V1116 a pocillos apropiados. El RPMI-1640 es un caldo definido no empleado rutinariamente para el crecimiento de levadura, ya que no soporta bien el crecimiento.

La capacidad de cultivar levadura en tal caldo sería ventajosa, ya que simplificaría la extracción y la purificación de productos que la levadura puede producir en el cultivo. El caldo a base de melaza es un caldo normalmente empleado para el cultivo de levadura. A continuación, se añadieron ya fueran diluyente ("Puro") o las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) para dar una concentración final del 1 o el 5% a pocillos apropiados que contenían *S. cerevisiae* K1-V1116 ya fuera en RPMI-1640 o en melaza al 10%. A continuación, la placa fue colocada en un analizador microbiológico capaz de una medición continua de la D.O. de pocillos individuales en momentos especificados con control de la temperatura y de la agitación (Bioscreen, Growth Curves USA, Haverhill, Massachusetts). La placa fue incubada en el analizador microbiológico Bioscreen a 30°C con agitación antes de la medición de la D.O. y monitorizada durante 24 horas. Según se muestra en las FIGURAS 11 y 12, la suplementación de *S. cerevisiae* K1-V1116 con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) dio lugar a la mayor tasa de desarrollo, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en comparación con las no suplementadas ("Puro").

Resultará claro por las FIGURAS 11 y 12 que la promoción del desarrollo con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) con un tamaño pequeño de inóculo, que ofrece considerables ventajas económicas y de producción, según se ha descrito previamente. El caldo RPMI-1640 que se usa en la FIGURA 11 no es el medio normal de cultivo para la levadura, aunque sería muy deseable usar RPMI-1640 o un caldo similar para cultivar levadura, ya que no hay proteínas en el caldo que interfieran con el procesamiento aguas abajo del componente de interés que pueda fabricar la levadura. Las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) hacen posible cultivar levadura o que se desarrollen otras especies similares en RPMI o un caldo similar en los que no se espera que se desarrollen en circunstancias normales.

La ventaja de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en el cultivo de levadura se ve adicionalmente en la FIGURA 12, pues está en un caldo a base de melaza, que debería soportar un buen desarrollo del cultivo PURO. Sin embargo, la cepa aquí usada es una cepa de vino y puede no ser como la levadura; sin embargo, en presencia de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™), muestra un desarrollo sumamente bueno.

EJEMPLO X. Preparación que implica plátanos congelados. Una modificación adicional del protocolo de procesamiento para la preparación de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) es el uso de plátanos que son congelados primero de un día para otro y luego descongelados antes de su uso en el protocolo de preparación de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™). El experto reconocerá, basándose en las enseñanzas de esta solicitud, que con la presente invención pueden usarse otras fuentes de plátano (o fruto) congelado y de extractos de plátano (o fruto) congelado; por ejemplo, plátanos congelados instantáneamente, copos de plátano, puré de plátano y plátanos liofilizados u otras frutas. Los plátanos descongelados, previamente congelados, producen una textura mucho más blanda, con evidente liberación de líquido de su estructura, dándoles la característica textura pastosa, prestándose con ello a un procesamiento más fácil y a la extracción de una cantidad mayor del material activo de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™). Para los datos mostrados en la FIGURA 13, se dejó que maduraran a temperatura ambiente plátanos de Cavendish hasta una fase en la que estaban pasados, según se ha definido en la divulgación. Una vez que se había logrado la fase plenamente pasada, los plátanos fueron dejados a temperatura ambiente o puestos en un congelador a -20°C o a -80°C durante 24 horas. En este ejemplo, después de que finalizara el periodo de congelación de 24 horas, los plátanos fueron sacados de los congeladores y se dejó que se descongelaran completamente; por ejemplo, a temperatura ambiente (sin embargo, también puede usarse una congelación a otras temperaturas; por ejemplo, a 4°C) o incluso calentando directamente el plátano congelado (con la piel o sin ella) sumergiéndolo en líquido, en un horno, en un horno de microondas, un horno de infrarrojos, que aumenten la velocidad de descongelación; por ejemplo, hasta 25°C, 37°C, 40°C o incluso 45°C. Sin embargo, es posible congelar a otras temperaturas y/o acortar el tiempo que tardan en congelarse los plátanos, congelándolos, por ejemplo, en nitrógeno líquido durante unos segundos hasta minutos. A continuación, la piel blanda se desprendió con facilidad y el interior pastoso fue procesado para preparar las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) según se ha descrito en lo que antecede. Acto seguido, las composiciones resultantes de la preparación de la presente invención (BACLYTE™) fueron sometidas a ensayo, según se muestra en la FIGURA 13, para encontrar su capacidad de aumento de la germinación de esporas de *B. subtilis*.

La FIGURA 13 demuestra la capacidad de diferentes preparaciones de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) preparadas a partir de plátanos de Cavendish pasados que habían sido congelados a dos temperaturas diferentes o no, y luego descongelados antes de su procesamiento para las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) para aumentar la germinación de esporas de *B. subtilis* B29174 obtenidas de una colección de cultivos mantenidos en una universidad estatal (BGCS) en un caldo líquido en comparación con ausencia de suplementación con BACLYTE™ ("Puro") según realizaciones de la divulgación. Según se muestra en la FIGURA 13, hubo un aumento significativo en el desarrollo en comparación con el control puro. Específicamente, se halló que, a medida que la temperatura disminuye, aumenta la producción del material activo. Este ejemplo

demuestra que la presente invención puede usar plátanos congelados que son luego descongelados, haciendo el proceso más fácil, aumentando la producción del material de partida para aumentar la producción total de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™). El proceso puede ser duplicado fácilmente en circunstancias en las que no hay disponible o no es funcional un equipo de coste elevado. La FIGURA 13 también muestra que el ciclo de congelación y descongelación no afectó a la calidad total (mostrada por la capacidad de influir en la germinación de las esporas) de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™), sino que, sorprendentemente, aumentó el efecto del material en la germinación de las esporas.

Los presentes inventores descubrieron que el uso del procedimiento y de la composición de la presente invención permite al usuario, por vez primera, usar un caldo mínimo que simplifique la purificación de productos comercialmente valiosos fuera de los medios en los que se cultivan. Usando las composiciones y los procedimientos de la presente invención, el proceso de eliminación de caldos contaminantes del ingrediente activo es más fácil y elimina muchas etapas necesarias para purificar el producto final. También es posible, usando la presente invención, usar caldos subóptimos para cultivar los microbios de una manera equivalente o mayor que los caldos existentes, que contienen muchos más componentes. Así, un caldo mínimo por lo demás, se convierte en un caldo útil para el desarrollo de microbios usando la presente invención. De hecho, se descubrió que, contra lo que cabía esperar, la cantidad del inóculo se redujo muchísimo sin una pérdida en la producción final o una curva de gran crecimiento comúnmente asociada con un inóculo subóptimo.

Además, se descubrió que las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) promueven el desarrollo en un caldo que no contiene productos de origen animal, lo que significa que puede lograr que se desarrollen bacterias/levaduras que puedan incorporarse, así como los productos que se crean, en productos vegetarianos. Usando un caldo que no contiene ningún producto de origen animal, es posible satisfacer una necesidad sentida desde hace mucho en la industria del cultivo de microbios de una forma eficaz en un caldo que no contenga productos de origen animal para usados en productos vegetarianos.

La presente invención proporciona el secado por pulverización de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) como una preparación en polvo. Esto muestra la capacidad de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) de ser secadas por pulverización y, así, de poder ser usadas como un polvo, así como un líquido en cualquier aplicación. La presente invención también proporciona la encapsulación de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) con un probiótico. La encapsulación de probióticos es vista como un medio de proteger a los probióticos tanto del entorno exterior como de las duras condiciones del estómago para que puedan llegar a la zona deseada del intestino en un estado fisiológico más robusto. Sin embargo, se buscan continuamente procedimientos para mejorar la viabilidad de los probióticos que se encapsulan. Al poner las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en la cápsula (o perla) en el momento de la encapsulación, se crea un entorno óptimo, especialmente cuando la cápsula (perla), que llega al intestino en el que se disuelve, tiene entonces las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) justo al lado para hacer que se desarrolle inmediatamente.

La presente invención proporciona el secado por pulverización de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) junto con probióticos. En el pasado se ha usado el secado por pulverización de probióticos con resultados variables. La presente invención proporciona un potenciador del desarrollo que, tal como las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) secadas por pulverización junto con el probiótico, da lugar a una recuperación mayor.

La presente invención proporciona una composición (es decir, BACLYTE™) que es procesada adicionalmente usando la desecación por pulverización para producir un polvo activo. La desecación por pulverización de zumos de fruta ricos en azúcar, como los de plátanos, mangos y piñas producen normalmente polvos muy pegajosos debido a un número de variables de procesamiento, tales como la temperatura de transición vítrea (Tg) y la temperatura del punto de adherencia (Ts). Uno de los procedimientos empleados más comúnmente en la industria para producir preparaciones no pegajosas en polvo de zumos de fruta es la adición de componentes de mayor Tg, como la maltodextrina, al zumo antes de la desecación por pulverización. Para la producción de la presente invención como un polvo, se mezclaron 500 ml de líquido de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) con 125 gramos de maltodextrina (Spectrum Chemical Labs, equivalente de dextrosa del 10,5%; concentración final de maltodextrina del 25% p/v). Se logró la completa disolución de la maltodextrina en las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) con un calentamiento suave hasta 37°C durante 15-20 minutos con agitación. A continuación, las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) fueron secadas por pulverización usando un minisecador por pulverización Buchi B-290 con una temperatura de entrada de 141°C y una temperatura de salida de 73°C, dando lugar a un polvo blancuzco no pegajoso.

Se logró el ensayo de la actividad biológica disolviendo el polvo, dando una solución al 1% (p/v) en caldo LB, lo que se logró mediante una rotación ininterrumpida durante aproximadamente 10 minutos, tiempo después del cual el polvo (BACLYTE™) de la presente invención se disolvió completamente en el caldo. A continuación, el caldo LB que contenía la composición de la presente invención fue esterilizado por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,45 micrómetros. Acto seguido, se añadieron esporas de NRRL *B. subtilis* (NRRL catálogo B21974) ya fuera a caldo LB que contenía composiciones de la presente invención (BACLYTE™) o a caldo LB que no contenía BACLYTE™

(PURO) a una proporción de 1 microlitro de suspensión de esporas a 1 ml de caldo. En una placa aplanada de 100 pocillos de fondo plano se añadieron 300 microlitros de cada suspensión y, a continuación, la placa fue colocada en un analizador microbiológico capaz de una medición continua de la D.O. de pocillos individuales en momentos especificados con control de la temperatura y de la agitación (Bioscreen, Growth Curves USA, Haverhill, Massachusetts). La placa fue incubada en el analizador microbiológico Bioscreen a 37°C con agitación antes de la medición de la D.O. durante 24 horas para su desarrollo. Según se muestra en la FIGURA 14, la suplementación de esporas de *B. subtilis* con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) secadas por aspersión dio lugar a la mayor germinación de las esporas, reflejada en la mayor D.O. de los cultivos suplementados con las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en comparación con las no suplementadas ("PURO").

Por ejemplo, la composición de la presente invención puede incluir un recubrimiento que puede ser secado por pulverización. Por ejemplo, puede lograrse un almacenamiento a largo plazo tanto en el entorno industrial como para un uso en entornos clínico y de medicina alternativa a través de la aplicación de técnicas de secado por pulverización de la presente invención. La preparación de probióticos secados por pulverización, tales como *Lactobacillus spp.*, puede beneficiarse del procedimiento de desecación por pulverización si es secada por pulverización en presencia de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™), dado que las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) proporcionarán un entorno que permitirá un almacenamiento prolongado como producto viable, como se pone de manifiesto por una mayor tasa de recuperación tras su uso específico. Se cultivó *Lactobacillus rhamnosus* durante la noche en caldo MRS de lactobacilos hasta una densidad óptica de aproximadamente 10E9 CFU (unidades formadoras de colonias) por ml. Tras lavar 2 veces en PBS, las bacterias fueron añadidas ya fuera a una solución al 10% de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) (10 ml de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en 90 ml de PBS) o a PBS solo (PURO). Tanto las soluciones al 10% de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) como las soluciones PURAS contenían, además, un 10% p/v de maltodextrina. A continuación, las soluciones fueron secadas por pulverización usando un minisecador por pulverización Buchi B-290 con una temperatura de entrada de 151°C y una temperatura de salida de 77°C.

Tras el almacenamiento durante 1 semana a temperatura ambiente de polvos que contenían bacterias, se añadió una suspensión con 0,1 g de cada polvo al caldo MRS de lactobacilos y se incubó durante la noche a 37°C en una atmósfera anaerobia. Tras una incubación de 18 horas, se midió la densidad óptica a 580 nm para cada cultivo. Según se muestra en la Tabla 4, la viabilidad de *L. rhamnosus* aumentó con la adición concomitante de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en el momento del secado por pulverización del probiótico en comparación con PURO.

Tabla 4

Suplementación secada por pulverización	D.O. (580 nm)
PURO	0,134
BACLYTE™	0,567

Para evaluar si la mayor densidad óptica era debida al verdadero desarrollo de *L. rhamnosus* y no a un contaminante adquirido durante el procedimiento de secado por pulverización, se pusieron en placas partes alícuotas de ambas suplementaciones de secado por pulverización sobre agar MRS de lactobacilos. Solo se obtuvo una morfología de colonias coherente con *Lactobacillus sp.*

La composición de la presente invención puede ser encapsulada. Otra técnica que ha sido usada extensamente por la industria para proteger a los probióticos de condiciones ambientales perjudiciales, así como para proporcionar un medio eficaz para soslayar las duras condiciones del estómago y administrar bacterias probióticas a la zona deseada del intestino es a través del uso de la encapsulación. Al rodear o encapsular el probiótico en un recubrimiento que puede ser disuelto posteriormente, puede lograrse un sistema de administración eficaz. El uso de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) como parte del procedimiento de encapsulación, en el que las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) son incorporadas en el volumen interior de la cápsula (perla) junto con el probiótico, puede aumentar la viabilidad del probiótico, potenciando con ello la eficacia general de la técnica de encapsulación. Se cultivó *L. rhamnosus* durante la noche en caldo MRS de lactobacilos hasta una densidad óptica de aproximadamente 10E9 CFU (unidades formadoras de colonias) por ml. Tras lavar 2 veces en PBS, las bacterias fueron añadidas ya fuera a una solución que contenía un 5% de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) y un 2% de alginato sódico o a un 2% de alginato sódico en PBS solo (PURO). El procedimiento de encapsulación es esencialmente el descrito por Zhao y otros, (World J. Microbiol. Biotechnol., volumen 28, páginas 61-70, 2012), con la modificación de que no se usó leche desnatada como parte del proceso y se usó alginato sódico a una concentración del 2%, no el 3%. Tras la introducción del probiótico en las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) o en soluciones PURAS que contenían alginato sódico, las suspensiones fueron extrudidas a continuación a través de una aguja de jeringa de calibre 20 en una solución de CaCl₂ 0,3 M que era agitada continuamente a temperatura ambiente. La encapsulación resultante produjo perlas grandes en las que el probiótico estaba completamente atrapado, ya fuera en PBS (PURO) o en PBS suplementado con un 5% de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™).

Las perlas fueron recogidas y lavadas con agua de peptona tamponada al 0,1% y almacenadas a 4°C. Tras el almacenamiento durante la noche a 4°C, las perlas fueron sometidas a ensayo para encontrar su actividad biológica mediante la inoculación de 0,5 ml de soluciones que contenían perlas en 9,5 ml de caldo MRS de lactobacilos e incubación durante la noche a 37°C en una atmósfera anaerobia. Tras una incubación de 18 horas, se midió la densidad óptica a 580 nm para cada cultivo. Según se muestra en la Tabla 5, la viabilidad de *L. rhamnosus* aumentó con la adición concomitante de las composiciones de la presente invención (BACLYTE™) en el momento de la encapsulación del probiótico en comparación con PURO. Se entenderá que la presente invención puede incluir esporas encapsuladas, bacterias vivas o ambas.

Tabla 5

Suplementación de perlas	D.O. (580 nm)
PURO	0,269
BACLYTE™	1,034

En una realización de la invención, la composición puede ser combinada con uno o más probióticos. El término "probiótico" significa un microorganismo que ejerce efectos beneficiosos en la salud del anfitrión. En esta realización puede ser aceptable cualquier probiótico conocido en la técnica, siempre y cuando logre el resultado previsto. En una realización particular, el probiótico puede ser seleccionado entre las especies de *Lactobacillus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, especies de *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, el género *Saccharomyces*, mohos, especies de *Aspergillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Nelissococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, especies bacterianas patógenas que incluyen, sin limitación, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Campylobacter*, *Peptococcus*, *Helibacter*, *Hemophylus*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Shigella*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Toxoplasmosis* y *Rotavirus*.

Además, la presente invención también puede incluir una o más composiciones prebióticas, además del probiótico, o en lugar del mismo. Prebióticos útiles en la presente invención pueden incluir oligosacáridos, polisacáridos, y otros prebióticos que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa. Más específicamente, prebióticos útiles en la presente invención pueden incluir polidextrosa, polvo de polidextrosa, lactulosa, lactosacarosa, rafinosa, gluco-oligosacárido, inulina, fructo-oligosacárido, isomalto-oligosacárido, oligosacáridos de soja, lactosacarosa, xilo-oligosacárido, quito-oligosacárido, mano-oligosacárido, aribino-oligosacárido, sialil-oligosacárido, fuco-oligosacárido, galacto-oligosacárido y gentio-oligosacáridos.

Además, la presente invención también puede incluir uno o más recubrimientos que protegen o modifican la liberación de la composición recubierta. Por ejemplo, el recubrimiento puede ser un recubrimiento de "liberación inmediata" usado en la presente memoria para describir un perfil de liberación para efectuar la liberación de un activo tan pronto como sea posible —es decir, tan pronto como esté disponible en la práctica para un sujeto—, ya sea en la forma activa, como un precursor y/o como un metabolito. La liberación inmediata también puede ser definida funcionalmente como la liberación de más del 80 al 90 por ciento (%) de la composición en menos de aproximadamente 60, 90, 100 o 120 minutos o menos. La liberación inmediata, tal como se usa en la presente memoria, también puede ser definida por poner el ingrediente activo a disposición del sujeto, independientemente de su asimilación, ya que algunos fármacos pueden no ser nunca absorbidos por el anfitrión. Las formulaciones de liberación inmediata del activo en un vehículo, como perlas enrolladas o comprimidas, pueden ser formuladas de modo que el área se maximice en las perlas y el activo quede al descubierto inmediatamente. Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente diversas posologías de liberación inmediata para lograr la administración del fármaco a la zona, dependiendo de la elección de compresión, de los materiales adhesivos y/o de la formación de perlas.

Por ejemplo, el recubrimiento puede ser un recubrimiento de "liberación prolongada," "liberación controlada" y "liberación retardada" usado para definir un perfil de liberación para efectuar la administración de un activo durante un periodo prolongado de tiempo, aquí definido entre aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 2, 4, 6 o incluso 24 horas. La liberación prolongada también puede ser definida funcionalmente como la liberación de más del 80 al 90 por ciento (%) del ingrediente activo después de aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 2, 4, 6 o incluso 8 horas. La liberación prolongada, según se usa en la presente memoria, también puede ser definida por poner el ingrediente activo a disposición del sujeto, independientemente de su asimilación, ya que algunos fármacos pueden no ser nunca absorbidos por el sujeto. Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente diversas posologías de liberación prolongada y retardada, según se divulga en la presente memoria, para lograr la administración, dependiendo de la elección de los materiales del recubrimiento y/o del grosor del recubrimiento.

Otro ejemplo de una partícula recubierta de la presente invención proporciona una liberación selectiva continua prolongada de la composición por la aplicación de un recubrimiento de barrera de difusión a un complejo de fármaco de intercambio iónico-resina tratado con un solvante. Otra formulación de liberación prolongada de la presente

invención incluye la adición de una segunda sustancia iónica que tiene la misma carga iónica que la composición en el complejo de resina empleando la segunda sustancia iónica en la forma iónica de un complejo de resina de intercambio. La fabricación de una formulación de cualquier composición para un uso posológico líquido o sólido requiere que la formulación final tenga la composición disuelta o suspendida en un líquido que posea una prolongada estabilidad en su vida útil y que no presente cambio alguno en el nivel de dosificación activa en un periodo de tiempo. Así, para preparar una formulación líquida de cualquier tipo de fármaco, puede ser necesario emplear extensores tales como agua o jarabe y añadir aromas, edulcorantes, espesantes, tinciones y similares. Para controlar el perfil de disolución de la formulación en función del perfil de disolución del mismo fármaco en agua, las partículas recubiertas también pueden ser incluidas en presencia de sustancias iónicas que tengan la misma carga iónica que el fármaco de liberación contenida presente en la formulación como un complejo de composición recubierta-resina. No es preciso que el segundo material iónico esté recubierto con el recubrimiento de barrera de difusión permeable al agua.

Los materiales de recubrimiento de barrera de difusión permeable al agua pueden ser cualquiera de los materiales convencionales sintéticos o naturales formadores de películas con propiedades de barrera de difusión y sin ninguna propiedad inherente farmacológica o tóxica. Por ejemplo, puede usarse etilcelulosa, un agente insoluble en agua formador de películas, como material de membrana barrera de difusión. Puede usarse un plastificante (por ejemplo, aceite vegetal Durkex 500) para mejorar las características de formación de películas de la etilcelulosa y/o para alterar las características de permeabilidad de la película. La cantidad de recubrimiento usada depende del grado deseado de prolongación de la liberación del fármaco y es una función del tamaño de las partículas, de la solubilidad del fármaco, de la permeabilidad de la película y de otros factores. Variando la cantidad de recubrimiento y/o mezclando un complejo recubierto de fármaco-resina con un complejo no recubierto de fármaco-resina, y/o mezclando diferentes recubrimientos, es posible modificar selectivamente el perfil de disolución del fármaco de la preparación según se desee.

En general, los componentes principales del recubrimiento deberían ser insolubles en agua y permeables a la misma. Alternativamente, puede incorporarse una sustancia hidrosoluble, tal como metilcelulosa, para alterar la permeabilidad del recubrimiento, o puede usarse una sustancia insoluble en ácidos soluble en bases para que actúe como recubrimiento entérico. Generalmente, la barrera de difusión permeable al agua incluirá un material insoluble en agua, como una cera, un alcohol graso, goma laca, ceína, goma laca, polivinilpirrolidona, un derivado de la celulosa insoluble en agua, etilcelulosa, un polimetacrilato o metilcelulosa. Los materiales de recubrimiento pueden ser aplicados como una solución o suspensión en un fluido acuoso o una solución en disolventes orgánicos. En algunos casos, la presente invención puede incluir una barrera de difusión permeable al agua en contacto con al menos una porción del fármaco activo farmacéuticamente iónico en comunicación con una resina de intercambio iónico.

Además, la presente invención puede incluir otros aditivos usados de manera convencional en composiciones farmacéuticas y conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, antiadherentes, deslizantes, promotores de flujo, lubricantes, talco, estearato de magnesio, sílice pirógena), sílice micronizada, tensioactivos, ceras, ácido esteárico, sales de ácido esteárico, derivados de ácido esteárico, almidón, aceites vegetales hidrogenados, benzoato sódico, acetato sódico, leucina y sulfato laurílico de magnesio.

La presente invención también proporciona una combinación de prebióticos y probióticos junto con la composición de la presente invención que, cuando se combinan, se vuelven sinbióticos. La combinación de prebióticos y probióticos en el mismo producto como un golpe 1-2 ha sido denominada aquí sinbiótica. Esta combinación de prebióticos y probióticos demuestra un poderoso efecto sinérgico sobre los prebióticos o los probióticos por sí solos. Así, la composición de la presente invención puede estar diseñada específicamente para que contenga diferentes componentes que pueden proporcionar un efecto sinbiótico.

El uso de la palabra “un” o “una”, cuando es usada en conjunto con el término “comprender” en las reivindicaciones y/o en la memoria puede significar “uno solo o una sola”, pero también es coherente con el significado de “uno/una o más”, “al menos uno/una” y “uno/una o más de uno/una”.

En toda esta memoria, el término “aproximadamente” es usado para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el procedimiento que se emplee para determinar el valor, o la variación que exista entre los sujetos de estudio.

Según se usan en esta memoria y en las reivindicaciones, las palabras “que comprende” (y cualquier forma de comprender, como “comprenden” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, como “tienen” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de incluir, como “incluyen” e “incluye”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, como “contienen” y “contiene”) son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos ni etapas de procedimiento adicionales no enumerados. Según se usa en el presente documento, la frase “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o las etapas especificados y a los que no afectan materialmente a la o las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Según se usa en el presente documento, la frase “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación, salvo, por ejemplo, impurezas comúnmente asociadas con el elemento o la limitación.

La expresión “o combinaciones de los mismos”, según es usada en el presente documento, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de todos los elementos enumerados que preceden a la expresión. Por ejemplo, se contempla que “A, B, C o combinaciones de los mismos” incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y, si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contengan repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etcétera. El experto en la técnica comprenderá que normalmente no hay límite alguno en el número de elementos o términos en ninguna combinación, a no ser que resulte evidente algo distinto por el contexto.

- 5
- Según se las usa en el presente documento, palabras de aproximación tales como, sin limitación, “aproximadamente”, “sustancial” o “sustancialmente”, se refieren a una condición que, cuando es así modificada, se entiende que no es necesariamente absoluta o perfecta, sino que las personas con un dominio normal de la técnica considerarían suficientemente cercana como para justificar la indicación de la presencia de la condición. El grado en el que la descripción pueda variar dependerá de cuán grande pueda postularse un cambio y que, pese al mismo, una persona con un dominio normal de la técnica siga reconociendo que la característica modificada sigue teniendo las características y las prestaciones requeridas de la característica no modificada. En general, pero sometido a la exposición precedente, un valor numérico de la presente memoria que esté modificado por una palabra de aproximación tal como “aproximadamente” puede variar con respecto al valor enunciado en al menos ± 1 , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 o 15%.
- 10
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un extracto de plátano que comprende las etapas de:
combinar con agua destilada el corazón de un fruto de una planta de la familia de las musáceas, donde el corazón del fruto está sustancialmente libre de la cáscara del fruto, de los extremos del fruto y de cualquier decoloración o magulladuras;
batir la fruta y el agua destilada en un robot de cocina para formar una mezcla uniforme;
separar la fruta batida y el agua destilada en un sobrenadante y un sedimento, donde el sedimento se desecha y adicionalmente el sobrenadante se procesa;
esterilizar el sobrenadante;
opcionalmente, llevar a cabo una segunda separación en el sobrenadante esterilizado para eliminar cualquier sedimento o resto separado; y
aclarar el sobrenadante esterilizado por filtración por membrana con un procedimiento de filtración en membrana laminar plana o de fibras huecas, una membrana tubular, enrollada en espiral, de fibra hueca, a presión, sumergida o cerámica con un corte molecular de 1000 daltones.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además las etapas opcionales de:
procesar el extracto con los uno o más componentes activos mediante una o más técnicas seleccionadas entre liofilización, centrifugación al vacío, secado por pulverización o combinaciones cualesquiera de los mismos.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 que comprende la ejecución de uno o más ensayos analíticos o ensayos de análisis químico en el extracto vegetal, en el que al menos uno de los ensayos se selecciona del grupo constituido por perfil glucémico, contenido hídrico, análisis de vitamina A, estimación de proteína bruta, análisis mineral completo, nitrógeno no proteico (NPN) equivalente a proteína, índice de Brix, peso específico, vitamina C, análisis de fibra bruta, pH, composición de ácidos grasos mediante GC, y combinaciones cualesquiera de los mismos.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3 en el que la fruta es madurada y luego congelada antes de su procesamiento.
5. Una composición que comprende el extracto de plátano obtenible por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que se añade la composición a un medio de cultivo a una concentración que oscila entre 0,01%-15%, 0,5%-10% o 1%-5%.
7. Un procedimiento para promover o potenciar la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos de uno o más microorganismos que comprende las etapas de:
proporcionar un medio de fermentación o crecimiento para el cultivo o el desarrollo de los uno o más microorganismos;
añadir un inóculo o esporas de los uno o más microorganismos necesitados de una promoción o potenciación de la germinación, el desarrollo, la viabilidad, la producción, la producción de metabolitos o combinaciones cualesquiera de los mismos, donde el inóculo comprende los uno o más microorganismos en una fase de latencia o una fase exponencial de un ciclo de desarrollo microbiano; y
añadir una composición según la reivindicación 5 o 6, donde la composición puede añadirse al medio de cultivo antes de la adición del inóculo o las esporas, o periódicamente durante una fase exponencial o estacionaria del ciclo de desarrollo microbiano.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el procedimiento comprende además las etapas de:
monitorizar el desarrollo de los uno o más microorganismos a través de las fases del ciclo de desarrollo microbiano; y
recoger los uno o más microorganismos cuando se logran un desarrollo, una viabilidad o una producción deseados, se alcanza un nivel deseado de producción de metabolitos, se alcanza una fase de muerte del ciclo de desarrollo microbiano, o combinaciones cualesquiera de los mismos.

9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8 en el que los microorganismos comprenden bacterias, levaduras, hongos o combinaciones cualesquiera de los mismos.
10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que los microorganismos comprenden bacterias seleccionadas entre bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, bacterias del ácido láctico, bacterias aerobias, bacterias anaerobias o combinaciones cualesquiera de los mismos.
- 5
11. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que los microorganismos comprenden bacterias seleccionadas entre una o más bacterias pertenecientes a un género *Bacillus* seleccionado del grupo constituido por *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y combinaciones cualesquiera de los mismos.
- 10
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 en el que el medio de cultivo comprende caldo nutriente (NB), agar nutriente (NA), caldo Luria-Bertani (LB), caldo de ajuste catiónico de Mueller-Hinton (MH), caldo de esporulación, agar de eosina-azul de metileno (EMB), levadura y moho (YM), agar sangre, agar de MacConkey, agar entérico de Hektoen (HE), agar de sal de manitol (MSA), caldo formidable (TB), desoxicolato de lisina de xilosa (XLD), caldo RPMI-1640, caldos mínimos, caldos a base de melaza, agar de extracto de levadura en carbón
- 15
- tamponado o combinaciones o modificaciones cualesquiera de los mismos.

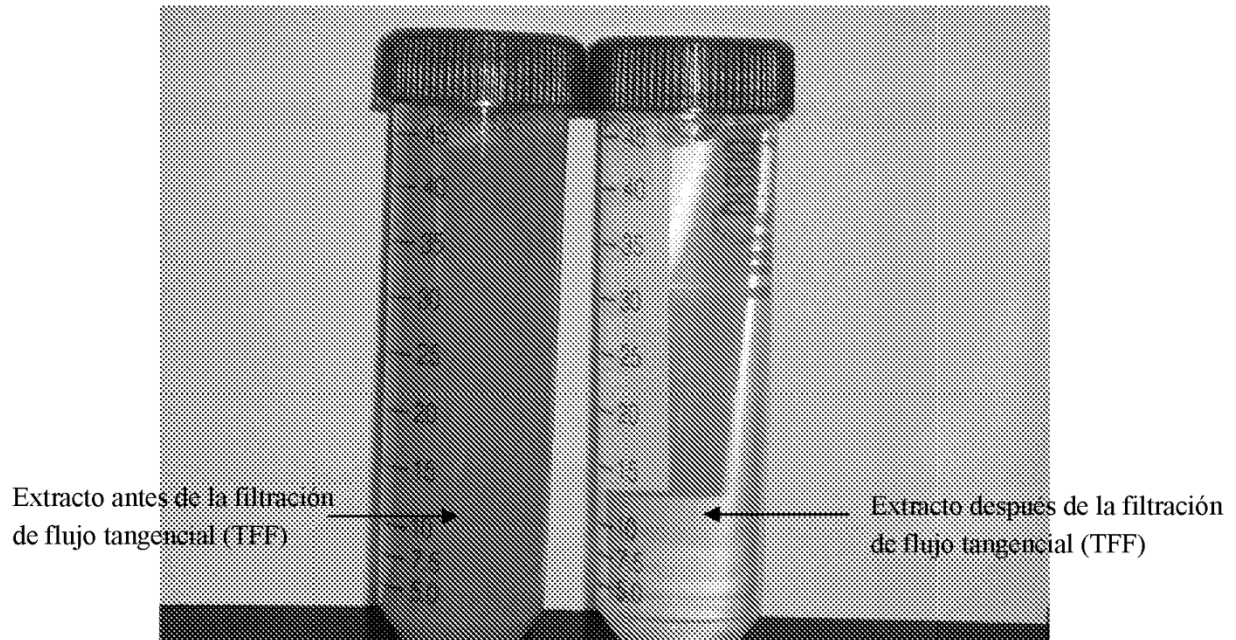


FIG. 1

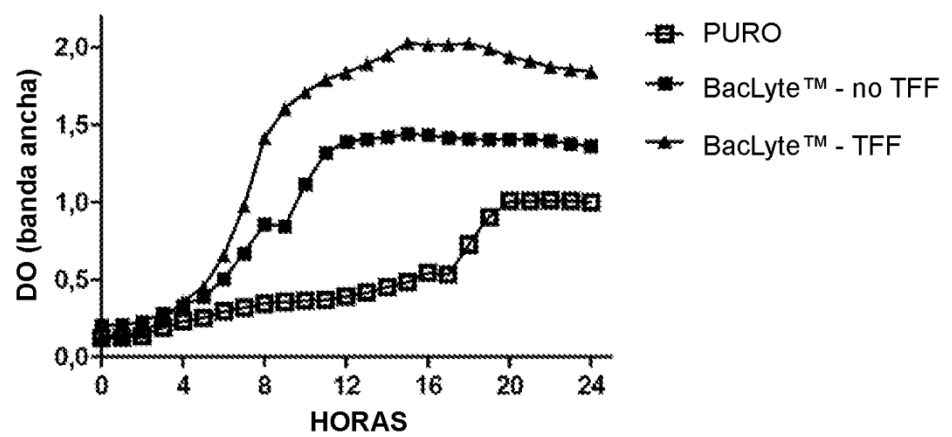


FIG. 2

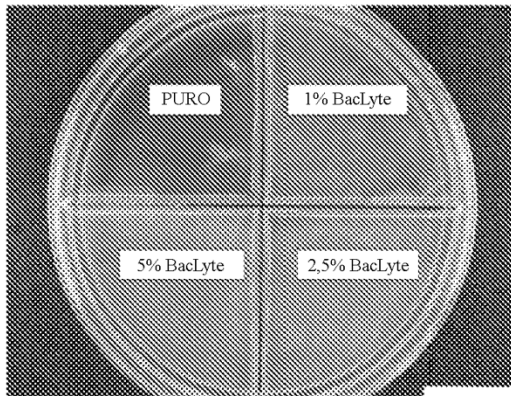


FIG. 3

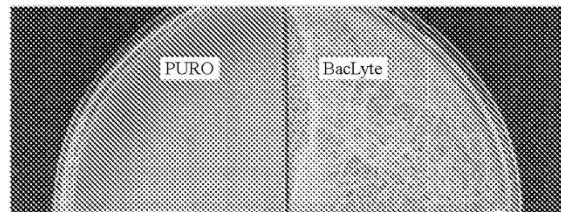


FIG. 4

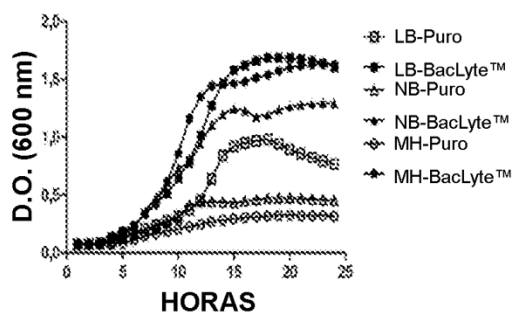


FIG. 5

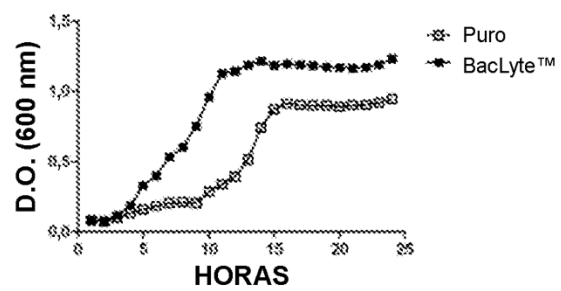


FIG. 6

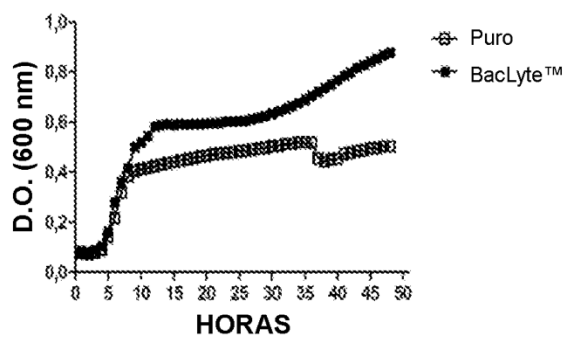


FIG. 7

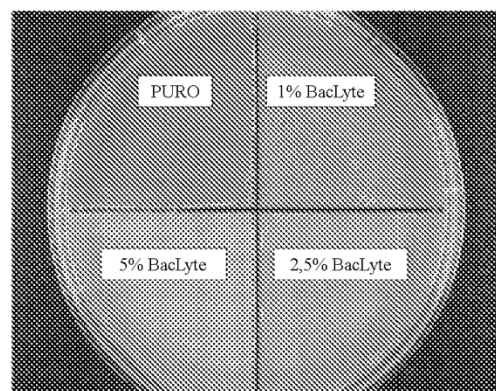


FIG. 8

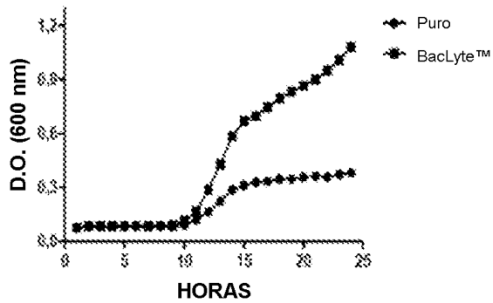


FIG. 9

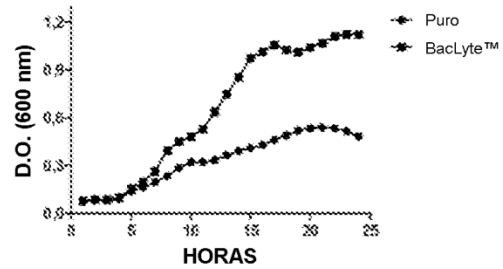


FIG. 10

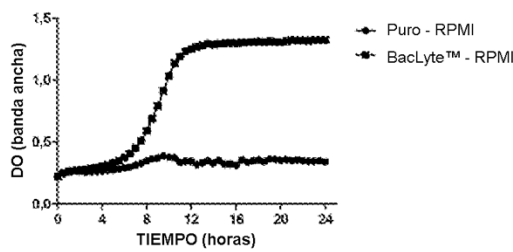


FIG. 11

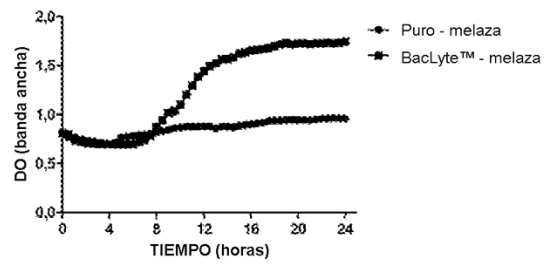


FIG. 12

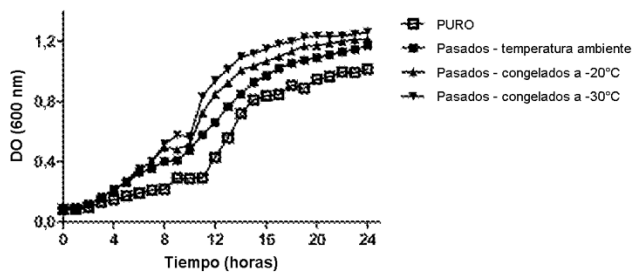


FIG. 13

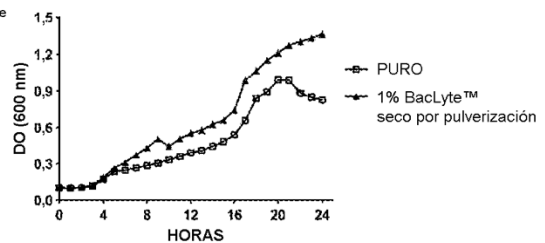


FIG. 14