(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 743 538**

(51) Int. Cl.:

A23L 2/02	(2006.01)	***A23L 29/256***	(2006.01)
A23L 2/52	(2006.01)	***A23L 27/30***	(2006.01)
A23L 2/60	(2006.01)	***A23L 33/135***	(2006.01)
A23L 2/66	(2006.01)	***A23L 33/16***	(2006.01)
A23L 2/68	(2006.01)	***A23L 33/19***	(2006.01)
B01J 13/04	(2006.01)	***A23L 33/155***	(2006.01)
B01J 13/20	(2006.01)	*C12N 1/04*	(2006.01)
A61K 35/745	(2015.01)	*C12N 11/04*	(2006.01)
A61K 35/747	(2015.01)	*C12N 11/10*	(2006.01)
A23P 10/30	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2012 PCT/US2012/033112**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12142153**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2012 E 12715287 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2696705**

(54) Título: **Sistema de encapsulación para la protección de probióticos durante el procesamiento**

(30) Prioridad:

15.04.2011 US 201113088165

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2020

(73) Titular/es:

PEPSICO, INC. (50.0%)
700 Anderson Hill Road
Purchase, New York 10577, US y
MASSEY UNIVERSITY (50.0%)

(72) Inventor/es:

FANG, YUAN;
KENNEDY, BREDA;
RIVERA, TEODORO;
HAN, KYOUNG-SIK;
ANAL, ANIL, KUMAR y
SINGH, HARJINDER

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 743 538 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de encapsulación para la protección de probióticos durante el procesamiento

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del suministro de ingredientes particulares a un consumidor en un comestible, más particularmente nutrientes encapsulados tal como bacterias probióticas en productos comestibles (por ejemplo, bebidas de zumos, concentrados bebibles, formulaciones líquidas listas para beber, jarabes, polvos, aperitivos, pudin, etc.).

Antecedentes

Las bacterias probióticas (a las que se hace referencia en algunos casos en el presente documento como probióticos) son microbios bacterianos vivos que tienen una influencia beneficiosa sobre la salud y nutrición de los individuos promoviendo una microflora más sana en el intestino del huésped. Esta microflora depende de sustancias con que se alimentan de la dieta del organismo huésped. Los probióticos normalmente colonizan el intestino grueso y pueden tener cualquiera o ambos de al menos dos papeles principales: pueden suplementar la flora natural del tracto gastrointestinal con bacterias adicionales, y pueden ser eficaces en el tratamiento de varias afecciones de la salud, que incluyen, pero no se limitan a (1) alivio de trastornos intestinales (por ejemplo, estreñimiento y diarrea producidos por una infección por organismos patógenos, antibióticos, quimioterapia, etc.); (2) estimulación y modulación del sistema inmunitario; (3) efectos antitumorales que resultan de la inactivación o inhibición de compuestos carcinogénicos presentes en el tracto intestinal por reducción de actividades enzimáticas bacterianas(por ejemplo, O-glucuronidasa, azorreductasa, nitrorreductasa, etc.); (4) reducción de la producción de productos finales tóxicos (por ejemplo, amoniaco, fenoles, otros metabolitos proteicos conocidos por influenciar en la cirrosis hepática, etc.); (5) reducción del colesterol sérico y la presión arterial; (6) mantenimiento de la integridad de la mucosa; (7) alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa; y/o (8) prevención de vaginitis.

Los mecanismos potenciales de los efectos anti-patógenicos de las bacterias probióticas son mediante la disminución del pH luminal mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta tal como el ácido acético, ácido láctico o ácido propiónico, que hace que los nutrientes vitales no estén disponibles para los patógenos, alterando el potencial redox del entorno, produciendo peróxido de hidrógeno o produciendo bacteriocinas u otras sustancias inhibidoras (Kailasapathy y Chin, 2000). En los últimos años, los ingredientes alimentarios microbianos vivos específicos y sus efectos sobre la salud humana se han estudiado tanto dentro de las matrices alimentarias como preparaciones de cultivos únicos o mezclados. Debido a los beneficios percibidos sobre la salud, las bacterias probióticas se han incluido cada vez más en productos lácteos fermentados. Los probióticos se han incorporado en leches fermentadas, yogures, queso blando, semicurado y curado, helado, y postres lácteos fermentados congelados. Algunos de los tipos más comunes de bacterias probióticas incluyen Lactobacillus y Bifidobacteria (Axelsson, 1993; Holzapfel y col., 2001).

La capacidad de los microorganismos probióticos para sobrevivir y multiplicarse en el huésped tiene una fuerte influencia en sus beneficios probióticos. Las bacterias deberían estar estables metabólicamente y activas en el producto, sobrevivir el paso a través del tracto digestivo superior en grandes cantidades y tener efectos beneficiosos cuando llegan al intestino del huésped (Gilliland, 1989). La referencia típica de cualquier alimento en venta que afirme ser saludable por la adición de probióticos contiene al menos $10^{9-}10^{10}$ unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias probióticas por ración. Los probióticos son sensibles a distintas condiciones ambientales y normalmente carecen de la capacidad de sobrevivir durante largos periodos en productos alimentarios y bebidas “altamente ácidos” (por ejemplo, frutos cítricos frescos, zumos de frutos cítricos, alimentos que contengan zumos de frutos cítricos, salsa de tomate, etc.). Por ejemplo, en los productos de bebidas de zumos de frutas los probióticos son sensibles a numerosas condiciones ambientales, incluyendo, por ejemplo, pH bajo, alto contenido en ácido, alta actividad de agua, calor, aire, luz, y la presencia inherente de polifenoles que se encuentran en los zumos de frutas, u otras influencias ambientales. Por lo tanto, la viabilidad (que se mide en unidades formadoras de colonias o UFC), y, por lo tanto, la eficacia de los comestibles suplementados con probióticos y en el tracto gastrointestinal se pueden reducir sustancialmente.

Si una composición comestible tiene un pH de menos de 7 se considera ácido. Los ácidos presentes en una composición comestible (por ejemplo, un producto alimentario o bebida) contribuyen al nivel de pH. Cuanto más ácido está presente, menor es el pH probablemente. Las composiciones comestibles altas en ácidos se consideran en general que tienen un pH natural de 4,6 o menos. Por ejemplo, uno de los nutrientes dominantes en los cítricos es ácido, por ejemplo, el ácido ascórbico (Vitamina C), y el nivel de pH del zumo de naranja es alrededor de 3,8. Se sabe que los entornos ácidos desnaturalizan las vitaminas vitales necesarias para el crecimiento de organismos bacterianos. En consecuencia, los organismos mueren en un entorno ácido. Muchos de los probióticos deseables crecen mejor en valores de pH alrededor de 7,0. Las expresiones “contenido ácido” y “grado de acidez” se pueden distinguir. El contenido ácido es la medida de cuánto ácido está presente por unidad de volumen de la composición comestible. El grado de acidez es el valor actual del pH del alimento o la bebida. Un alto contenido en ácido da lugar a un valor de pH menor, mientras que un bajo contenido en ácido da como resultado un valor del pH mayor.

El calor, por ejemplo, en forma de pasteurización) se utiliza de manera rutinaria para destruir los microbios que puedan estar presentes en los alimentos. En general, cuanto más frío se puede mantener un producto, mayor es la supervivencia del probiótico. La luz solar o artificial también puede eliminar al menos algunos probióticos. Ciertas longitudes de onda de luz UV son especialmente dañinas. Debido a la sensibilidad de los probióticos, las influencias ambientales tales como las altas temperaturas, niveles altos de oxígeno, humedad y luz directa pueden dar como resultado que las bebidas que contengan estos organismos tengan una vida de almacenamiento corta. El resultado es un producto con una vida de almacenamiento inadecuada, es decir, un producto cuya disminución del recuento celular de probióticos determina el final de la vida de almacenamiento del producto dando lugar a costes más altos y aumento de pérdidas.

Las técnicas de encapsulación, tales como la microencapsulación, se han investigado para su uso en el aumento de la estabilidad de procesamiento, almacenamiento y digestiva de materiales sensibles, tales como las bacterias probióticas, permitiendo la estabilización y liberación temporal y dirigida de los ingredientes. La microencapsulación se ha definido como una tecnología de empaquetamiento de sólidos, líquidos y materiales gaseosos en miniatura, cápsulas selladas que pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo la influencia de condiciones específicas (Anal y Stevens, 2005; Anal y col., 2006). La microencapsulación se ha utilizado para aumentar la estabilidad de procesamiento, almacenamiento y digestiva de materiales sensibles, tales como las bacterias probióticas. Esta tecnología permite que los materiales se revistan o atrapen en una matriz que crea una barrera al entorno circundante, que posteriormente se degrada para liberar el material central. La composición de las microcápsulas se puede modificar para mejorar la estabilidad y permitir la degradación en condiciones específicas (Anal y Singh, 2007). El objetivo de la microencapsulación de bacterias probióticas por lo tanto es evitar el daño durante el procesamiento y el almacenamiento, y la degradación por los ácidos gástricos, enzimas proteolíticas y sales biliares antes de la liberación dirigida en el colon.

Hasta la fecha, la investigación de encapsulación de probióticos se ha enfocado principalmente en el mantenimiento de las células bacterianas probióticas a un pH bajo y altas concentraciones de bilis, así como durante el secado por pulverización, secado por congelación y almacenamiento. Muchas de las investigaciones se han enfocado en las tecnologías de microencapsulación y la modificación de los parámetros de encapsulación, tales como los tipos de materiales de revestimiento y sus concentraciones y el uso de múltiples capas de revestimiento. Se han hecho pocos intentos de mejorar la viabilidad de los probióticos a altas temperaturas mediante la adición de termoprotectores, sin embargo, se ha descubierto que la viabilidad era insignificante en muchas cepas. En consecuencia, parece que no hay disponibles productos probióticos comerciales que sean estables a altas temperaturas. Además, los procedimientos encapsulación anteriores necesitaban el empleo de emulsiones de agua en aceite o aceite en agua, múltiples etapas de reacción, múltiples revestimientos o capas de encapsulación, o una combinación de las mismas.

Los consumidores demuestran un interés continuo en productos comestibles tales como bebidas listas para beber (RTD) o alimentos fortificados con ingredientes que se cree que proporcionan beneficios para la salud. Sería deseable proporcionar probióticos u otros nutrientes en una forma estable para su uso en productos comestibles, de manera que los ingredientes aguanten ciertas condiciones de procesamientos relacionadas con el procesamiento (por ejemplo, mezcla, homogenización, pasteurización, etc.) de los comestibles, que sigan estando disponibles como nutrientes dentro del tracto intestinal, una vez que el alimento o la bebida sea consumido por un individuo.

GUÉRIN DANIEL Y COL: "Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile", en JOURNAL OF FOOD PROTECTION, INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR FOOD PROTECTION, US, vol. 66, no. 11 desvelan células de Bifidobacterium encapsuladas en un gel mixto compuesto de alginato, pectina y proteínas de suero de leche.

El documento US 2007/0048295 A1 desvela cápsulas de alginato, que incorporan al menos un probiótico y al menos una proteína pancreática digerida en la pared de una cápsula de alginato.

El documento WO 2010/119041 A2 desvela microperlas que comprenden un principio activo encapsulado dentro de una matriz de polímero gelificado de proteína de suero de leche desnaturalizada.

El documento WO 2009/070012 A1 desvela encapsulados que comprenden una matriz de encapsulación basada en proteínas que envuelve una o más bacterias probióticas. Otros distintos documentos incluyendo, por ejemplo, publicaciones y patentes, se describen a lo largo de la presente divulgación. La cita de cualquier documento determinado no se tiene que considerar como la admisión de que es una técnica anterior con respecto a la presente invención. Hasta el punto de que, si cualquier significado o definición de un término en este documento escrito entra en conflicto con cualquier significado o definición del término en un documento, el significado o definición implicado o asignado en el presente documento escrito prevalecerá.

Sumario de la invención

A continuación, se presenta un sumario simplificado de aspectos de los productos, formulaciones y procedimientos inventivos desvelados en el presente documento. Este sumario no es una revisión extensa, y no pretende identificar todos o solo elementos clave o críticos ni delinear el ámbito de los productos, formulaciones y procedimientos

inventivos cubiertos en las reivindicaciones. El siguiente sumario simplemente presenta algunos conceptos y aspectos de la divulgación de forma simplificada como un preludio de la descripción más detallada proporcionada posteriormente de ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes de la invención.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un producto de bebida de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos un líquido acuoso, y cápsulas que comprende una mezcla gelificada de alginato y aislado de proteína de suero de leche, y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada. Las cápsulas comprenden un tamaño de partícula medio de menos de 500 micrómetros (µm) de diámetro. Las bacterias probióticas comprenden opcionalmente *Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp*., o mezclas de cualquiera de ellas. Las bacterias probióticas atrapadas están estabilizadas térmicamente, ya que al someter el producto de bebida a una temperatura de hasta 29 grados Celsius durante hasta 5 segundos da como resultado una disminución de células bacterianas probióticas de entre 1 y 1 x 10^3 UFC por gramo de cápsulas.

También se desvelan en el presente documento productos alimentarios que comprenden bacterias probióticas encapsuladas. Las bacterias probióticas encapsuladas se proporcionan mediante cápsulas que comprenden una mezcla gelificada de alginato y aislado de proteína de suero de leche desnaturalizada y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada. Las cápsulas comprenden un tamaño de partícula medio de entre 1 µm y 1000 µm de diámetro.

La invención se refiere a un procedimiento de formación de probióticos encapsulados que consiste esencialmente en proporcionar una mezcla que comprende alginato sódico, proteína desnaturalizada y células probióticas activas, y combinar la mezcla con un catión divalente para iniciar la gelación fría del alginato sódico y la proteína desnaturalizada, en el que las cápsulas resultantes comprenden una mezcla gelificada de alginato y proteína desnaturalizada, y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada y un tamaño de partícula media de menos de 500 micrómetros (µm). La relación de peso de proteína respecto a alginato es desde 1:1 a 9:1.

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de perlas gelificadas sin revestimiento que comprende una mezcla de una solución acuosa que comprende alginato sódico y una proteína desnaturalizada con una suspensión de células probióticas activas en 0,1 % de peptona en agua, la combinación de la primera mezcla con un catión divalente para iniciar la gelificación en frío del alginato sódico y la proteína desnaturalizada para formar una segunda mezcla, y el paso de la segunda mezcla a través de una abertura para formar perlas que tengan un tamaño de particular medio de menos de 500 µm, en el que las cápsulas resultantes comprenden una mezcla gelificada de alginato y una proteína desnaturalizada, y bacterias probióticas atrapadas en la mezcla gelificada. La relación de peso de proteína respecto a alginato es de 1:1 a 9:1.

La invención se refiere a cápsulas formadas por el procedimiento de mezclar una solución acuosa que comprende alginato sódico y proteína desnaturalizada con células probióticas activas para formar una primera mezcla, la combinación de la primera mezcla con una solución acuosa de cloruro cálcico para iniciar la gelación en frío de la solución de alginato y la proteína desnaturalizada para formar una segunda mezcla, y el paso de la segunda mezcla a través de una abertura para formar cápsulas que tienen un tamaño medio de particular de menos de 500 µm de diámetro. Las cápsulas resultantes comprenden una mezcla gelificada de alginato y proteína desnaturalizada, y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada. Además, el procedimiento da como resultado cápsulas en las que la proteína no está unida covalentemente de manera significativa al alginato. La relación de peso de la proteína respecto al alginato es de 1:1 a 9:1.

En ciertas realizaciones ejemplares, los productos alimentarios o bebidas incluyen adicionalmente uno o más ingredientes adecuados para su uso en dichos productos comestibles, incluyendo, por ejemplo, uno o más de cualquiera de los ingredientes desvelados posteriormente. Todos los porcentajes mencionados en la descripción, divulgación y las reivindicaciones adjuntas son porcentajes por peso del producto o bebida formulado completo a menos de que se establezca otra cosa.

Breve descripción de los dibujos

Se puede adquirir un entendimiento más completo de la presente divulgación y las ventajas de la misma remitiéndose a la siguiente descripción considerando los dibujos adjuntos, en los que iguales números de referencia indican características iguales, y donde

La FIG. 1A representa una imagen microscópica óptica digital de una cápsula de proteína de suero de leche pura.

La FIG. 1B representa una imagen microscópica óptica digital de una cápsula de aislado de proteína de suero de leche respecto a alginato de 75:25.

La FIG. 2A representa una imagen microscópica electrónica de barrido de una cápsula de aislado de proteína de suero de leche pura secada por congelación.

La FIG. 2B representa una imagen microscópica electrónica de barrido de una cápsula de aislado de proteína de suero de leche respecto a alginato de 50:50.

La FIG. 2C representa una imagen microscópica electrónica de barrido de los poros de la superficie de una cápsula de aislado de proteína de suero de leche pura.

La FIG. 2D representa una imagen microscópica electrónica de barrido de células de *L. acidophilus* sobre la superficie de una cápsula de aislado de proteína de suero de leche desnaturalizada térmicamente.

La FIG. 3 representa la degradación de cápsulas en fluido gástrico simulado y en fluido intestinal simulado.

La FIG. 4A representa una fotografía de microcápsulas de proteína de suero de leche-alginato secas.

La FIG. 4B representa una fotografía de microcápsulas de proteína de suero de leche-alginato incubadas en fluidos gástricos simulados durante dos horas.

La FIG. 4C representa una fotografía de microcápsulas de proteína de suero de leche-alginato incubadas en fluidos intestinales simulados durante ocho horas.

La FIG. 5 representa un gráfico de fuerza-tiempo de cápsulas durante la comprensión de la altura de la cápsula.

La FIG. 6 representa un pico del gráfico de fuerza de las cápsulas con una compresión del 50 % de la altura total de las cápsulas.

La FIG. 7 representa un gráfico del recuento de células viables de células libres de *L. acidophilus* después de la incubación en fluido gástrico simulado y pepsina durante 120 minutos.

La FIG. 8 representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *L. acidophilus* microencapsuladas después de la incubación en fluido gástrico simulado y pepsina durante 120 minutos.

La FIG. 9 representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *L. acidophilus* libres y encapsuladas después de la incubación en agua destilada a 37, 50, 60 u 80 grados Celsius.

La FIG. 10A representa un gráfico de los recuentos de células viables de células libres y encapsuladas de *L. acidophilus* después de la incubación en un tampón de fosfato a pH 7.

La FIG. 10B representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *Bifidobacterium lactis* libres y encapsuladas después de la incubación en un tampón de fosfato a pH 7.

La FIG. 11 representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *L. casei* libres y encapsuladas después del tratamiento térmico a 50 grados Celsius.

La FIG. 12 representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *L. casei* libres y encapsuladas después del tratamiento térmico a 60, 70 y 80 grados Celsius.

La FIG. 13A representa un gráfico de recuentos de células viables de células de *L. casei* libres y encapsuladas después de un tratamiento a pH 3,8 y 4,1.

La FIG. 13B representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *Bifidobacterium lactis* libres y encapsuladas después de un tratamiento a pH 3,8 y 4,1.

La FIG. 14A representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *L. casei* libres y encapsuladas después de un tratamiento térmico a 92 grados Celsius durante cuatro segundos, a un pH 3,5.

La FIG. 14B representa un gráfico de los recuentos de células viables de células de *Bifidobacterium lactis* libres y encapsuladas después de un tratamiento térmico a 92 grados Celsius durante cuatro segundos, un pH 3,5.

La FIG. 15 representa una fotografía de un Inotech Encapsulator IE-50R.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción de las distintas realizaciones, se hace referencia a las figuras adjuntas, que forman parte de la misma, y en las cuales se muestran en forma de ilustración distintas realizaciones en las que se puede practicar uno o más aspectos de la divulgación. Por conveniencia, las distintas realizaciones expuestas posteriormente son formulaciones, productos, procedimientos y similares.

Se referencian en el presente documento nombres comerciales para componentes que incluyen distintos ingredientes adecuados para su uso en los productos bebibles, formulaciones y procedimientos ejemplares desvelados en el presente documento. Los inventores no tienen la intención de limitarse a estos materiales de ciertas marcas comerciales. Se pueden sustituir y utilizar materiales equivalentes (por ejemplo, los que se obtengan de diferentes fuentes con un nombre o número de referencia diferentes) a los referenciados en el presente documento por su nombre comercial en las descripciones del presente documento.

Los aspectos de la invención se refieren al uso de biopolímeros de calidad alimentaria como agentes adecuados de encapsulación para bacterias probióticas. Dichos aspectos proporcionan un sistema de biopolímeros de calidad alimentaria que encapsula y estabiliza bacterias probióticas en condiciones térmicas y gástricas, así como hace posible el suministro de bacterias probióticas al tracto gastrointestinal inferior. En ciertos aspectos de la invención, se encapsulan células de Lactobacillus y Bifidobacterium en mezclas de aislado de proteína de suero de leche desnaturalizada térmicamente en combinación con alginato. Se han investigado distintas combinaciones de estos biopolímeros para producir cápsulas fuertes y altamente deseables. De acuerdo con ciertas realizaciones, las cápsulas se preparan utilizando un procedimiento de encapsulación con extrusión, que tiene la capacidad de proteger las células bacterianas en condiciones térmicas y gastrointestinales. Además, los ensayos sensoriales de zumo de naranja y zumo de uva fortificados con células de bacterias probióticas no muestran un impacto significativo en el sabor proporcionado por las bacterias probióticas encapsuladas.

La vida de almacenamiento de un producto de bebida que contiene probióticos puede definirse como la duración de tiempo a una temperatura por encima de la ambiental en que se mantiene al menos una cierta concentración o nivel de probióticos viables, por ejemplo, al menos 1,0 x 10^8 UFC/unidad de volumen o masa, o en algunos casos al menos 5,0 x 10^9 UFC/unidad de volumen o masa. La unidad de volumen o masa puede ser mililitros (ml), gramos (g) onzas (oz.), etc. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, los productos comestibles se proporcionan comprendiendo bacterias probióticas viables encapsuladas en una cantidad de al menos 1,0 x 10^9 UFC por ración, tal como una ración de 226, 8 gramos o una ración de 240 ml.

La estabilidad térmica de las bacterias probióticas encapsuladas se puede definir como la duración de tiempo a una temperatura por encima de la ambiental en que se mantiene al menos cierta concentración o nivel de probióticos viables, por ejemplo, al menos 1,0 x 10^8 UFC/unidad de volumen o masa, o en algunos casos, al menos 5,0 x 10^9 UFC/unidad de volumen o masa. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, los productos comestibles se proporcionan comprendiendo bacterias probióticas encapsuladas viables en una cantidad de al menos 1,0 x 10^6 UFC por ración. La temperatura por encima de la ambiental a la cual las bacterias probióticas encapsuladas, tal como un producto comestible que contiene las bacterias probióticas encapsuladas e puede someter comprende 28 a 95 grados Celsius, por ejemplo, 30 grados Celsius, o 35 grados Celsius, o 40 grados Celsius, o 45 grados Celsius, o 50 grados Celsius, o 55 grados Celsius, o 60 grados Celsius, o 65 grados Celsius, o 70 grados Celsius, o 75 grados Celsius, o 80 grados Celsius, o 85 grados Celsius, o 90 grados Celsius, o 92 grados Celsius, en el que cualquiera de estas temperaturas puede reflejar un punto final de un intervalo. La duración de tiempo al que se someten a las temperaturas por encima de la ambiental comprende de 3 segundos a una hora, por ejemplo 4 segundos, o 5 segundos, o 10 segundos, o 20 segundos, o 30 segundos, o 45 segundos, o 1 minuto, o tres minutos, o cinco minutos, o siete minutos, o diez minutos, o quince minutos, o veinte minutos, o veinticinco minutos, o treinta minutos, o cuarenta y cinco minutos, o una hora, en el que cualquier de estos tiempos puede reflejar un punto final de un intervalo. Normalmente, cuanto mayor es la temperatura, menor es la duración de tiempo en el que el probiótico se protegerá térmicamente de manera satisfactoria.

Ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes del producto comestible o las formulaciones desveladas en el presente documento pueden mantener altas tasas de viabilidad bacteriana y así sobreviven al someterlos a temperaturas elevadas, tal como, por ejemplo, y sin limitación. El procesamiento térmico durante la preparación del comestible, la destrucción de microbios indeseables en el producto comestible, o combinaciones de los mismos. Estos productos bebibles ejemplares o formulaciones, desde una concentración de inicio que varía desde 1,0 x 10^9 – 1,0 x 10^{12} UFC/gramo de cápsulas, por ejemplo 1,0 x 10^{10} UFC/gramo de cápsulas son capaces de suministrar al menos 1,0 x 10^6 UFC/gramo de cápsulas después de someterlo a temperaturas elevadas. De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables al someterlo a temperaturas elevadas comprende de 0 a 1,0 x 10^4 UFC/gramo, o 5,0 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas, o de 0 a 1,0 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas o de 0 a 5,0 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas, o 0 a 1.0 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas, o 0 a 50 UFC/gramo de cápsulas, o 0 a 10 UFC/gramo de cápsulas.

Ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes de los productos o formulaciones comestibles desveladas en el presentes documento pueden mantener tasas elevadas de viabilidad de bacterias probióticas y así consigue una larga vida de almacenamiento. Estos productos o formulaciones ejemplares, desde una concentración de inicio que varía desde 1,0 x 10^9 – 1,0 x 10^{12} UFC/ración, por ejemplo, 1,0 x 10^{10} UFC/ración de 354,9 ml, son capaces de suministrar al menos 1,0 x 10^9 UFC de bacterias por cada 354,9 mililitros de bebida, por ejemplo, cuando se consumían incluso después de 45 días cuando se almacenaba en oscuridad o en cualquier otra condición protegida de los rayos UV a una temperatura de 1,6 ºC tras la carga. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, la mitad de la concentración de inicio de bacterias probióticas viables se mantenía después de 45 días, o 63 días, o incluso 70 días, cuando se almacenan en la oscuridad o cualquier otra condición protegida de los rayos UV a una temperatura de 1,6 ºC tras la carga. De acuerdo con aspectos ejemplares de la presente invención la disminución en las bacterias probióticas encapsuladas viables en un zumo ácido que comprende un pH de 3,75 y se almacena en condiciones ambiente comprende de 0 a 1,0 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas después de diez semanas de almacenamiento a 1,6 ºC tras la carga, es decir, 1,0 x 10^6 – 1,0 x 10^{12} UFC/gramo de cápsulas.

Además, el pH del producto comestible de acuerdo con aspectos de la invención puede afectar la viabilidad de las bacterias probióticas, con valores bajos del pH disminuye la viabilidad de las bacterias probióticas. Por ejemplo, de acuerdo con aspectos ejemplares de la presente invención, la disminución en las bacterias probióticas encapsuladas

viables en un zumo ácido que comprende un pH de 2,75 y almacenado en condiciones ambientes comprende de 0 a 100 UFC/gramo de cápsulas después de dos semanas de almacenamiento. Por el contrario, la disminución en bacterias probióticas encapsuladas viables en un zumo ácido que comprende un pH de 3,5 y almacenadas en condiciones ambientes comprende 0 a 100 UFC/gramo de cápsulas después de ocho semanas de almacenamiento.

Como se utiliza en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas, la expresión “probióticos”, “microorganismos probióticos” o “biomasa probiótica” se entiende que incluye cualquier microorganismo, contenido celular o metabolitos de los microorganismos, que tienen efectos beneficiosos para su huésped. Por lo tanto, se pueden incluir las levaduras, mohos y bacterias. En ciertas realizaciones ejemplares, las cebas bacterianas probióticas de Bifidobacterium se pueden utilizar en productos bebibles, formulaciones y procedimientos desvelados en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, *B. breve, B. animalis (lactis), B. longum, B. bifidum, B. adolescentis, B. thermophilum, y B. infantis*. También se pueden utilizar cepas bacterianas probióticas del género *Lactobacillus* que incluyen, por ejemplo, *L. acidophilus, L. casei, L. rhamnosus, L, paracasei, L. johnsonii, L. reuteri y L. plantarum, L. lactis, L. bulgaricus*.

El documento EP 0862863 enumera algunos ejemplos de probióticos conocidos actualmente. Por ejemplo, se pueden utilizar las cepas de Lactobacillus plantarum (Lp299), Bifidobacterium lactis (HN019), o *Bifidobacterium lactis* (BB-12) en ciertos ejemplos no limitantes de los productos comestibles, formulaciones desvelados en el presente documento. Una selección de diferentes cepas probióticas se ofrece por Christian Hansen BioSystems A/S (CHL), 10-12 Boge All, P.O Box 407, DK-2970 Horsholm, Dinamarca. Está en la experiencia de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, el seleccionar cepas adicionales adecuadas o alternativas para su uso en distintas realizaciones de los productos bebibles y las formulaciones desveladas en el presente documento.

En algunas realizaciones ejemplares y no limitantes, los productos comestibles o formulaciones pueden contener especies de múltiples bacterias. En ciertos ejemplos ejemplares y no limitantes, cuando están presentes dos bacterias en la formulación, las bacterias pueden ser por ejemplo *B. animalis (lactis) y L. rhamnosus*. La relación de una especie bacteriana con otra puede variar ampliamente. La relación puede ser desde aproximadamente 0,00000001 a 1, aproximadamente 0,0000001 a 1, aproximadamente 0,000001 a 1, aproximadamente 0,00001 a 1, aproximadamente 0,0001 a 1, aproximadamente 0, 001 a 1, aproximadamente 0,01 a 1, aproximadamente 0,1 a 1, o aproximadamente 1 a 1.

El número de bacterias viables a menudo se registra como UFC, o unidades formadoras de colonias. Una colonia se forma por una única bacteria viable cuando la bacteria se coloca en una placa con una dilución adecuada para la formación de colonias únicas. Esto es una técnica convencional conocida por los microbiólogos. Normalmente, la cantidad se expresa como el número de UFC en una medida líquida, por ejemplo, mililitros (ml), onzas de fluido (fl. oz), etc., o una medida sólida, por ejemplo, gramos (g). La regulación de EE. UU. 21 CFR 101.9(b)(5)(viii) define una onza de fluido como 30 ml exactamente. Puede ser necesario un número suficiente de bacterias viables para obtener los efectos beneficiosos de las bacterias probióticos. A menudo las bacterias se empaquetan con un cierto nivel de bacterias viables; sin embargo, antes del consumo, los niveles pueden disminuir evitando que el consumidor adquiera una dosis de bacterias beneficiosa. Además, el Centro Nacional de Medicina Alternativa y Complementaria (NCCAM) han identificado varios problemas relativos a la calidad de productos probiótico incluyendo: la viabilidad de la bacteria en el producto, tipos y títulos de bacterias en el producto, y estabilidad en almacenamiento. Véase NCCAM, "BACKGROUNDER: Biologically Based Practices: An Overview" (octubre, 2004). Este documento se puede encontrar en el sitio de internet del Centro Nacional de Medicina Alternativa y Complementaria (NCCAM).

Las bacterias adecuadas para ciertos ejemplos ejemplares no limitantes de los productos bebibles, formulaciones y procedimientos desvelados en el presente documento se pueden preparar en una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el crecimiento en medios que contienen caseína. De manera opcional, las bacterias pueden crecer sin caseína, proporcionando una preparación bacteriana libre de productos lácteos. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, las bacterias pueden almacenarse mediante refrigeración, congelación, o secados por congelación sin disminuir la viabilidad por debajo de un nivel deseado. De acuerdo con un aspecto, las bacterias se congelan y luego se descongelan antes de la encapsulación.

De acuerdo con ciertos aspectos las bacterias se secan por congelación y entonces se miden, se mezclan y se rehidratan en agua con un 0,10 % de peptona antes de la encapsulación. De acuerdo con realizaciones de la invención, en las cápsulas biopoliméricas, tal como perlas o cápsulas. Como se utiliza en el presente documento, el término “cápsula” se refiere a una partícula cerrada sustancialmente por completo. La partícula encerrada puede comprender un material de la cubierta externa que sea la misma o diferente del material interior. Por ejemplo, y sin limitación, una cápsula puede comprender una o más cubiertas sólidas externas rodeando un interior líquido, o una o más cubiertas externas sólidas rodean un interior sólido. De acuerdo con aspectos de la invención, tanto la cubierta exterior como el material interior comprenden una red que comprende al menos dos biopolímeros que están intercaladas, reticulada, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, de acuerdo con ciertos aspectos de la invención se proporciona una cápsula que comprende una cubierta externa y un material interior que comprende los mismos biopolímeros de manera que la densa polimerización en la superficie de la cápsula forma una cubierta externa. Por el contrario, la extensión de polimerización del material en el interior es de manera que comprende espacio entre las cadenas poliméricas individuales. Cuando la cápsula está compuesta por un material presente en una forma que es un sólido tanto en el interior y la cubierta externa de la cápsula se le puede hacer referencia como

una “perla”.

El tamaño de las cápsulas (o perlas) varía dependiendo del procedimiento empleado para preparar las cápsulas, y varía entre las que comprende un tamaño medio de partícula de entre 1 µm y 3000 µm de diámetro. Normalmente, la combinación de una fuente de un catión divalente con el alginato utilizando un procedimiento gota a gota da como resultado cápsulas con un extremo más alto del intervalo, tal como entre 1500 µm de diámetro y 3000 µm de diámetro. El tamaño medio de la partícula de las cápsulas puede controlarse utilizando procedimientos y aparatos conocidos por los expertos en la técnica tal como, por ejemplo, y sin limitación, la pulverización o extrusionado. Por ejemplo, una vez que comience la gelación de la cápsula, la mezcla se puede pasar a través de aberturas en un aparato de extrusión, tal como una o más boquillas, resultando de esta manera en la formación de cápsulas o perlas que comprenden aproximadamente el mismo diámetro que el diámetro de la abertura por la que la mezcla se pasó.

Como se utiliza en el presente documento, el término “microcápsula” se refiere a una cápsula (o perla) que comprende un tamaño medio de partícula de entre 1 µm y 1000 µm de diámetro, tal como entre 1 µm y 900 µm de diámetro, o entre 1 µm y 800 µm o entre 1 µm y 700 µm de diámetro, o entre 1 µm y 600 µm de diámetro, o entre 1 µm y 500 µm de diámetro, o entre 1 µm y 400 µm de diámetro, o entre 1 µm y 300 µm de diámetro, o entre 1 µm y 200 µm de diámetro, o entre 1 µm y 100 µm de diámetro, o entre 100 µm y 600 µm de diámetro, o entre 200 µm y 600 µm de diámetro, o entre 400 µm y 600 µm de diámetro, o entre 300 µm y 500 µm de diámetro. Las cápsulas incluyendo las perlas y microcápsulas, comprenden cualquier forma que se forme durante la gelificación de los polímeros, por ejemplo, y sin limitación, esférica, ovoide, cilíndrica y similares.

Los biopolímeros empleados incluyen, por ejemplo, y sin limitación, proteínas, polisacáridos y combinaciones de los mismos. Se puede emplear cualquier polisacárido adecuado que se conoce en la técnica, tal como por ejemplo y sin limitación pectina, carragenano, alginato, goma de xantano, celulosas modificadas, por ejemplo, carboximetilcelulosa, goma arábiga, goma ghatti, goma karaya, goma de tragacanto, goma de algarrobo, goma guar, goma de semilla de psilium, goma de semilla de quince, goma de larch (arabinogalactanos), goma de estractan, agar, furcelaran, almidones modificados, goma gelan, fucoidan y similares.

Cualquier fuente de proteína adecuada se puede utilizar como se conoce en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aislado de proteína de suero de leche, aislado de proteína de caseína, aislado de proteína de leche, péptidos, proteína de arroz, proteína de trigo, proteínas vegetales, proteína de soja, péptidos de proteínas de soja, hidrolizados de proteínas desoja, proteína de huevo, proteínas de legumbres, proteínas de frutos secos, proteínas de cacahuetes, proteína zeína de maíz, y similares. La proteína se desnaturaliza para mejorar la capacidad de la proteína para mezclarse o fundirse de manera sustancialmente homogénea con el polisacárido reduciendo el tamaño tridimensional de las proteínas individuales. La desnaturalización se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo y sin limitación, por procedimientos térmicos. Por ejemplo, al someter una solución acuosa de aislado de proteína se suero de leche a temperatura de entre aproximadamente 65 grados Celsius y aproximadamente 95 grados Celsius durante un tiempo de 5 a 40 minutos se desnaturalizará parcial o completamente el aislado de proteína de suero de leche.

Se emplean dos o más biopolímeros para formar cápsulas para la encapsulación de células bacterianas probióticas viables. Los polímeros de alginato y proteína, por ejemplo, alginato sódico y aislado de proteína de suero de leche, se combinan satisfactoriamente para formar cápsulas que contienen bacterias probióticas. El alginato es un polisacárido aniónico que está disponible comúnmente como una sal de sodio o potasio (es decir, alginato sódico o alginato potásico). Cuando el alginato se expone a cationes divalentes tales como el Ca^{2+}, el alginato se somete a gelificación para formar una cápsula de gel (o una perla). Además, el procedimiento de desnaturalización de la proteína expone grupos reactivos y la proteína desnaturalizada también se somete a gelificación al exponerse a cationes divalentes. En consecuencia, una mezcla de dos o más biopolímeros, por ejemplo, alginato y proteína desnaturalizada, que se exponen a cationes divalentes, pueden formar una pluralidad de cápsulas que comprenden una mezcla gelificada de alginato y proteína desnaturalizada. Las bacterias probióticas presentes en la mezcla de los biopolímeros se encuentran atrapadas dentro de la mezcla gelificada. Se puede emplear cualquier catión divalente conocido por los expertos en la técnica, en particular los cationes divalentes aprobados para su inclusión en comestibles, tales como Ca^{2+}, Mg^{2+}, o Fe^{2+}, por ejemplo.

Como el alginato y la proteína desnaturalizada se someten a gelación, hay algo de entrelazado del alginato y la proteína; sin embargo, la proteína desnaturalizada no reacciona químicamente de manear significativa con el alginato para formar enlaces covalentes con el polímero de alginato. Como se utiliza en el presente documento, “no reacciona químicamente de manera sustancial” se define como que no reacciona en un 90 % a un 100 %. A valores de pH bajo, sin embargo, el alginato y la proteína desnaturalizada en solución puede formar complejos de alginato y proteína a lo largo del tiempo.

Es posible incorporar materiales adicionales en la cápsula proporcionando una solución o dispersión del alginato, proteína, y el uno o más de otros materiales, antes de la exposición a los cationes divalentes. Con la gelificación, el uno o más de otros materiales se fijan (es decir, se atrapan) dentro de la cápsula como una carga interior, como parte de la estructura gelificada o combinaciones de los mismos. De acuerdo con aspectos de la invención, uno o más tipos de células bacterianas se incluyen en una solución acuosa con el alginato y la proteína desnaturalizada antes de la gelificación.

Sorprendentemente, las cápsulas gelificadas que comprenden una mezcla de polisacáridos y proteínas proporcionan una protección satisfactoria de bacterias probióticas viables al exponerse a las condiciones de procesamiento, tal como por ejemplo temperatura y presión elevadas, y exposición a condiciones ácidas, tales como fluido gástrico simulado, e incluso la liberación de las bacterias probióticas con la exposición a condiciones básicas, tal como el fluido intestinal simulado. Se ha descubierto que las cápsulas que comprenden una relación de peso de proteína respecto a polisacárido de 1:1 a 4:1 proporcionan dicha protección para las bacterias probióticas. Por el contrario, a dichas combinaciones, las cápsulas que comprendían o un 100 % de proteína o un 100 % de polisacárido no eran capaces de proteger las bacterias probióticas de las condiciones de temperatura elevada o ácida. De acuerdo con aspectos de la invención, la relación de peso de proteína (por ejemplo, aislado de proteína de suero de leche desnaturalizada) respecto a polisacáridos (por ejemplo, alginato sódico) es desde 1:1 a 4:1, o 1:1 a 9:1, o 1:1 a 8:1, o 1:1 a 7:1, o 1:1 a 6:1, o 1:1 a 5:1, o 2:1 a 3:1, o 5:1, o 4.5:1, o 4:1, o 3.5:1, o 3:1, o 2.5:1, o 2:1, o 1.5:1, o 1:1.

En ciertas realizaciones de la invención se proporciona un procedimiento de preparación de bacterias probióticas encapsuladas. Que comprende la mezcla de una solución acuosa de alginato sódico con una solución acuosa de proteína desnaturalizada y una suspensión de células probióticas activas en agua con un 0,1 % de peptona, para formar una primera mezcla. Como se utiliza en el presente documento, el término “peptona” se refiere a uno o más derivados proteicos hidrosolubles, que se obtienen mediante la hidrólisis parcial de una proteína mediante un ácido o una enzima. La peptona se emplea normalmente en medios de cultivos en bacteriología y es conocida por los expertos en la técnica. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “agua con un 0,1 % de peptona” se refiere a una solución acuosa que comprende un 0,1 % por peso de peptona. Opcionalmente, la primera mezcla se incuba en un baño de agua a una temperatura entre 36 y 46 grados Celsius durante al menos 5 minutos, por ejemplo, desde 5 a 20 minutos. En variaciones alternativas de las realizaciones, un procedimiento de preparación de bacterias probióticas encapsuladas comprende la provisión de una primera solución acuosa que comprende alginato sódico (u otro biopolímero), proteína desnaturalizada, y células probióticas activas. El procedimiento comprende la combinación de la primera mezcla (o la primera solución acuosa) con una solución acuosa que comprende uno o más cationes divalentes para iniciar la gelificación en frío del alginato sódico y la proteína desnaturalizada para formar una segunda mezcla, y el paso de la segunda mezcla a través de una abertura, por ejemplo una abertura que tenga un diámetro de menos de 1000 µm, para formar cápsulas que tengan un tamaño de partícula medio de entre 1 µm y 1000 µm de diámetro. El catión divalente comprende cualquier catión divalente, por ejemplo, cloruro cálcico, que puede estar presente a cualquier concentración adecuada de cloruro cálcico, tal como aproximadamente un 4 % de peso por volumen de cloruro cálcico.

Las cápsulas resultantes comprenden una mezcla gelificada de alginato y proteína desnaturalizada, y comprenden bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada. De acuerdo con aspectos de la invención, el procedimiento comprende adicionalmente el endurecimiento de las cápsulas en una solución de cloruro cálcico durante al menos quince minutos, seguido por el lavado de las cápsulas endurecidas con agua. En realizaciones alternativas, las cápsulas no se someten a endurecimiento, sino que se lavan con agua a continuación de la fabricación.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, las cápsulas que comprenden bacterias probióticas se pueden preparar empleando una única reacción acuosa de gelificación de los biopolímeros, por la cual la mezcla de alginato y proteína se gelifican al ponerse en contacto con cationes divalentes. Esto es al contrario que las técnicas de encapsulación más complicadas en las que se preparan emulsiones (por ejemplo, emulsiones de aceite en agua o agua en aceite), la superficie externa de las cápsulas se somete a una reacción química, se aplican uno o más revestimientos protectores o cubiertas en la superficie externa de las cápsulas, o combinaciones de los mismos. Las cápsulas de la presente invención proporcionan una protección de las condiciones ambientales como se ha expuesto anteriormente, sin la necesidad de modificar la superficie externa por una reacción química o la adición de revestimientos o cubiertas en las cápsulas.

La extrusión se emplea opcionalmente durante la formación de las cápsulas, en la cual la abertura por la que pasa la segunda mezcla comprende una boquilla. Durante los procedimientos de extrusión, la mezcla se fuerza a través de una boquilla de extrusión utilizando presión durante el proceso de gelificación. Un aparato ejemplar de extrusionado se expone en los ejemplos posteriormente, y está en la experiencia de la técnica seleccionar un aparato de extrusionado adecuado. De acuerdo con aspectos ejemplares, las cápsulas producidas por el procedimiento comprenden un tamaño medio de partícula de entre 1 µm y 500 µm de diámetro, o entre 1 µm y 300 µm de diámetro, tal como 250 µm de diámetro. Normalmente, las cápsulas que tienen un diámetro de 500 µm o menos se fabrican utilizando el extrusionado de la segunda mezcla.

Además, se contempla que las bacterias probióticas encapsuladas de acuerdo con los aspectos de la presente invención no afectarán las propiedades físicas del producto comestible. Por ejemplo, se contempla que las cápsulas no afectarán a la textura aceptable o las interacciones físicas o químicas en la boca, ni afectarán al sabor del producto acabado. De acuerdo con aspectos de la invención el tamaño medio de las partículas de las cápsulas debería ser lo suficientemente pequeño para no aumentar la viscosidad del producto comestible o para proporcionar un cambio perceptible del sabor del producto comestible.

En ciertas realizaciones, la proteína desnaturalizada comprende aislado de proteína de suero de leche desnaturalizado. Las cápsulas comprenden una relación de peso de proteína desnaturalizada respecto a alginato en

un intervalo de 1:1 a 9:1, o en un intervalo de desde 1:1 a 4:1, o en un intervalo de desde 2:1 a 3.1. De acuerdo con aspectos de la invención, las cápsulas comprenden al menos 1 x 10^9 UFC/gramo de cápsulas de bacterias probióticas en el momento de la fabricación, tal como al menos 1 x 10^{10} UFC/gramo de cápsulas de bacterias probióticas en el momento de la fabricación.

En realizaciones de la invención, las cápsulas que comprenden bacterias probióticas activas se añaden a un producto comestible y el producto comestible se envasa, para su eventual consumo por un individuo. La cantidad de cápsulas incorporadas al producto comestible varía dependiendo de la carga de probióticos viables en las cápsulas. En aspectos de la invención, el producto comestible comprende entre 0,05 gramos y 10,0 gramos de cápsulas por unidad de medida de producto (por ejemplo, onza de fluido o gramo de producto), o entre 0,1 gramos y 8 gramos de cápsulas por unidad de medida de producto, o entre 0,1 gramos y 5 gramos de cápsulas por unidad de medida de producto, o entre 0,1 gramos y 3 gramos de cápsulas por unidad de producto, o entre 0,1 y 1 gramo de cápsulas por unidad de producto. Como se ha expuesto anteriormente, una cantidad típica de bacterinas probióticas viables en un producto comestible comprende al menos 1 x 10^{10} UFC por ración de producto. Estará en el nivel de un experto en la técnica después de beneficiarse de la presente divulgación, determinar una cantidad apropiada de cápsulas para incluir en un producto específico para proporcionar al menos 1 x 10^9 UFC por ración de producto.

Se añade una cantidad particular de cápsulas, por ejemplo, a un producto de bebida (por ejemplo, una bebida lista para beber, una bebida en polvo, una bebida concentrada, etc.) un pudin, un aperitivo, u otro comestible adecuado conocido en la técnica. De acuerdo con un aspecto, un producto de bebida comprende al menos un líquido acuoso y cápsulas que comprenden alginato gelificado y que tienen un aislado de proteína de suero de leche desnaturalizado y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada de alginato y proteína desnaturalizada. Las cápsulas comprenden un tamaño medio de partícula de menos de 500 micrómetros de diámetro. El líquido acuoso comprende cualquier líquido adecuado para productos bebibles conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, y sin limitación, agua, agua carbonatada, zumo de frutas, zumo de verduras, bebidas hidratantes, batidos, tés, cafés, productos lácteos tales como leche, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el producto de bebida comprende opcionalmente una bebida de zumo.

La expresión “vida de almacenamiento” como se utiliza en el presente documento se refiere a la cantidad de tiempo después de que se haya envasado un producto comestible en la que cumple los criterios aplicables para la venta y consumo, incluyendo los que tiene al menos un requisito de concentración mínima de los probióticos. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, la vida de almacenamiento es la duración de tiempo que un producto cumple dichos criterios y es de otra manera adecuado para el consumo, cuando se envasa en recipientes de PET sellados herméticamente de 355 ml (12 onzas de fluido) y se almacenan en la oscuridad o de otra manera en condiciones protegidas de la radiación UV a una temperatura de aproximadamente 1,66 ºC (35 ºF), incluyendo la continuación de tener probióticos viables a un nivel de al menos 1,0 x 10^9 UFC/355 ml (12 onzas de fluido) del producto comestible. Se debería entender que los productos comestibles y formulaciones desvelados en el presente documento se pueden almacenar y envasar en cualquier recipiente adecuado, incluyendo, por ejemplo, recipientes de cualquier tamaño deseado fabricados con cualquier material adecuado. La definición anterior de vida de almacenamiento se da en el presente documento por referencia y explicación convenientes de la mejora de la vida de almacenamiento proporcionada por algunas o todas las realizaciones de los productos y formulaciones desvelados en el presente documento. Los expertos en la técnica entenderán por la presente divulgación, que se alcanzará una vida de almacenamiento correspondiente o mejorada comparable en algunas o todas las realizaciones también en otras condiciones de almacenamiento o vida de almacenamiento, por ejemplo, a otras temperaturas, en recipientes de otros materiales y tamaños adecuados, etc. mientras sigan consiguiendo resultados similares.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, los productos comestibles o formulaciones desveladas en el presente documento presentan la característica que después de 45 días de almacenamiento en oscuridad o de otra manera en condiciones protegidas de la radiación UV a temperaturas de refrigeración (por ejemplo, 1,66 ºC (35 ºF)) después de la preparación de la bebida, el número de bacterias contenidas en la bebida tiene un valor en algún lugar desde aproximadamente 1,0 x 10^9 UFC/355 ml (12 onzas de fluido) a aproximadamente 5,0 x 10^{10} UFC/355 ml (12 onzas de fluido) de bebida.

Se debería entender que el término “aproximadamente” se utiliza en el presente documento y en aplicaciones similares de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas para tener en cuenta la inexactitud habitual y variabilidad en la medición y similares.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, los productos bebibles o formulaciones desveladas en el presente documento presentan la característica de que después de 45 días de almacenamiento en oscuridad o de otra manera en condiciones protegidas de la radiación UV a temperaturas de refrigeración (por ejemplo, 1,66 ºC (35 ºF)) después de la preparación del producto, el número de bacterias contenido en un producto de bebida es, por ejemplo, desde aproximadamente 1,0 x 10^9 UFC/355 ml (12 onzas de fluido) a aproximadamente 5,0 x 10^{10} UFC/355 ml (12 onzas de fluido) de producto de bebida, y en algunas realizaciones desde aproximadamente 2,0 x 10^9 UFC/355 ml (12 onzas de fluido) a aproximadamente 5,0 x 10^{10} UFC/355 ml (12 onzas de fluido) de producto de bebida, y en algunas realizaciones desde aproximadamente 3,0 x 10^9 UFC/355 ml (12 onzas de fluido) a aproximadamente 5,0 x 10^{10} UFC/355 ml (12 onzas de fluido) de producto de bebida y en algunas realizaciones

desde aproximadamente 4,0 x 10^9 UFC/355 ml (12 onzas de fluido) a aproximadamente 5,0 x 10^{10} UFC/355 ml (12 onzas de fluido) de producto de bebida.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, se proporciona una formulación de producto de bebida que comprende al menos un zumo de frutas y cápsulas que comprenden bacterias probióticas a una concentración de al menos 1,0 x 10^9 UFC/355 ml (12 onzas de fluido), por ejemplo, desde 1,0 x 10^9 a 1,0 x 10^{12} UFC/355 ml (12 onzas de fluido), en el que la formulación de producto de bebida tiene un pH como mucho de 4,5 y un nivel de ácido entre el 0,5 % y el 1,0 %. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, dichas formulaciones de producto de bebida tienen al menos una concentración de probióticos un 10 % mayor, por ejemplo, una concentración de probióticos que es al menos un 20 % mayor, al menos un 25 % mayor, al menos un 50 % mayor, al menos un 75 % mayor o incluso al menos un 90 % mayor que la que tendría la misma formulación que comprendiera células bacterianas probióticas libres, cuando se ensayan después de 45 días en recipientes de PET herméticamente sellados de 355 ml almacenados en oscuridad o de otra manera en condiciones protegidas de la radiación UV a 1,66 ºC (35 ºF). En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, dichas formulaciones de producto de bebida tienen al menos una concentración de probióticos un 10 % mayor, por ejemplo, una concentración de probióticos que es al menos un 20 % mayor, al menos un 25 % mayor, al menos un 50 % mayor, al menos un 75 % mayor o incluso al menos un 90 % mayor que la que tendría la misma formulación que comprendiera células bacterianas probióticas libres, cuando se ensayan después de 63 días en recipientes de PET herméticamente sellados de 355 ml almacenados en oscuridad o de otra manera en condiciones protegidas de la radiación UV a 1,66 ºC (35 ºF). En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, dichas formulaciones de producto de bebida tienen al menos una concentración de probióticos un 10 % mayor, por ejemplo, una concentración de probióticos que es al menos un 20 % mayor, al menos un 25 % mayor, al menos un 50 % mayor, al menos un 75 % mayor o incluso al menos un 90 % mayor que la que tendría la misma formulación que comprendiera células bacterianas probióticas libres, cuando se ensayan después de 70 días en recipientes de PET herméticamente sellados de 355 ml almacenados en oscuridad o de otra manera en condiciones protegidas de la radiación UV a 1,66 ºC (35 ºF).

En al menos un procedimiento ejemplar para la preparación del producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento, el procedimiento comprende la mezcla de varios ingredientes para formar una primera mezcla, en la que todos o algunos de los cuales opcionalmente se combinan con anterioridad en cualquier orden. Los ingredientes incluyen al menos un líquido y cápsulas que comprenden bacterias probióticas. En ciertas realizaciones ejemplares, los productos bebibles incluyen adicionalmente uno o más ingredientes bebibles adecuados para su uso en dichos productos bebibles, incluyendo, por ejemplo, uno o más de cualquiera de los ingredientes bebibles adicionales desvelados posteriormente. La primera mezcla se calienta adicionalmente para pasteurizar la mezcla antes de la adición de las cápsulas que comprenden las bacterias probióticas. Las cápsulas se pueden introducir en la primera mezcla después, por ejemplo, justo después, de la etapa de pasteurización o después, por ejemplo, justo después del envasado de la bebida. El producto de bebida se puede envasar en botellas, cartones o vasos, por ejemplo, en recipientes esterilizados de una o varias raciones. Normalmente, dichos recipientes tienen aproximadamente de 118 ml (4 onzas de fluido) a 473 ml (16 onzas de fluido) de tamaño, por ejemplo, 177 (6 onzas de fluido), 237 ml (8 onzas de fluido o 355 ml (12 onzas de fluido). Los recipientes se pueden sellar por procedimientos adecuados conocidos en la técnica. Los recipientes sellados se pueden enviar o almacenar a temperatura ambiente, u opcionalmente, en refrigeración. Las temperaturas de refrigeración tienen normalmente un intervalo desde aproximadamente 0 ºC a 10 ºC (32 ºF a 50 ºF). A menudo, la temperatura de refrigeración es de aproximadamente 2 ºC a 6 ºC (35 ºF a 43 ºF).

Los zumos de fruta empleados en aspectos de la invención pueden ser cualquiera o más de varias formas que incluyen, por ejemplo, líquidos, concentrados, extractos, purés, pulpas y similares. Un zumo de fruta adecuado para la bebida incluye, por ejemplo, zumo de naranja. Las combinaciones de zumos de futra adecuadas para los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento incluyen, por ejemplo, una mezcla de cualquiera o más de entre uva, arándano, manzana, naranja, mango, piña y coco. Las especies bacterianas que presentan una supervivencia excelente en los productos bebibles que comprenden estas mezclas incluyen, por ejemplo, *Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp*., o mezclas de cualquiera de ellos.

La mezcla se debería conseguir de tal forma que no se destruyan las cápsulas. Los mezcladores se pueden seleccionar para una aplicación específica basada, al menos en parte, en el tipo y cantidad de ingredientes utilizados, cantidad de ingredientes utilizados, cantidad de producto que se va a producir y el caudal. En general, se puede utilizar un mezclador disponible en el mercado tales como los disponibles en Invensys APV of Getzville, NY o Silverson Machines, Inc. of East Longmeadow, MA.

El producto de bebida o formulación se puede homogeneizar y/o pasteurizar. Las bebidas se pueden adicionalmente procesar o post procesar después de la adición de las bacterias probióticas encapsuladas. El post procesamiento puede incluir, por ejemplo, el enfriamiento de la solución de producto, y la carga en un recipiente para el envasado y distribución. El post procesamiento puede incluir también la desaireación del producto a < 4,0 ppm de oxígeno, preferentemente < 2,0 ppm y más preferentemente < 1,0 ppm de oxígeno. La desaireación, sin embargo, y otras tareas de post procesamiento se pueden llevar a cabo antes del procesamiento, antes de la pasteurización, antes de la mezcla con las cápsulas y/o al mismo tiempo que se añaden las cápsulas. Además, se puede mantener un espacio superior con un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno) durante el procesamiento intermedio del producto y el envasado final. Adicional o alternativamente, se podría utilizar una barrera de oxígeno y/o neutralizante de oxígeno

en el envasado final.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, el producto de bebida o formulación comprende zumos no de un concentrado (NFC) y/o de concentrados. Los zumos adecuados para su uso en algunos o todos los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento incluyen, por ejemplo, zumos de fuentes de frutas o verduras. Ciertos ejemplo ejemplares y no limitantes de dichos productos bebibles o formulaciones comprenden uno o más zumos de cítricos, por ejemplo, zumo de naranja no de concentrado (NFC). Otros tipos de zumos de frutas o verduras incluyen pero no se limitan a zumos de cítricos (por ejemplo, naranja, pomelo, limón, lima, mandarina, tangelo), melocotón, manzana, kumquat, mango, pera, albaricoque, piña, papaya, fura de la pasión, uva, fresa, frambuesa, arándano, pasas de corinto, soja, arándano azul, mora, acai, lichi, kiwi, granada, sandía, aronia, tomate, apio, cucurbitáceas, cebolla, berro, pepino, zanahoria, perejil, remolacha, ruibarbo, espárragos, nabo, colinabo, y una combinación de cualquiera de ellos. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebida o formulación comprende zumo de frutas (por ejemplo, zumo de naranja y/o zumos de otros cítricos) en una cantidad de desde aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 100 % por peso del producto de bebida, por ejemplo, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 100 % por peso, aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 90 % por peso, aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 75 % por peso, aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 50 % por peso, o aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 30 % por peso.

En ciertas realizaciones ejemplares, el producto de bebida o formulación puede incluir un componente vegetal, que incluye, pero no se limita a, uno o más zumos de verduras, extractos, polvos, pieles, cáscaras, molidos, raíces, pulpas, pulpas homogeneizadas, purés, o cualquier combinación de los mismos. El componente vegetal puede utilizarse en el producto de bebida o formulación en cualquier cantidad o concentración eficaces para conseguir el nivel de sabor deseado. Cuando se incluye en la mezcla, la relación de zumo de frutas respecto al zumo de verduras puede variar, dependiendo de la manera en el que se mezclan los zumos de verduras y de fruta y/o el producto de bebida que se va a producir. La relación de zumo de fruta respecto al de verduras variará para ajustarse a una aplicación particular y puede incluir, por ejemplo, desde 0:100 a 100:0, por ejemplo, 2:1, 3:1 o 3:2. En ciertas realizaciones ejemplares, la mezcla de zumo de fruta y zumo de verduras comprende aproximadamente un 80 % - 60 % de zumo de fruta y aproximadamente un 20 % - 40 % de zumo de verduras. En ciertas realizaciones ejemplare, la relación de zumo de fruta respecto al de verduras es aproximadamente de 80:20; sin embargo, se contemplan otras relaciones y están dentro del ámbito de la divulgación.

Los productos bebibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cualquier ingrediente o cualquiera combinación de ingredientes, o cualquiera sustancia o cualquier combinación de sustancias, que se puedan utilizar o preparar para su uso como una bebida por un mamífero, e incluye, pero no se limita a, formulaciones líquidas listas para beber, concentrados de bebidas, jarabes, polvos y similares. Los productos bebibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a bebidas carbonatadas y no carbonatadas, bebidas de grifo, bebidas congeladas listas para beber, bebidas congeladas carbonatadas, concentrados de bebidas, concentrados en polvo, bebidas de café, bebidas de té, bebidas de lácteos, aguas aromatizadas, aguas mejoradas, zumos de frutas, batidos, bebidas con sabor a zumo de fruta, bebidas con sabor a fruta, bebidas deportivas, bebidas de soja, bebidas hidratantes, bebidas energéticas, bebidas de agua fortificada/mejorada, bebidas de verduras, bebidas basadas en granos, bebidas de malta, bebidas fermentadas, bebidas de yogur, bebidas de kéfir, bebidas alcohólicas, y mezclas de cualquiera de ellas. Los productos bebibles incluyen adicionalmente, por ejemplo, bebidas con todas las calorías y bebidas con calorías reducidas (por ejemplo, ligeras, de dieta, cero calorías). Los productos bebibles incluyen, botellas, latas y productos en cartón y aplicaciones de jarabe de grifo.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento se utilizan como envases botellas de PET (tereftalato de polietileno) capaces de contener 355 ml (12 onzas de fluido) para la bebida. Los procedimientos de conservación adecuados para al menos ciertas realizaciones ejemplares de los productos bebibles desvelados en el presente documento incluyen, por ejemplo, envasado aséptico y/o tratamiento por calor o etapas de procesamiento térmico, por ejemplo, pasteurización en túnel, llenado en caliente, llenado en frío, refrigeración, etc. Dichas etapas se pueden utilizar para reducir el crecimiento de levaduras mohos y microbiano en los productos bebibles. Por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 4.830.862 de Braun y col. Desvelan el uso de la pasteurización en la producción de bebidas de zumos de fruta, así como el uso de conservantes adecuados en las bebidas carbonatadas. En general, el tratamiento con calor incluyen los procedimientos de carga en caliente utilizando lateas temperaturas durante un tiempo corto, por ejemplo , aproximadamente 87 ºC (190 ºF) durante 10 segundos o aproximadamente 92 ºC durante 4 segundos, los procedimientos de pasteurización en túnel utilizan normalmente temperaturas más bajas durante un tiempo más largo, por ejemplo, aproximadamente 71,1 ºC (160 ºF) durante 10-15 minutos, y procedimientos de retorta que utilizan normalmente, por ejemplo, aproximadamente 121 ºC (250 ºF) durante 3-5 minutos a presión elevada, es decir, a una presión por encima de 2 atmósfera. Muchos productos de carga en frío se deben refrigerar también para asegurar una vida de almacenamiento adecuada. Las temperaturas de carga en frío son las que se encuentran por debajo del intervalo de carga en caliente, necesitando algunas técnicas temperaturas justo por encima de la temperatura ambiente, algunas a 7,2 ºC (45 ºF), y algunas a 65,5-71 ºC (150-160 ºF). La carga en frío se ha utilizado tradicionalmente para la leche y otros artículos lácteos distintos, aguas minerales y vinos, cervezas y zumos. Los fabricantes de zumo normalmente combinan la carga en frío y combinaciones de pasteurización en combinación con distribución y almacenamiento refrigerados. Los zumos de carga en frío que se venden en estado refrigerado normalmente se envasan en botellas de plástico o cartones con la parte superior inclinada.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes desveladas en el presente documento, los productos bebibles incluyen, por ejemplo, formulaciones liquidas listas para beber, concentrados de bebidas y similares. En al menos ciertas realizaciones ejemplares de los productos de bebida contemplados se preparan con un volumen inicial de zumo o concentrado de zumo al que se añaden ingredientes adicionales. Los productos bebibles de energía completa pueden formarse a partir de concentrado de bebida añadiendo volúmenes adicionales de agua y/u otros disolventes al concentrado. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes de los productos bebibles y las formulaciones desveladas en el presente documento, el disolvente puede incluir, por ejemplo, agua, etanol, glicerina, propilenglicol, alcohol bencílico, isopropanol, triacetina, o mezclas de cualquiera de ellos. En ciertas otras realizaciones, un producto de bebida de energía completa se prepara directamente sin la formación de un concentrado y la posterior dilución.

Las expresiones “concentrado de bebida” y “jarabe” se utilizan de manera intercambiable a lo largo de la presente divulgación. Al menos ciertas realizaciones ejemplares de los productos bebibles contemplados se preparan con un volumen inicial de agua a la que se añaden ingredientes de bebida adicional. Los productos bebibles de energía completa se pueden formar a partir de concentrado de bebida añadiendo volúmenes adicionales de agua al concentrado (también conocido como dilución). Normalmente, por ejemplo, los productos de energía completa se pueden preparar a partir de concentrados combinando aproximadamente 1 parte de concentrado con entre aproximadamente 3 a aproximadamente 7 partes de agua. En ciertas realizaciones ejemplares el producto de bebida de energía completa se prepara combinando una parte de concentrado con 5 partes de agua. En ciertas otras realizaciones, una bebida de energía completa se prepara directamente sin la formación de un concentrado y la posterior dilución.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, el producto de bebida comprende zumo con agua añadida. Se puede utilizar agua purificada en la fabricación de ciertas realizaciones ejemplares de los productos bebibles o formulaciones desveladas en el presente documento, y se puede emplear agua de una calidad de bebida convencional con el fin de no afectar adversamente el sabor, olor o apariencia del producto de bebida o formulación. El agua será normalmente clara, incolora, libre de minerales, sabores u olores inaceptables, libre de materia orgánica, baja en alcalinidad y de calidad microbiológica aceptable basándose en las referencias de la industria y el gobierno aplicables en el momento de la producción del producto de bebida o formulación. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, el agua se añade a un nivel de desde aproximadamente un 0 % a un 90 % por peso del producto de bebida, por ejemplo, de aproximadamente 15 % a aproximadamente un 80 % por peso, de aproximadamente 40 % a aproximadamente un 70 % por peso, o de aproximadamente 50 % a aproximadamente un 60 % por peso. En ciertas realizaciones ejemplares el agua que se utiliza en las bebidas y concentrados desvelados en el presente documento es “agua tratada”, que se refiere a agua que se ha tratado para retirar sustancialmente todo el contenido mineral del agua antes de la suplementación adicional con cualquiera de los componentes descritos en el presente documento como se desvela en la Patente de EE. UU. N.º 7.052.725. Los procedimientos para la producción de agua tratada se conocen por los expertos en la técnica e incluyen desionización, destilación, filtración y ósmosis inversa (“R-O”) entre otros. Las expresiones “agua tratada”, “agua purificada”, “agua desmineralizada”, “agua destilada”, y “agua R-O” se entiende que son sinónimos en general en el presente tratad, en referencia al agua de la que se ha retirado sustancialmente todo contenido mineral, que contiene normalmente no más de aproximadamente 500 ppm de solidos totales disueltos, por ejemplo, no más de aproximadamente 250 ppm.

Se pueden incluir distintos edulcorantes en las formulaciones de los productos bebibles o formulaciones desvelados en el presente documento. Los edulcorantes son consumibles comestibles adecuados para el consumo y para su uso en productos bebibles. Por “consumibles comestibles” se quiere decir un alimento o bebida o un ingrediente de un alimento o bebida para el consumo humano o animal. Los edulcorantes o agentes edulcorantes adecuados utilizados en ciertas realizaciones ejemplares desveladas en el presente documento incluyen ingredientes o aditivos de bebidas naturales y no nutritivos (o mezclas de cualquiera de ellos) que proporcionan dulzor a la bebida, es decir, que se perciben como dulces por el sentido del gusto. La percepción de agentes saborizantes y agentes edulcorantes puede depender hasta cierto punto de la interrelación de los elementos. El sabor y el dulzor pueden percibirse también por separado, es decir, la percepción del sabor puede depender uno del otro y ser independientes uno del otro. Por ejemplo, cuando se utiliza una gran cantidad de agente saborizante, puede ser fácilmente perceptible una pequeña cantidad de agente edulcorante y viceversa. Por lo tanto, la interacción oral y olfatoria entre un agente saborizante y un agente edulcorante puede implicar la interrelación de elementos.

Los edulcorantes adecuados para su uso en distintas realizaciones ejemplares y no limitantes de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento incluyen los edulcorantes naturales. Los edulcorantes adecuados y combinaciones de edulcorantes se seleccionan por las características nutricionales deseadas, perfil de sabor, sensación en boca del producto de bebida o formulación y otros factores organolépticos. Los edulcorantes naturales adecuados para al menos ciertas realizaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, eritritol, tagatosa, sorbitol, manitol, xilitol, maltosa, ramnosa, trealosa, glicirricino, amlitol, lactosa, Lo Han Guo (“LHG”), un rebaudiósido, un glicósido de esteviol, extracto de *Stevia rebaudiana*, xilosa, arabinosa, isomalta, lactitol, maltitol y ribosa, edulcorantes proteicos (por ejemplo, taumatina, monelina, brazzeína, monatina, etc.), y similares o combinaciones de los mismos. Los edulcorantes naturales no nutritivos adecuados para algunas o todas las realizaciones de productos bebibles o formulaciones desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, un rebaudiósido (por ejemplo, un concentrado en zumo de rebaudiósido o rebaudiósido en polvo que tiene un contenido de rebaudiósido de desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 99 %, por ejemplo,

desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 1,0 %), otros glicósidos de esteviol (por ejemplo, un concentrado de zumo de glicósido de esteviol o polvo de glicósido de esteviol que tiene una contenido en esteviósido de desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 99 %, por ejemplo, desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 1,0 %),extracto de *Stevia rebaudiana*, Lo Han Guo (por ejemplo, zumo concentrado de LHG o LHG en polvo que tiene un contenido en mogrósido V de desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 99 %), monatina, glicirricina, taumatina, monelina, brazzeína, y similares o mezclas de dos cualquiera o más de ellos. También, en ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento, se utilizan combinaciones de uno o más edulcorantes naturales para proporcionar dulzor y otros aspectos del perfil de sabor deseados y características nutritivas. Se debería reconocer también que ciertos dichos edulcorantes actuarán adicionalmente o en vez de, como saborizantes, agentes enmascaradores o similares en distintas realizaciones de los productos bebibles y formulaciones desvelado en el presente documento, por ejemplo, cuando se utilizan en cantidades por debajo de su (o sus) umbrales de percepción del dulzor en el producto de bebida o formulación en cuestión.

Ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento incluyen edulcorantes naturales no nutritivos, que incluyen, pero no se limitan a rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, esteviolbiósido, esteviósido, dulcósido A, otros glicósidos de esteviol, extracto de *Stevia rebaudiana*, Lo Han Guo (por ejemplo concentrado de zumo de LHG, LHG en polvo, o mogrósido V), taumatina, monelina, brazzeína, monatina, y similares o mezcla de dos cualquier o más de ellos. Si se utiliza LHG, puede tener, por ejemplo, un contenido en mogrósido V de desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 99 %. Opcionalmente el edulcorante o componente edulcorante puede incluir eritritol, tagatosa, o una mezcla de los dos. Los edulcorantes no nutritivos de alta potencia se utilizan normalmente en nivel de miligramos por onza de fluido de producto de bebida dependiendo de distintos factores, por ejemplo, su poder edulcorante, cualquier norma reguladora aplicable del país donde se va a comercializar el producto de bebida, el nivel deseado de dulzor del producto de bebida, etc. Estará en el nivel de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar edulcorantes adicionales o alternativos adecuados para su uso en distintas realizaciones de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento.

Como se ha mencionado anteriormente, al menos ciertas realizaciones ejemplares de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento pueden emplear un glicósido de esteviol, un rebaudiósido, extracto de *Stevia rebaudiana* o compuesto relacionados endulzar. La estevia (por ejemplo, *Stevia baudiana* Bertoni) es una planta de sabor suave con hojas que contienen una mezcla compleja de glicósidos diterpenos naturalmente dulces. Estos edulcorantes se pueden obtener, por ejemplo, mediante extracción u otros procedimientos distintos conocidos en la técnica. Normalmente, estos compuestos edulcorantes se encuentran para incluir, por ejemplo, esteviósido, esteviolbiósido, los rebaudiósidos (incluyendo, por ejemplo, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E), y dulcósido A. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes se incluye un edulcorante derivado de Stevia en el producto de bebida en una cantidad de entre aproximadamente 0,005 % - 1,00 % por peso, por ejemplo, entre aproximadamente un 0,05 %-1,0 %, o entre aproximadamente un 0,5 % -1.0 %.

El edulcorante Lo Han Guo, que tiene diferentes ortografías y pronunciaciones se abrevia en el presente documento en algunos casos como LHG, se puede obtener del fruto de una planta de la familia Cucurbitaceae, tribu Jolllifieae, subtribu Thladianthinae, género Siraitia. El LHG a menudo se obtiene del género/especie *S. grosvenorii, S. siamensis, S. silomaradjae, S. sikkimensis, S. africana, S. borneensis,* y *S. taiwaniana*. El fruto adecuado incluye el del género/especie S. grosvenorii que a menudo se le llama fruto Luo Han Guo. El LHG contiene glucósidos triterpenos o mogrósidos, cuyos constituyentes se pueden utilizar como edulcorantes LHG. El Lo Han Guo es un potente edulcorante que se puede proporcionar como un edulcorante nutritivo natural o no nutritivo. Por ejemplo, el zumo concentrado de Lo Han Guo puede ser un edulcorante nutritivo, y el polvo de Lo Han Guo puede ser un edulcorante no nutritivo. En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, se puede utilizar el Lo Han Guo como un zumo o concentrado de zumo o en polvo, etc. El zumo de LHG puede incluir al menos aproximadamente un 0,1 % (por ejemplo, desde un 0,1 % a aproximadamente un 15 %), mogrósidos (por ejemplo, el mogrósido V, mogrósido IV, 11-oxo-mogrósido V), siamenósido y mezclas de cualquiera de ellos. En ciertas realizaciones ejemplares, se puede utilizar el Mogrósido V derivado de LHG como un edulcorante natural no nutritivo. El LHG se puede producir, por ejemplo, como se expone en la Patente de EE. UU. N.º 5.411.755. También se pueden utilizar edulcorantes de otras frutas, verduras o plantas como edulcorantes naturales o procesados o potenciadores del dulzor en ciertas realizaciones ejemplares de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, un “edulcorante no nutritivo” es el que no proporciona un contenido calórico significativo en cantidades de utilización típicas, es decir, es el que imparte menos de 5 calorías por ración de 236 ml (8 onzas de fluido) del producto de bebida para conseguir un dulzor equivalente a 10 Brix de azúcar. Normalmente, se utilizan las tablas de Briz en la industria de bebidas para determinar el contenido en azucares de una composición en particular, el nivel de Brix puede medirse utilizando cualquier tecnología adecuada, tal como refractómetros, hidrómetros, y similares. La medición de Brix define la relación de azúcar respecto a agua y no tiene en cuenta la gravedad específica de la composición. Como se utiliza en el presente documento un “producto de bebida reducido en calorías” significa un producto de bebida que tiene al menos un 25 % de reducción de calorías por ración de 236 ml (8 onzas de fluido) del producto de bebida en comparación con la versión de calorías

completas, normalmente una versión de calorías completas comercializada anteriormente. Como se utiliza en el presente documento, un “producto de bebida ligero” significa un producto de bebida que tiene al menos 1/3 menos calorías por ración de 236 ml (8 onzas de fluido) del producto de bebida en comparación con la versión completa en calorías, normalmente una versión completa en calorías comercializada previamente. Como se utiliza en el presente documento un “producto de bebida bajo en calorías” tiene menos de 40 calorías por ración de 236 ml (8 onzas de fluido) de producto de bebida. En ciertas realizaciones ejemplares, el producto de bebida y formulación desvelado en el presente documento es un producto de bebida de zumo de naranja ligero que tiene aproximadamente 50 calorías por ración de 236 ml (8 onzas de fluido).

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, se pueden añadir ingredientes adicionales a los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento. También se puede hacer referencia a estos ingredientes adicionales como ingredientes alimentarios o de bebidas e incluyen, pero no se limitan a, acidulantes, colorantes, saborizantes, minerales, vitaminas, zumos de frutas, sabores a fruta, u otros productos de fruta, otros modificadores del sabor (ro ejemplo, saborizantes, enmascaradores del sabor, y similares), potenciadores del sabor, agentes tampón (por ejemplo sales de sodio y potasio de los ácidos cítrico, tartárico, láctico y similares) ,conservantes (por ejemplo, benzoatos, sorbatos y similares) sales, espesantes, y agentes antiespumantes, cualquiera de los cuales se puede añadir normalmente solos o en combinación a distintos productos bebibles o formulaciones para variar el sabor, la sensación en boca, las características nutricionales, etc. La carbonatación en forma de dióxido de carbono se puede añadir para la efervescencia. Opcionalmente se puede añadir cafeína. Los ingredientes adecuados adicionales o alternativos serán reconocidos por los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden un acidulante como ingrediente de bebida adicional. Los acidulantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos orgánicos, benzoato sódico, bisulfatos metálicos, y similares o combinaciones de los mismos. Los ácidos orgánicos utilizados en ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes de los productos bebibles pueden servir para una o más funciones adicionales, por ejemplo, prestando acidez al sabor del producto de bebida o formulación, aumentando la palatabilidad, aumentado el efecto de apagar la sed, actuando como un conservante suave, etc. Los ácidos orgánicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido adípico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido succínico, ácido maleico, y similares o combinaciones de los mismos. Otros ácidos adecuados se conocen y serán evidentes para los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación. El ácido o ácidos particulares que se escojan y la cantidad utilizada dependerá en parte de otros ingredientes. La vida de almacenamiento deseada del producto de bebida o formulación, así como los efectos sobre el producto de bebida o formulación del nivel de pH, acidez titulable, sabor y similares. Estará en el nivel de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar un ácido o combinación de ácidos adecuados y la cantidad de ácidos necesaria para el componente acidulante de cualquier realización particular de productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento. Por ejemplo, ciertas realizaciones del producto de bebida o formulación pueden incluir uno o más ácidos orgánicos en una cantidad de desde aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1,0 % por peso del producto de bebida, por ejemplo, aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 0,7 % por peso, o aproximadamente un 0,3 % a aproximadamente un 0,6 %, o aproximadamente un 0,7 % a aproximadamente un 0,8 % por peso.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden un colorante como ingrediente de bebida adicional. Como se utiliza en el presente documento, se pretende que “colorante” signifique cualquier compuesto que da color, e incluye, pero no se limita a, un pigmento natural, un pigmento sintético, un aditivo de color, y similares o mezclas de cualquiera de ellos. Se pueden utilizar tanto colores naturales como artificiales. Se pueden utilizar uno o más tintes FD&C (por ejemplo, amarillo nº 5, azul nº 2, rojo nº 40, etc.) y/o lacas FD&C para colorear las soluciones, productos alimentarios o bebidas, ola composiciones desveladas en el presente documento. Los colorantes en laca ejemplares incluyen, pero no se limitan a las lacas aprobadas por la FDA (por ejemplo, una laca roja nº 40, amarilla nº 6, azul nº 1, y similares o mezcla de las mismas). De manera adicional, se puede una mezcla de colorantes FD&C o un colorante en laca FD&C en combinación con otros colorantes alimentarios o alimento convencional. Ejemplos de otros agentes colorantes adecuados incluyen, pero no se limitan a agentes naturales, zumos de futas y verduras y/o polvos, color caramelo, riboflavina, carotenoides (por ejemplo, betacaroteno) tumérico, licopenos, y similares o combinaciones de los mismos. La cantidad exacta de agentes colorantes utilizada variará dependiendo de los agentes utilizados y la intensidad deseada en el producto acabado. En general, si se incluyen, el agente colorante debería estar a un nivel de desde aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 0,5 %, desde aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,1 %, o desde aproximadamente un 0,004 % a aproximadamente un 0,1 % por peso o volumen del producto de bebida o formulación. Los colorantes adicionales o alternativos y sus cantidades necesarias respetivas serán reconocidos por los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden un saborizante como un ingrediente adicional de la bebida. Los saborizantes incluyen, por ejemplo, sabores a fruta, sabores botánicos, sabores especiados, modificadores del sabor y similares. Los saborizantes pueden estar en forma de un extracto, aceite esencial, oleorresina, concentrado de zumo, base de embotelladora, u otras formas conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones ejemplares, el especiado u otros

sabores complementan el de un zumo o combinación de zumos. Los saborizantes ejemplares adecuados para su uso incluyen el sabor de cola, sabor a té, sabor cítrico, sabor a bayas, sabor piante, y similares o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones ejemplares desveladas en el presente documento, el saborizante puede estar presente en una concentración de desde aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 0,4 % por peso del producto alimentario o bebida final (por ejemplo, desde aproximadamente un 0,050 % a aproximadamente un 0,20 %, desde aproximadamente un 0,80 % a aproximadamente un 0,150 %, desde aproximadamente un 0,09 % a aproximadamente un 0,120 % por peso). Los saborizantes adicionales y alternativos adecuados y sus cantidades necesarias respetivas serán reconocidas por los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden una cantidad deseada de uno o más sabores de fruta como ingrediente adicional de la bebida. Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, la expresión “sabor a fruta” se refiere a cualquier fracción de fruta, componente de fruta (por ejemplo, cáscaras, pieles, mesocarpio, pericarpio, pulpa, flores (por ejemplo, pétalos), hojas, tallos, semillas, y similares), a partir del sabor de la fruta denominada (FTNF) (por ejemplo, una combinación de esencia de fruta, aceite de fruta y/o sabor a fruta (por ejemplo, una naranja del sabor a fruta denominado, etc.), extracto de fruta (por ejemplo, exprimido, absorbido, macerado, destilado y similar), aceite de fruta (por ejemplo, aceite esencial, aceite esencial plegado, etc.), esencia de fruta, puré de fruta, aroma de fruta, y similares o combinaciones de los mismos que se pueden añadir a un producto alimentario o bebida para aumentar el sabor (por ejemplo, para proporcionar y/o aumentar una o más notas de sabores). Los sabores a fruta incluyen, pero no se limitan a, los sabores derivados de la naranja (por ejemplo, mandarina, vanel, Valencia, etc.), mandarina, tangelo, mineola, kumquat, clementina, toronja, limón, limón rugoso, lima, lima lich, pomelos, manzana, uva, pera, melocotón, nectarina, albaricoque, ciruelas, ciruelas pasas, granadas, moras, arándanos azules, frambuesas, fresas, cerezas, arándano rojo, pasas, grosella espinosa, mora de Boysen, arándano de ciervo, mora, dátil, piña, banana, papaya, mango, lichi, fruta de la pasión, coco, guayaba, kiwi, sandía, melón, melón de miel, y similares o combinaciones de cualquiera de ellos (por ejemplo, macedonia de frutas). En ciertas realizaciones ejemplares se utilizan uno o más sabores de frutas cítricas. El sabor cítrico puede incluir uno o más de una fracción de naranja, un componente de naranja, un extracto de naranja, un aceite esencial de naranja, un aceite esencial de naranja doblado, un aroma de naranja, una esencia de naranja, y similares o combinaciones de los mismos. El sabor cítrico puede incluir también uno o más de una fracción, componente, extracto, aceite esencial, aceite esencial doblado, aroma o esencia de toronja, limón, lima o mandarina entre otros. El sabor cítrico puede incluir también compuestos químicos extraídos de fuentes naturales o producidos sintéticamente (por ejemplo, limoneno, octanol y sus derivados, acetaldehído, α-pineno, β-pineno, mirceno, octanal, linalool, carono, decanal, citral, sinensal y similares). En ciertas realizaciones ejemplares, el sabor a fruta está presente nena cantidad de desde aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,05 % por peso, o en una cantidad de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,5 % por peso. Los sabores a fruta adicionales y alternativos adecuados y sus cantidades necesarias respectivas serán reconocidos por los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden un sabor botánico como ingrediente adicional de la bebida. Como se utiliza en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas, la expresión “sabor botánico” se refiere a sabores derivados de partes de una planta distinta de una fruta. Como tal, los sabores botánicos pueden incluir los sabores derivados de aceites esenciales y extractos de furos secos, corteza, raíces y hojas. Ejemplos de dichos sabores incluyen, pero no se limitan a, sabores de cola, sabores a té, sabores especiados, y similares o mezclas de cualquiera de ellos. Los sabores botánicos adicionales o alternativos adecuados serán reconocidos por los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden un sabor especiado como ingrediente de la bebida adicional. Ejemplos no limitantes de sabores especiados incluyen canela china, clavo, canela, pimienta, jengibre, vainilla, cardamomo, cilantro, zarzaparrilla, sasafrás, ginseng, y otros. En ciertas realizaciones ejemplares desveladas en el presente documento, dichos sabores a especies y otros se complementan con los de un sabor a fruta. Los sabores especiados alternativos y adicionales adecuados serán reconocidos por los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden un modificador del sabor como ingrediente adicional de la bebida. Los modificadores del sabor pueden proporcionar su propio sabor característico, o pueden tener un poco o ningún impacto por sí mismos. Los modificadores del sabor tienen cualquiera de una o más de las propiedades de reducir, enmascarar, o eliminar características de sabor indeseables, o aumentando las características de sabor deseables, por ejemplo, controlando uno o más de dulzor, acritud, amargor, salinidad, sensación en boca, o efectos temporales sobre el sabor. Ejemplos no limitantes de características de sabor indeseables reducidas por los modificadores de sabor incluyen uno o más de regusto amargo, regusto metálico, astringencia, sensación en boca aguada, aspereza, aparición tardía del dulzor, dulzor persistente, exceso de acritud y otras notas. Ejemplos no limitantes de características de sabor deseables aumentadas por los modificadores del sabor incluyen uno o más de intensidad o impacto del dulzor, plenitud o cuerpo, y suavidad, entre otros. Ejemplos no limitantes de modificadores del sabor incluyen, pero no se limitan a, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido

tartárico, ácido láctico, ácido adípico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido succínico, ácido maleico, entre otros), propilenglicol, glicerol, etanol, productos disponibles en el mercado (por ejemplo, Symrise™ Natural Flavor, Sweetness Enhancer Ttipo SWL 196650, Firmenich Natural Flavor (Modulasense™ Type) 560249 T, y Firmenich™ Natural Flavor (Modularome™ Tipo) 539612 T, etc.), y similares y combinaciones de los mismos. Estarán en la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar modificadores del sabor alternativos o adicionales adecuados para su uso en distintas realizaciones de los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento, se pueden utilizar uno o más saborizantes en forma de emulsión. Una emulsión saborizante se puede preparar mezclando algunos o todos los saborizantes, opcionalmente junto con otros ingredientes del producto de bebida, y un agente emulsionante. El agente emulsionante se puede añadir con o después de los agentes saborizantes que se mezclaron juntos. En ciertas realizaciones ejemplares, el agente emulsionante es hidrosoluble. Ejemplos ejemplares y no limitantes de agentes emulsionantes adecuados incluyen la goma arábiga, almidón modificado, carboximetilcelulosa, goma de tragacanto, goma ghatti, otras gomas ejemplares, etc. Los agentes emulsionantes adicionales adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica de las formulaciones bebibles, dado el beneficio de la presentes divulgación. El emulsionante en las realizaciones ejemplares comprende más de aproximadamente un 3 % por peso de la mezcla de agentes saborizante y emulsionante. En ciertas realizaciones ejemplares el emulsionante es desde aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 30 % de la mezcla. Estará en la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar cantidades adecuadas de emulsionante para su uso en distintas emulsiones de los productos bebibles y las formulaciones desveladas en el presente documento.

Agentes de peso, que también actúan como agentes de turbidez, se utilizan normalmente para mantener las gotas de la emulsión dispersas en la bebida. Ejemplos de dichos agentes de peso incluyen, pero no se limitan a, aceites vegetales bromados, ésteres de rosina, ésteres de gomas, y similares o combinaciones de los mismos. Los agentes de peso comunes disponibles en el mercado son adecuados para su uso en los productos de bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento. Además de los agentes de peso, se pueden utilizar emulsionantes y estabilizadores de la emulsión para estabilizar las gotas de emulsión de sabores. Ejemplos de dichos emulsionantes y estabilizantes de la emulsión incluyen, pero no se limita a, gomas, pectinas, celulosas, polisorbatos, ésteres de sorbitán, polietilenglicol, alginatos, y similares o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes, el producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento comprende dióxido de carbono como ingrediente adicional. El dióxido de carbono se utilizar para proporcionar efervescencia a ciertas realizaciones ejemplares de los productos bebibles y formulaciones desveladas en el presente documento. Se puede emplear cualquiera de las técnicas y equipamiento de carbonatado conocidas en la técnica para bebidas carbonatadas. El dióxido de carbono puede aumentar el sabor de la bebida y la apariencia y puede ayudar a salvaguardar la pureza de la bebida inhibiendo y destruyendo bacterias inaceptables. En ciertas realizaciones, por ejemplo, el producto de bebida o la formulación tiene un nivel de CO_2 de hasta aproximadamente 7,0 volúmenes de dióxido de carbono. Las realizaciones típicas pueden tener, por ejemplo, desde aproximadamente 0,5 a 5,0 volúmenes de dióxido de carbono. Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones independientes, un volumen de dióxido de carbono se define como la cantidad de dióxido de carbono absorbido por cualquiera cantidad de agua determinada a 16 ºC (60 ºF) de temperatura y a la presión atmosférica. Un volumen de gas ocupa el mismo especio que el agua por la que es absorbido. El contenido de dióxido de carbono pueden seleccionarlo los expertos en la técnica basándose en el nivel de efervescencia deseado y el impacto del dióxido de carbono sobre el sabor y la sensación en boca del producto de bebida o formulación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebidas o formulación desvelados en el presente documento comprende cafeína como un ingrediente adicional de la bebida. La cantidad de cafeína añadida se determina por las propiedades deseadas del producto de bebida o formulación, cualquier norma reguladora aplicable en el país donde el producto de bebida o formulación se van a comercializar, etc. La cafeína debe ser de una pureza aceptable para su uso en alimentos y bebidas. La cafeína puede ser natural (por ejemplo, de kola, nueces de cacao, café y/o té) o de origen sintético. En ciertas realizaciones, la cantidad de cafeína puede ser desde aproximadamente un 0,002 % a aproximadamente un 0,05 % por peso del producto de bebida o formulación. En ciertas realizaciones, la cantidad de cafeína es desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,02 % por peso del producto de bebida. En ciertas realizaciones la cafeína se incluye a un nivel del 0,02 % o menos por peso del producto de bebida. Para los concentrados o jarabes, el nivel de cafeína puede ser desde aproximadamente un 0,006 % a aproximadamente un 0,15 %. Los niveles de cafeína pueden ser mayorees, por ejemplo, si se utilizan cafés saborizados que no se han descafeinado ya que estos materiales contienen cafeína naturalmente. Estará en la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar las cantidades adecuadas de cafeína para su uso en distintas realizaciones de los productos bebibles y formulaciones desveladas en el presente documento.

En ciertas realizaciones ejemplares, los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento son naturales ya que no contienen nada artificial o sintético que no se esperaría normalmente que esté en un alimento. En ciertas realizaciones ejemplares, los productos bebibles y formulaciones desveladas en el presentes documento no contienen edulcorantes. En ciertas realizaciones ejemplares, los productos bebibles y formulaciones

desvelados en el presente documento están edulcorados naturalmente con un edulcorante natural no nutritivo. Como se utiliza en el presente documento, un ingrediente “natural” de la bebida se define de acuerdo con las siguientes directrices: Los materiales en bruto para un ingrediente natural existe o se origina en la naturaleza. La síntesis biológica que implica fermentación y enzimas se puede emplear, pero la síntesis con reactivos químicos no se utiliza. Los colorantes artificiales, conservantes, y sabores no se consideran ingredientes naturales. Los ingredientes se pueden procesar o purificar a través de ciertas técnicas especificadas, por ejemplo, procedimientos físicos, fermentación, enzimólisis, etc. Los procedimientos apropiados y las técnicas de purificación incluyen, pero no se limitan a, absorción, adsorción, aglomeración, centrifugación, machacado, cocinado (por ejemplo, horneado, fritura, hervido, tostado, etc.) del enfriamiento, corte, cromatografía, revestimiento, cristalización, digestión, secado (por ejemplo, secado por pulverización, congelación, al vacío, etc.), evaporación, destilación, electroforesis, emulsificación, encapsulación, extracción, extrusión, filtración, fermentación, picado, infusión, maceración, microbiología (por ejemplo, cuajo, enzimas), mezclado, pelado, percolación, refrigeración/congelación, exprimido, remojo, lavado, calentamiento, mezclado, intercambio iónico, liofilización, ósmosis, precipitación, desalación, sublimación, tratamiento ultrasónico, concentración, floculación, homogenización, reconstitución, enzimólisis (por ejemplo, utilizando enzimas de origen natural), y similares o combinaciones de los mismos. Las ayudas al procedimiento (actualmente definidas como sustancias utilizadas como ayudas a la fabricación para aumentar el atractivo o utilidad de un componente alimentario, incluyendo agente clarificantes, catalizadores, floculantes, sistemas de filtro e inhibidores de la cristalización, etc. véase 21 CFR § 170.3(o)(24)) se consideran aditivos incidentales y se pueden utilizar si se eliminan apropiadamente.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden un mineral como ingrediente adicional de la bebida. Los minerales adecuados incluyen, pero no se limitan a, calcio añadido, cloruro, cromo, potasio, magnesio, fósforo, sodio, sulfuro, cobalto, cobre, fluoruro, yodo, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, vanadio, zinc, hierro, y similares o combinaciones de los mismos. Los minerales se pueden añadir de cualquier forma compatible con las necesidades nutricionales humanas y se pueden añadir a cualquier nivel deseado. Las cantidades en el producto de bebida o formulación pueden ser cualquier porcentaje adecuado de la ingesta diaria de referencia (RDI). Por ejemplo, el mineral puede estar presente en un límite superior de aproximadamente: un 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, o aproximadamente un 500 % del RDI. El mineral puede estar presente en un límite inferior de aproximadamente: 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, o aproximadamente un 300 % del RDI. De manera alternativa, la cantidad de mineral añadido se puede medir en unidades internacionales (UI) o peso/peso (p/p). Se debería entender que el término “añadido” (por ejemplo, “calcio añadido”) como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas se refiere a un componente añadido obtenido de fuentes externas y no incluyen un componente que está presente de manera inherente en el producto de bebida o formulación. Por ejemplo, “calcio añadido” como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas significa que el calcio se obtiene de fuentes externas y no incluye un componente que esté de manera inherente en el producto de bebida o formulación. Los minerales añadidos adecuados para los productos bebible se y formulaciones desvelados en el presente documento se pueden derivar de cualquier fuente de nutriente conocida o de otra manera eficaz que proporcione el mineral dirigido por separado. Por ejemplo, las fuentes de calcio añadido incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, citrato cálcico, fosfato cálcico, o cualquier otra fuente de calcio adecuada para su uso en un producto de bebida o formulación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden una vitamina como un ingrediente adicional de la bebida. Las vitaminas adecuadas incluyen pero no se limitan a, Vitamina A añadida (incluyendo precursores de vitamina A, por ejemplo beta caroteno), Vitamina B_1 (es decir, tiamina), Vitamina B_2 (es decir, riboflavina), Vitamina B_3 (es decir, niacina), Vitamina B_6, Vitamina B_7 (es decir, biotina), Vitamina B_9 (es decir, ácido fólico), Vitamina B_{12} (es decir, cobalamina), Vitamina C (es decir, ácido ascórbico), Vitamina D y Vitamina E (es decir, tocoferoles y tocotrienoles), y Vitamina K y similares o combinaciones de las mismas. Las vitaminas se pueden añadir en cualquier forma compatible con las necesidades nutricionales humanas y se pueden añadir a cualquier nivel deseado. Las cantidades en el producto de bebida o formulación pueden ser cualquier porcentaje adecuado de la ingesta diaria de referencia (RDI). Por ejemplo, la vitamina puede estar presente en un límite superior de aproximadamente: un 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, o aproximadamente un 500 % del RDI. La vitamina puede estar presente en un límite inferior de aproximadamente: 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, o aproximadamente un 300 % del RDI. De manera alternativa, la cantidad de vitamina añadida se puede medir en unidades internacionales (UI) o peso/peso (p/p). Por ejemplo, una ración de un producto de bebida puede contener un 100 % del RDI de cada una de Vitamina E, Vitamina B3 (niacina), Vitamina B5 (ácido pantoténico), Vitamina B6 y Vitamina B12. Las vitaminas añadidas adecuadas para los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento se pueden derivar de cualquier fuente de nutrientes conocida o de otra manera eficaz que proporcione la vitamina diana por separado.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento incluyen pulpa homogenizada. La pulpa homogenizada aumenta la sensación en boca del producto de bebida o formulación proporcionando un aumento de la viscosidad. Además, la pulpa homogenizada proporciona sabor a fruta añadido (por ejemplo, sabor a naranja de la pulpa de naranja), y añade dulzor al producto de bebida o formulación. En ciertas realizaciones ejemplares, la pulpa homogenizada comprende pulpa de cítricos, por ejemplo,

pulpa de naranja, pulpa de pomelo, pulpa de limón, pulpa de lima, entre otros, y mezclas de cualquiera de ellos. Como se utiliza en el presente documento, pulpa de cítricos se define como los sacos de zumo rotos y los segmentos de pared recuperados tras el procedimiento de extracción del zumo de cítrico. Como se utiliza en el presente documento "pulpa homogenizada" se define como partículas de pulpa suspendidas en una solución acuosa y no separadas de la suspensión. La pulpa homogenizada se puede producir por distintas técnicas de homogenización, utilizando un equipamiento, por ejemplo, un mezclador o moledora coloidal. En ciertas realizaciones ejemplares la pulpa homogenizada tiene un tamaño de particular medio de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 micrómetros de diámetro, aproximadamente 70 a aproximadamente 100 micrómetros, o aproximadamente 150 a aproximadamente 250 micrómetros; donde al menos un 80 % de las partículas de pulpa homogenizada están entre los 50 y 540 micrómetros de diámetro. En ciertas realizaciones ejemplares, el producto de bebida o formulación incluye la pulpa homogenizada en una cantidad de desde aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % por peso el producto de bebida o formulación, por ejemplo, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 % por peso.

Opcionalmente, se pueden añadir ingredientes adicionales conocidos o que se espera que tengan efectos beneficiosos. Por ejemplo, el producto de bebida o formulación pueden contener uno o más de los siguientes: aceites (por ejemplo, omega-3, omega-6, etc.), hierbas y especias. Los ingredientes de hierbas y especias pueden estar en forma de extracto. Cualquier hierba y especie adecuadas conocidas en la técnica se pueden utilizar como ingrediente. Las hierbas y especias ejemplares que se pueden añadir incluyen, pero no se limitan a, Kava Kava, hierba de San Juan, Saw Palmetto, ginseng, y similares.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes los productos bebible y formulaciones desvelados en el presente documento comprenden al menos un agente tampón como ingrediente adicional de la bebida. Los agentes tampón se utilizan normalmente para ajustar el pH. Dichos ajustadores del pH incluyen, pero no se limitan a, las sales de sodio o potasio del ácido cítrico, tartárico, málico, fumárico, cinámico, maleico, adípico, glutárico, láctico y succínico o una combinación de estas. La cantidad de agente tampón incluido dependerá, por supuesto, del tipo de agente tampón y del grado al que se vaya a ajustar el pH. Los agentes tampón adicionales y alternativos y sus respectivas cantidades necesarias serán reconocidos por los expertos en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento tienen un pH con un límite inferior de aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,75, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,75, aproximadamente 3,8, o aproximadamente 4,0 y un límite superior de aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,8, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,2, o aproximadamente 4,5. En ciertas realizaciones ejemplares, el intervalo de pH es de 3,4 a 4,0. En ciertas realizaciones ejemplares, el pH es como mucho 4,5.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento comprende sal como ingrediente adicional. Las sales pueden actuar como un potenciador del sabor y la cantidad utilizada variará, dependiendo de la sal que se utilice y la intensidad deseada en el producto terminado. Ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruros de un álcali o metal alcalinotérreo (por ejemplo, cloruro potásico, cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, etc.), glutamatos, (por ejemplo, glutamato monosódico) y similares o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento comprenden un espesante como ingrediente adicional. Como se hace referencia en el presente documento "espesante" puede incluir cualquier material que aumente la viscosidad o aumente la sensación en boca tipo crema del producto de bebida o formulación. Ejemplos de espesantes adecuados para su uso en los productos bebibles o formulaciones desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, proteínas, grasa, lípidos, hidrocoloides, gomas y similares o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones el espesante puede comprender, goma arábiga, goma de karaya, goma de tragacanto, goma ghatti, agar-agar, goma guar, goma de algarrobo, konjac, alginatos, carragenanos, pectina, goma tara, goma de xantano, goma gelan, pululan, curdlan, celulosa, celulosa microcristalina, goma de carboximetilcelulosa, gelatina, quitosano, maltodextrina, o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento comprende un agente antiespumante como ingrediente adicional. Ejemplos de agentes antiespumantes adecuados para su uso en los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, Silicona AF-100 FG (Thompson-Hayward Chemical Co.), 'Trans' Silicona Antifoam Emulsion (Trans-Chemco, Inc.), y 1920 Powdered Antifoam (Dow Corning Chemical). La cantidad de agente antiespumante que se utilice se determina por la cantidad mínima necesaria para evitar la formación de espuma excesiva durante el procesamiento del producto de bebida o formulación y, si se desea por el consumidor del producto de bebida o composición, para evitar la excesiva formación de espuma durante el procesamiento del alimento o producto de bebida en el que se va a incorporar el producto. Los agentes antiespumantes adicionales adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica e formulaciones bebibles, dado el beneficio de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento comprende un aroma químico como ingrediente adicional. En ciertas realizaciones ejemplares, el aroma

químico puede incluir cualquier químico designado por la Flavor and Extract Manufacturers' Association (FEMA) como Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS). Un producto químico designado como GRAS por la FEMA se ha ensayado utilizando ciertas convenciones y se considera seguro para su uso en seres humanos. Los aromas químicos GRAS ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aldehído acético, ácido acético, acetato de Isoamilo, 3-metilbutanol, butirato de isoamilo, hexanoato de isoamilo, isovalerato de isoamilo, benzaldehído, ácido benzoico, acetato de bencilo, alcohol bencílico, cinamato de bencilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, butanol, isobutanol, butirato de butilo, butirato de isobutilo, isobutirato de butilo, hexanoato de butilo, propionato de isobutilo, butiraldehído, isobutiraldehído, ácido butírico, ácido isobutírico, cinamaldehído, ácido cinámico, 2,3-butanodiona, acetato de etilo, acetoacetato de etilo, benzoilacetato de etilo, butirato de etilo, isobutirato de etilo, cinamato de etilo, heptanoato de etilo, hexanoato de etilo, lactato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, propionato de etilo, piruvato de etilo, valerato de etilo, isovalerato de etilo, 2-heptanona, hexanal, ácido hexanoico, hexanol, cetona de frambuesa, α-ionona, β-ionona, ácido láctico, 2-metilbutiraldehído, isovaleraldehído, ácido 2-metil butírico, cinamato de metilo, 2-metilbutirato de metilo, propionato de metilo, propionaldehído, ácido propanoico, propanol, ácido pirúvico, ácido valérico, ácido isovalérico, vainillina, 4-metil-5-hidroxietil tiazol, acetona, ácido heptanoico, 2-metilbutirato de 2-metilbutilo, 2-isopropil-5-metil-2-hexenal, 3-hidroxibutirato de etilo, isovalerato de 2-metilbutilo, isobutirato de isoamilo, ácido tíglico, acetato de D-2-metilbutilo, L-2-metilbutanol, metanol, ciclopentadecanona, anhídrido acético, y otros compuestos. Los aromas químicos GRAS se pueden extraer de fuentes naturales o producirse sintéticamente. Estará en la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar un aroma químico adecuado o combinación de aromas químicos adecuados para su uso en productos bebibles y formulaciones de acuerdo con la presente divulgación.

En ciertas realizaciones ejemplares y no limitantes el producto de bebida o formulación desvelados en el presente documento comprende un conservante como ingrediente adicional. Es decir, al menos ciertas realizaciones ejemplares contienen un sistema de conservante disuelto. Las soluciones con un pH menor que 4 y especialmente las que están por debajo de 3 normalmente son "microestables" es decir, resisten el crecimiento de microorganismos, y por lo tanto son adecuadas para un almacenamiento más largo antes del consumo sin necesidad de conservantes adicionales. Sin embargo, se puede utilizar un sistema de conservante adicional si se desea. Si se utiliza un sistema de conservante, se puede añadir al producto de bebida en cualquier momento adecuado durante la producción, por ejemplo, en algunos casos antes de la adición del edulcorante. Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "sistema de conservante" o "conservantes" incluyen todos los conservantes aprobados para su uso en alimentos y composiciones bebibles, incluyendo sin limitación, dichos conservantes químicos conocidos como los benzoatos, por ejemplo, benzoato de sodio, calcio, y potásico, sorbatos, por ejemplo, sorbato sódico, cálcico y potásico, citratos, por ejemplo citrato sódico y citrato potásico, polifosfatos, por ejemplo hexametafosfato sódico (SHMP) y mezcla de los mismos, y antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico, EDTA, BHA, BHT, TBHQ, ácido deshidroacético, dimetildicarbonato, etoxiquina, heptilparabeno, etc. Otros conservantes adecuados para su uso en los productos bebibles y formulaciones desvelados en el presente documento incluyen los conservantes naturales, por ejemplo, nisina, ácido cinámico, extracto de hollejo de uva, sal, vinagre, y similares. Estará en la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar un aroma conservante adecuado o combinación de conservantes adecuada para su uso en los productos bebibles y formulaciones de acuerdo con la presente divulgación.

Los conservantes se pueden utilizar en cantidades que no excedan los niveles máximos recomendados bajo las leyes y regulaciones aplicables. El nivel de conservante utilizado normalmente se ajusta de acuerdo con un pH final planeado para el producto, así como una evaluación del potencial de los desechos microbianos potenciales de la formulación bebible particular. El nivel máximo que es emplea es normalmente de aproximadamente un 0,05 % por peso del producto de bebida o formulación. Estará en la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar una cantidad adecuada de conservante para los productos y formulaciones de acuerdo con la presente divulgación.

Ciertos procedimientos ejemplares, productos bebibles y formulaciones de acuerdo con la divulgación se describen con más detalle en los ejemplos que se presentan a continuación a modo de ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1

El uso de biopolímeros de calidad alimentaria, aislado de proteína de suero de leche y alginato, como agentes encapsulantes para las bacterias probióticas se investigó. Más particularmente, se estudiaron dos relaciones diferentes de aislado de proteína de suero de leche y alginato en la fabricación de cápsulas que comprendían bacterias probióticas, y se comparó con las cápsulas que comprendían un 100 % de proteína de suero de leche o un 100 % de alginato.

Se adquirió aislado de proteína de suero de leche (~60 % de β-lactoglobulina y un 20 % de α-lactoalbúmina) en Fonterra (Palmerston North, Nueva Zelanda) y el Na-alginato de alta viscosidad (Protonal SF120) fue suministrado por Hawkins Watts (Auckland, Nueva Zelanda). El *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 fue adquirido en Environmental Science and Research (ESR, Wellington, Nueva Zelanda) y se cultivó en caldo MRS Lactobacilli (Difco, Nueva Zelanda) a 37 ºC en condiciones anaeróbicas (GasPak EZ anaerobe container system, Becton,

Dickinson and Company, USA). Los cultivos activados se obtuvieron sub-cultivando 2-3 veces en caldo MRS durante 24 horas a 37 ºC antes de su uso en los experimentos.

Las células bacterianas probióticas (5,4 x 10^8 UFC/g) cultivadas en 800 ml de MRS se recolectaron por centrifugación a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 ºC (Hitachi High Speed Centrifuge, Massey University, Palmerston North). El aglomerado (de ~ 5 g) se añadió a agua estéril con un 0,1 % de peptona (30 ml) y se agitó para resuspender el aglomerado. Esta etapa de lavado se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. Se llevaron a cabo la tinción de Gram y ensayos de catalasa para la confirmación de los lactobacilos.

Las bacterias se numeraron utilizando el procedimiento de placapour con Agar MRS Lactobacilli (Difco). Se digirieron cápsulas (de 1 g) en 9 ml de tampón de fosfato (pH 7,1 ± 0,1) utilizando un digestor durante hasta 30 minutos. No fue necesario digerir las células libres. Se preparó una serie de diluciones utilizando las mezclas de tampón de fosfato/microcápsulas digeridas en agua estéril con un 0,1 % de peptona (1 ml de muestra en 9 ml de agua con peptona). Se añadió agar MRS fundido a 1 ml de muestra y se incubaron las placas en condiciones anaeróbicas durante 72 horas a 37 ºC antes de que se hiciera el recuento de colonias.

$$Factor\ de\ dilución\ incial = \frac{Peso\ de\ la\ muestra}{Peso\ de\ la\ muestra + Peso\ de\ peptona}$$

$$Dilución\ posterior = \frac{Volumen\ de\ dilución\ transferido}{Volumen\ de\ dilución + Volumen\ de\ dilución\ del\ blanco}$$

$$UFC/_{g}\ de\ muestra = Colonas\ en\ la\ placa\ x\ \frac{1}{Factor\ de\ dilución\ inicial\ x\ diluciones\ posteriores}$$

Se preparó una solución de un 1 % de peso por volumen (p/v) de alginato sódico el día antes del trabajo experimental y se dejó agitando toda la noche para permitir la hidratación completa. Se preparó una solución (1000 ml) de aislado de proteína de suero de leche (WPI) al 12 % (p/v) y se calentaron 500 ml a 90 ºC durante 30 min para asegurar la desnaturalización completa de las proteínas antes de enfriarse a temperatura ambiente. Se prepararon las mezclas de alginato y WPI de acuerdo con el diseño experimental mostrado en la Tabla 1 posterior, y se dejó que se mezclaran a temperatura ambiente durante dos horas para permitir la dispersión completa. A esta solución, se añadieron 2,5 ml de la dispersión celular para obtener una concentración teórica final de 1 x 10^{10} UFC/g y se permitió que se mezclara durante 30 minutos adicionales. Las muestras se incubaron entonces en un baño de agua a 44 ºC ± 2 ºC durante 15 minutos.

Tabla 1. Diseño experimental para la optimización de materiales de encapsulación

Ejecución	Concentración de WPI (%)	Concentración de Alginato (%)	Etapa de desnaturalización
1	100	0	Térmica
2	75	25	Térmica
3	50	50	Térmica
4	0	100	-

Preparación de microcápsulas

Se colocaron ochenta mililitros de una solución de cloruro cálcico a un 4 % p/v, que se utilizó como fluido de coagulación, en un matraz y se agitó lentamente utilizando un agitador magnético. Se introdujeron gota a gota veinte mililitros de la mezcla de dispersión WPI/alginato/células en el fluido de coagulación. Las cápsulas se endurecieron en cloruro cálcico durante 30 minutos antes de lavarlas dos veces con agua Milli-Q (es decir, agua purificada y desionizada), entonces se almacenaron en agua estéril en recipientes estériles. La mitad de las cápsulas se refrigeraron a 4 ºC ± 1 ºC en condiciones anaeróbicas utilizando un sistema de envase anaeróbico, y la otra mitad se congeló a -21 ºC ± 1 ºC durante una noche antes de secarse por congelación durante 72 horas a -25 ºC ± 2 ºC. Las perlas secadas por congelación se refrigeraron entones a 4 ºC ± 1 ºC en condiciones anaeróbicas. Todo el equipamiento se esterilizó antes de su uso.

Morfología de las capsulas

La morfología de las cápsulas húmedas se observó en un microscopio óptico digital. Las perlas secadas por congelación también se observaron bajo microscopia electrónica de barrido (SEM, FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope, USA,). Se utilizó un microscopio de disección para seleccionar muestras de perlas representativas que se montaron posteriormente en soportes de aluminio con plata conductora. Las muestras se revistieron por pulverización con oro y se observaron bajo un SEM con una tensión acelerada de 20 KV.

Ejemplo 2

Estudios de degradación de las cápsulas en condiciones gástricas e intestinales simuladas

Se observó el comportamiento de las cápsulas secadas y húmedas que se prepararon en el Ejemplo 1 en fluido gástrico simulado (SGF, pH 2,0), como se esperaba que el proceso de secado afectara el tamaño de poros y otros atributos de las cápsulas podía haber influenciado en la estabilidad en el SGF.

Se preparó un SGF (pH 2 ± 0,1) que contenía un 0,2 % de NaCl, un 0,7 % de HCl y un 0,3 % de pepsina. Se añadió aproximadamente 1 gramo de células encapsuladas por separado en tubos de ensayo que contenían 9 mililitros de SGF. Los tubos de ensayo se incubaron a 37 ºC durante 2 horas con agitado continuo (150 rpm) en un baño de agua con agitado. A las dos horas de incubación se seleccionó el tiempo para representar el tiempo medio de tránsito a través del estómago. Se determinó el peso de las cápsulas inicialmente y luego cada hora hasta las 2 horas. A continuación, las cápsulas se retiraron del SGF y se colocaron en el fluido intestinal simulado (SFI, pH 7,4 ± 0,1, 37 ºC) y se pesaron a intervalos de media hora hasta que se observó una degradación completa.

Ejemplo 3

Análisis de la textura

Las cápsulas del Ejemplo 1 se evaluaron en cuanto a sus características de textura utilizando un Texture Analyzer XT-2 (TA XT-2) Plus system (Stable Micro Systems, Surrey, UK). El análisis de textura se llevó a cabo con los ajustes que se muestran posteriormente en la Tabla 2. El pistón bajó, se mantuvo en contacto con la parte superior de las cápsulas y aplastó la cápsula a una velocidad constante de 0,2 milímetros por segundo (mm/s), hasta que alcanzó el 90 % de su altura original. Se registró la fuerza ejercida por la cápsula en función del desplazamiento. La velocidad de retorno del pistón a su posición original antes de la compresión era de 10 mm/s. La fuerza necesaria para la deformación se registró en función del tiempo hasta la fractura de las cápsulas. Se obtuvo una curva de fuerza de compresión para cada muestra y se almacenó en un archivo para el cálculo de las propiedades de fractura utilizando el software "XT.RAD Dimension", versión 3.7H, de Stable Micro System (Surrey, UK). De cada medición se determinaron la tensión y la presión en el momento de la fractura. La tensión de fractura se asocia con el primer pico de los gráficos, que representan la fuerza en función al desplazamiento. Para las cápsulas, se calcularon las tensiones considerando el área como el área de una esfera y asumiendo una disipación de la fuerza interna de las perlas en todas direcciones.

Tabla 2. Ajustes del Texture AnalyzerXT-2 Plus para los ensayos de compresión de la cápsula

Artículo	Ajuste
Tipo de ensayo	Compresión
sonda	Sonda cilíndrica de 35 mm
Velocidad antes del ensayo	0,05 mm/s
Velocidad del ensayo	0,1 mm/s
Velocidad tras el ensayo	2 mm/s
Modo de presión diana	50 %
Fuerza del disparador	0,01 N

Ejemplo 4

Morfología de la cápsula

Las cápsulas producidas en el Ejemplo 1 eran predominantemente esféricas u ovoides, como se muestra en la FIG. 1. Las cápsulas producidas con alginato puro eran regulares y esféricas; sin embargo, según aumentaba el contenido en proteínas de suero de leche, las microcápsulas se volvían más ovoides e irregulares. La superficie de las cápsulas húmedas parecía variable, presentando las cápsulas de WPI pura una superficie de caballete desigual, como se muestra en la FIG. 1A, y presentando las perlas de alginato una superficie más suave (no mostrado). Sin embargo, la técnica de microscopía digital no podía detectar otras características de superficie tales como la porosidad y las cavidades. La FIG. 1B incluye una barra de escala que tiene una longitud de 500 µm, para proporcionar una referencia del tamaño de la cápsula fotografiada que comprende una relación de peso de proteína respecto a alginato de 75:25.

Las cápsulas de alginato eran blancas y translúcidas; sin embargo, según aumentaba el contenido en WPI, las cápsulas se volvían progresivamente más blancas y opacas. Sin el deseo de quedar unidos por teoría alguna, esto puede ser debido al aumento del número de sitios de unión para los iones de Ca^{2+} como resultado del aumento de contenido en proteínas de suero de leche, dando lugar de esta manera a una estructura de gel reticulada más densamente.

Microscopía electrónica de barrido

En referencia a la FIG. 2, se proporcionan las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de distintas cápsulas secadas por congelación. La forma ovoide y esférica de las cápsulas se volvía ligeramente irregular después del secado por congelación, como se muestra en la FIG. 2A, que proporciona una imagen de una cápsula toda de WPI, y en la FIG. 2B que proporciona una imagen de una cápsula de WPI:alginato 50:50. El tamaño de las microcápsulas variaba según el procedimiento de desnaturalización de las proteínas del suero de leche y el contenido proteico de las proteínas del suero de leche. Como muchas cápsulas no eran esféricas se utilizó su longitud más larga para estimar su diámetro. Se determinó que el tamaño de partícula de la cápsula tenía un diámetro aproximado de 750 µm a 1500 µm (0,75-1,5 mm), y se volvía más largo según aumentaba la concentración de WPI.

La fotografía de la superficie variaba entre las cápsulas con una superficie más rugosa observada en las cápsulas de WPI, en comparación con las cápsulas de alginato. La FIG. 2C muestra la estructura de la superficie altamente porosa de las cápsulas secadas por congelación de WPI puro. Las imágenes SEM de las cápsulas de alginato con la misma magnificación no muestran la misma porosidad; sin embargo, investigadores anteriores han documentado la presencia de poros en la estructura de cápsulas de alginato (Anal y col., 2003; Anal y Stevens, 2005).

Las secciones fracturadas de las cápsulas secadas por congelación indicaban que la estructura de las cápsulas consistía en una pared exterior sólida que cubría una red fibrosa interna que presentaba alta porosidad (no mostrada). Las células de L. acidophilus se observaban en todos los tipos de cápsula y la distribución de las células atrapadas en las cápsulas parecía ser más homogénea en las células del interior que en la superficie. La FIG. 2D muestra una imagen de SEM de células de L. acidophilus observadas en la superficie de una cápsula de WPI puro secada por congelación.

Ejemplo 5

Estudios de degradación de capsulas en condiciones gástrica e intestinal simuladas

Un objetivo de las realizaciones era proporcionar cápsulas que fueran estables en SGF y se degradaran durante un periodo de tiempo en SIF, para permitir que el material encapsulado activo alcanzara el colon. La bibliografía indica que el tiempo medio de vaciado gástrico es de dos horas y que se tardan 3-4 horas después de la liberación al duodeno para que las cápsulas ingeridas alcancen el colon (Anal, 2007).

Para determinar la velocidad a la que las cápsulas producidas de acuerdo con el Ejemplo 1 se degradaban en el tracto intestinal, se incubaron las cápsulas en fluidos gástricos simulados a 37 ºC. El peso de las cápsulas se siguió durante un periodo de cuatro horas tanto en SGF (pH 2,0 ± 0,1) y SIF (pH 7,4 ± 0,1). En referencia a la FIG. 3, la velocidad de degradación de las cápsulas era mayor en SIF que en SGF para las cápsulas fabricadas con solo alginato, 75:25 WPI:alginato, y 50:50 WPI: alginato. Estos resultados reflejan probablemente las diferencias en el comportamiento químico de las cápsulas entre los fluidos. Las cápsulas de WPI puro se degradaron rápidamente en el SGF con una degradación de aproximadamente el 95 % después de dos horas de incubación. Según disminuía la concentración de WPI y aumentaba la concentración de alginato, la velocidad de degradación también disminuía como se muestra en la FIG. 3.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, se cree que el comportamiento de degradación de WPI en el SGF es principalmente debido la presencia de pepsina, la enzima que se encuentra en el SGF. La pepsina es una enzima proteolítica que ataca los enlaces peptídicos, produciendo la rotura del aislado de proteínas de suero de leche y por lo tanto la estructura de la cápsula. En comparación, las cápsulas de 75:25 WPI:alginato y las cápsulas de 50:50 WPI:alginato presentaban una velocidad de degradación más lenta en los primeros sesenta minutos de incubación, como se indica en el gráfico de la FIG. 3. El componente de alginato puede contraerse en condiciones ácidas para proporcionar una barrera eficaz para la penetración de la pepsina, o potencialmente las cápsulas de WPI pueden ser más fáciles de dirigirse para el ataque de la pepsina.

El comportamiento del alginato en condiciones ácidas se había descrito por investigadores (George y Abraham, 2006). Los valores de la pKa del ácido manurónico y gulurónico, los componentes fundamentales del alginato son de 3,38 y 3,65, respectivamente. La pKa del propio polímero está cerca de la pKa para los monómeros individuales y varía de acuerdo con la fuerza iónica del disolvente y la concentración de alginato. Sin embargo, se ha observado que, a un pH por debajo del valor de la pKa, el alginato precipita, se cree que como resultado de la despolimerización debido a hidrólisis catalizada por protones.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, se cree que, en las cápsulas fabricadas con ambos biopolímeros alimentarios de aislado de proteínas de suero de leche y alginato, el WPI forma cápsulas con las cadenas laterales hidrófobas embebidas en el centro de la cápsula y las cadenas laterales hidrófilas enfrente del alginato. Como la pepsina puede atacar preferentemente los aminoácidos aromáticos hidrófobos que están embebidos dentro de la cápsula, las cápsulas que contienen tanto WPI como alginato proporcionan una protección al WPI de la pepsina. Por el contrario, las cápsulas de WPI pueden presentarse como una diana más vulnerable para la pepsina y por tanto la degradación se presenta más fácilmente.

Empleando la lógica anterior, se esperaba que las cápsulas de alginato fueran las más estables en el SGF; sin embargo, como se muestra en la FIG. 3, este comportamiento no se observó. El encogimiento de las cápsulas, sin embargo, se observó a lo largo del experimento, pero era en conjunción con la erosión de la cápsula. Esto es potencialmente debido a que el alginato cargado positivamente se disocia del Ca^{2+} y permite que el gel se deshaga.

Una fotografía de las microcápsulas secadas antes de la incubación en los fluidos gástricos simulados se muestra en la FIG. 4A. Las cápsulas de WPI, 75:25 WPI:alginato y cápsulas de alginato eran degradadas rápidamente en el SIF con un 100 % de degradación después de treinta minutos. De las cápsulas las de 50:50 WPI:alginato eran las más estables en el SIF, tardando noventa minutos en degradarse. Como la pancreatina, una enzima proteolítica del fluido intestinal no degrada el alginato, puede esperarse que las cápsulas de alginato se hinchen y formen un hidrogel en el SIF, dando lugar a su degradación. Por el contrario, se podría esperar que las cápsulas WPI se degradaran rápidamente por la pancreatina.

En referencia a la FIG. 4B, las cápsulas de WPI:alginato 50:50 se encontraban hinchadas y flotando después de la incubación en SGF durante dos horas, pero se mantenían intactas. Al transferirlas al fluido intestinal, las cápsulas comenzaban a desintegrarse como se muestra en la FIG. 4C, que proporciona una fotografía de las cápsulas después de la incubación en SIF durante dos horas. Se descubrió que la desintegración de las cápsulas era dependiente del pH. A bajo pH los enlaces iónicos en las cápsulas persisten, de manera que los materiales de la matriz de gel de la perla se mantienen intactos. Después de la transferencia a pH> neutro, el alginato aniónico en el complejo Ca-alginato- WPI podría ser desplazado por iones hidroxilo. Una fotografía de las cápsulas después de la incubación en SIF durante ocho horas se proporciona en la FIG. 4D.

Ejemplo 6

Análisis del perfil de textura

Las propiedades mecánicas de las cápsulas definen la deformación y ruptura de la cápsula bajo una carga externa. Estas propiedades son importantes cuando se considera al protección y liberación de materiales a lo largo del procesamiento y sistemas de suministro cuando la ruptura puede desearse o no. En términos de procesamiento alimentario, las cápsulas deben tener una fuerza considerable para evitar la ruptura cuando se exponen a fuerza de cizallamiento cuando se desplazan a lo largo del equipamiento de procesamiento. La ruptura podría potencialmente exponer las bacterias encapsuladas al entorno donde la degradación y pérdida de biodisponibilidad pueden producirse.

Hay una limitada investigación disponible sobre las propiedades de cápsulas de WPI:alginato, que parecen enfocarse en los procedimientos de fabricación y la estabilidad gástrica de las cápsulas. En consecuencia, hay datos limitados de las propiedades mecánicas de las cápsulas. Por lo tanto, los efectos del WPI sobre la fuerza mecánica de las cápsulas de alginato se ha investigado. Las microcápsulas de WPI, alginato y WPI-alginato cargadas con *L. acidophilus* se obtuvieron por la solución de goteo que contenía los biopolímeros y las células bacterianas probióticas en un fluido de coagulación de cloruro cálcico. La combinación de alginato y WPI desnaturalizado térmicamente presentaba una alta eficacia y cápsulas fuertes, capaces de atrapar *L. acidophilus*.

El gráfico de la media fuerza-tiempo para la compresión de las cápsulas se muestra en la FIG. 5. Se muestran las cápsulas de WPI, cápsulas de 75:25 WPI:alginato y las cápsulas de 50:50 WPI:alginato. Las cápsulas de WPI y las cápsulas de alginato muestran más rigidez que las cápsulas de combinación (es decir, las cápsulas WPI:alginato) como se ilustra por la pendiente inicial escalonada del gráfico de la FIG. 5. No se observaba fracturabilidad con el 50 % de compresión y todas las muestras ensayadas presentaban una pequeña cantidad de adhesividad, como es evidente por las fuerzas negativas del gráfico.

En referencia ahora a ambas FIG. 5 y FIG. 6, se muestra el pico de fuerza que alcanzaba el 50 % de compresión de la altura total de las cápsulas. Se midieron diez repeticiones y se promedió para proporcionar los resultados para cada tipo de cápsula como se muestra en la FIG. 6. Las cápsulas de WPI eran significativamente más fuertes que el resto de las cápsulas, con un pico de fuerza de 1,57 N ± 0,2 N. Las cápsulas de 75:25 WPI:alginato alcanzaban la siguiente fuerza más alta, de 0,99 N ± 0,07 N, que no era significativamente diferentes de las cápsulas de 50:50 WPI:alginato, que tenían un pico de fuerza de 0,91 N ± 0,08 N. Las cápsulas ms débiles eran las cápsulas de alginato, que tenían un pico de fuerza de 0,77 N ± 0,08 N. Por lo tanto, con el aumento de la proporción de WPI había una tendencia a aumentar la fuerza. Esto puede ser debido al aumento del número de sitios de unión con los iones de Ca^{2+}, al aumentar el contenido de WPI.

En resumen, en los Ejemplos 12 a 6 se demuestra el desarrollo de un sistema de microencapsulación adecuado para bacterias probióticas (por ejemplo, *L. acidophilus*). Este sistema comprende combinaciones de proteínas de suero de leche desnaturalizadas y alginato como materiales de cápsula eficaz. Se descubrió que, por ejemplo, las mezclas de soluciones de aislado de proteínas del suero de leche en una concentración del 12 % (p/v) y de alginato a una concentración del 1 % (p/v) en relaciones de peso de 3:1 y 1.1 producían microcápsulas eficaces y fuertes.

Ejemplo 7

La estabilidad de las bacterias probióticas encapsuladas en condiciones gastrointestinales y a altas temperaturas se

investigó en este Ejemplo. La viabilidad de la actividad bioquímica de *L. acidophilus* se ha documentado bien en la bibliografía. El *L. acidophilus* no sobrevive bien en condiciones muy bajas de pH debido a que tiene un pH óptimo de 4-5 (Stanton y col., 2003). Cuando las células de *L. acidophilus* pasan a través del tracto gastrointestinal son susceptibles al daño del ácido del estómago y, por lo tanto, un número menor puede alcanzar el intestino grueso para su colonización. En consecuencia, un aspecto de las realizaciones de la invención es proporcionar una cápsula que sea resistente a la digestión en el estómago, de manera que se protejan las células bacterianas probióticas viables del entorno de pH bajo, y es susceptible a la degradación en las condiciones colónicas. Por lo tanto, se ensayó la eficacia de las cápsulas diseñadas en las condiciones gástricas.

Aunque la tolerancia al calor del *L. acidophilus* varía según la cepa, la temperatura óptima para el cultivo del *L. acidophilus* es de 37 ºC sobreviviendo algunas cepas bien a 50 ºC. Por encima de 50 ºC, la supervivencia de las células se reduce rápidamente y se ha citado como letal la temperatura de 60 ºC en la bibliografía (Kandler y Weiss, 1986). Actualmente, la aplicación de *L. acidophilus* en preparaciones probióticas se limita por la intolerancia del organismo a altas temperaturas. Como resultado, la eficacia de las cápsulas diseñadas como una barrara térmica también se investigó.

Viabilidad de las células microencapsuladas y libres (de *L. acidophilus*) en condiciones gástricas simuladas

Se prepararon las cápsulas y el fluido gástrico simulado (SGF) como se describió en el Ejemplo 1. Las cápsulas se lavaron en agua destilada y se añadieron a 9 ml de agua estéril con un 0,1 % de peptona, entonces se refrigeraron a 4 ºC ± 1 ºC durante una noche en condiciones anaeróbicas. Las células libres se colocaron en agua con peptona y también se refrigeraron durante una noche.

Aproximadamente 1 gramo de cápsulas y 1 ml de la suspensión de células libres se añadieron por separado a tubos de ensayo que contenía cada uno 9 ml de SGF. Las células libres se utilizaron como control en el experimento. Los tubos de ensayo se cubrieron e incubaron a 37 ºC durante dos horas bajo agitado continuo en un baño de agua con agitado. Después de una hora y dos horas e incubación se tomaron muestras de las suspensiones de cápsulas y células libres en SGF y se digirieron al día siguiente utilizando un digestor, durante hasta 30 minutos. Se enumeraron entonces los recuentos de células viables utilizando el procedimiento de placa pour.

Viabilidad de células microencapsuladas y libres (de *L. acidophilus*) bajo un tratamiento térmico

Para determinar el efecto del calor sobre la viabilidad de *L. acidophilus* encapsuladas y libres, las células se expusieron a un tratamiento térmico en agua destilada (pH 7,0 ± 0,1) de acuerdo con los procedimientos descritos por Mandal, Puniya y Singh (2006). Específicamente, las cápsulas y las células libres se expusieron a temperaturas de 50 ºC, 60 ºC, u 80 ºC durante 20 minutos. Un gramo de cápsulas y 1 ml de células recientes se colocaron en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada. Al final del tiempo de incubación, se retiraron las células y se añadieron a 9 ml de tampón fe fosfato 0, 1 M (pH 7,1 ± 0,1). El tampón y la dispersión celular se aplastaron en un digestor hasta que se obtuvo un a dispersión homogénea antes de enumerar el recuento de células viables de acuerdo con el Ejemplo 1. Las células libres no necesitaban esta etapa antes de la enumeración.

Viabilidad de células microencapsuladas y libres en condiciones gástricas simuladas

Células libres

Como se muestra en la FIG. 7, los recuentos viables de células libres (es decir, no encapsuladas) en fluido gástrico simulado (pH 2,0 ± 0,1, 37 ºC) disminuyó significativamente durante el periodo de incubación con una reducción de 6 log desde 9 log de UFC/ml a 3 log de UFC/ml después de 120 minutos. Mientras que la tolerancia al pH del *L. acidophilus* varía con la cepa, estos hallazgos son consistentes con lo que se sabe en general sobre el *L. acidophilus* y los hallazgos publicados en otros estudios. Krasaekoopt y col. (2004) descubrieron que las células de *L. acidophilus* se destruían en la misma extensión con una reducción de 6 log después de 120 minutos (pH 1,55, 37 ºC). Hood y Zottola (1988) publicaron que la viabilidad de las células de *L. acidophilus* disminuía rápidamente en una solución a pH 2, sin recuperación después de 45 minutos.

Células encapsuladas

Como se muestra en la FIG. 8, los recuentos de células viables de *L. acidophilus* contenidos en cápsulas de WPI o cápsulas de alginato en fluido gástrico simulado con pepsina (pH 2.0 ± 0,1) eran notablemente menores después de 120 minuto que con las cápsulas de WPI-alginato. Más particularmente, las cápsulas que consistían en 75:25 y 50:50 (WPI:alginato) eran las cápsulas más estables en el SGF. De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a un fluido con un pH 2,0 durante 120 minutos comprende de 0 a 1,0 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas.

Chen y Subirade (2007), que investigaron la liberación de riboflavina a partir de cápsulas de WPI y cápsulas de alginato, sugerían que la liberación más rápida de riboflavina de las cápsulas de WPI y las cápsulas de alginato era debido a la difusión directa de las estructuras internas más simples en comparación con la estructura más compleja de las cápsulas de WPI/alginato preparadas con emulsiones da gua en aceite. Además, la bibliografía indica que el alginato puede formar una capa protectora sobre la cápsula de WPI como resultado de la interacción entre el WPI y

el alginato. Una reacción química de transacilación entre la proteína y el alginato (Chen y col., 2006) implica la formación de enlaces amida entre la proteína y el alginato al añadirse un agente alcalinizante (por ejemplo, hidróxido sódico) a las cápsulas, y daba como resultado una membrana que se formaba sobre la superficie de la cápsula, Dicha membrana podía proteger la cápsula de la degradación de tensiones del entorno, por ejemplo, el pH y la actividad de la pepsina.

Las cápsulas de alginato eran al menos estables en fluido gástrico simulado sin células viables detectables (< 10^1 UFC/g) después de la incubación de 120 minutos, como se muestra en la FIG. 8. Como se ha expuesto, los estudios previos demostraron que las cápsulas de alginato son relativamente estables en los fluidos gástricos, y, por lo tanto, el bajo recuento celular es probablemente el resultado de la estructura porosa de las cápsulas que permite la entrada del SGF en la cápsula durante la incubación. Como resultado de la porosidad, el área de superficie expuesta al SGF puede haber sido lo suficientemente significativa para permitir que las bacterias se liberen en el medio circundante. Chandramouli y col. (2004) informaron de la liberación completa de bacterias *L. acidophilus* CSCC 2400 de cápsulas de alginato al 1 % dentro de los 10 minutos de incubación en SGF.

Viabilidad de células microencapsuladas y libres bajo tratamiento térmico

Las células libres y encapsuladas de *L. acidophilus* se incubaron a 37 ºC, 50 ºC, 60 ºC y 80 ºC durante 20 minutos en agua destilada (pH 7,0). Como se muestra en la FIG. 9 se observó una pequeña disminución, pero significativa del recuento de células libres de las células libres de *L. acidophilus* en la incubación de 37 ºC a 50 ºC ya que el recuento de células cayó del log 9,00 a log 8,61 UFC/g. Los recuentos de células viables se redujeron drásticamente a niveles no detectables después de la incubación a 60 ºC y 80 ºC, sugiriendo que los 60 ºC son letales para *L. acidophilus*. Estos resultados están de acuerdo con los que se conoce en general sobre el *L. acidophilus* y los resultados publicados en la bibliografía. Reinheimer y col. (1995) publicaron que las actividades proteolítica y acidificante de *L. acidophilus* eran altas a 37 ºC y a 40 ºC, pero caían a actividades insignificantes cuando las células se trataban con 55 ºC.

El recuento de células viables para las cápsulas de WPI eran log 7,11, 6,67, 6,43 y 3,20 UFC/g después de la incubación a 37 ºC, 50 ºC, 60 ºC y 80 ºC, respectivamente. La Figura 9 muestra que no se observaban diferencias significativas en el recuento de células viables entre 37 ºC, 50 ºC y 60 ºC sugiriendo que las cápsulas de WPI protegían las bacterias del daño térmico hasta a 60 ºC. Después de la incubación a 80 ºC durante 20 minutos, sin embargo, se observaba una reducción de 3 log en el número de bacterias viables. Para las cápsulas de 75:25 de WPI:alginato, los recuentos de bacterias viables disminuían significativamente de un log de 5,89 a un log 4,81 UFC/g tras la incubación durante 20 minutos a 50 ºC como se muestra en al FIG. 9. A cada temperatura de incubación de 50 ºC, 60 ºC y 80 ºC las cápsulas parecía que protegían las bacterias del daño térmico como se evidencia por no haber cambios significativos en el recuento de células viables observados entre las tres temperaturas, los recuentos viables para 50 ºC, 60 ºC y 80 ºC eran log 4,81, 4,88 y 4,53 UFC/g, respectivamente.

De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 50 ºC durante hasta 20 minutos en una solución a pH 7,0 comprende de 0 a 50 UFC/gramo de cápsulas. De manera similar, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 60 ºC durante hasta 20 minutos en una solución a pH 7,0 comprende de 0 a 1 x 10^4 UFC/gramo de cápsulas, preferentemente de 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas. La disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 80 ºC durante hasta 20 minutos en una solución de pH 7,0 comprende de 0 a 1 x 10^4 UFC/gramo de cápsulas, preferentemente de 0 a 1 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas.

De nuevo en referencia a la FIG. 9, no se observaba una diferencia significativa en el recuento de células viables entre la incubación a 37 ºC y 50 ºC para el *L. acidophilus* encapsulado en cápsulas de alginato, observándose recuentos de células de log 6,76 y log 6,46 UFC/g. Sin embargo, a 60 ºC y 80 ºC no se detectaron unidades formadoras de colonias sugiriendo que no se ofrecía protección térmica por las cápsulas de alginato por encima de 50 ºC. Las cápsulas que contenían proteínas del suero de leche presentaban un efecto protector térmico sobre la viabilidad de las células de *L. acidophilus*. Más que las células encapsuladas en alginato y libres. Sorprendentemente, las cápsulas que contenían WPI proporcionaban protección térmica a las células bacterianas incluso hasta a 80 ºC con las cápsulas de WPI, cápsulas de 75:25 WPI:alginato y cápsulas 50:50 WPI:alginato produciendo reducciones de log de 4, 2 y 4 UFC/g, respetivamente. Por lo tanto, las cápsulas de 75:25 WPI:alginato eran las más eficaces en la provisión de una barrera térmica para las bacterias encapsuladas.

Estos experimentos demuestran la capacidad de las bacterias probióticas para sobrevivir en condiciones térmicas y gastrointestinales. El número de células viables de las bacterias probióticas no encapsuladas disminuyó rápidamente en condiciones ambientales adversas, tales como las condiciones gástricas y térmicas, ilustrando su sensibilidad al estrés ácido y térmico. Al contrario que en las células libres, las cápsulas que comprenden WPI y alginato en combinaciones de 75:25 WPI:alginato y 50:50 WPI:alginato presentaban un efecto protector sobre las células de *L. acidophilus* a temperaturas hasta de 80 ºC. Además, en condiciones gástricas, estas cápsulas presentaban una protección significativa de las bacterias, proporcionando las cápsulas de 50: 50 WPI:alginato la mayor protección.

Ejemplo 8

Se investigó la estabilidad de los probióticos comerciales encapsulados bajo tratamiento térmico en condiciones ácidas en este Ejemplo. El creciente interés en las bacterias probióticas ha llevado a las industrias a enfocarse en incorporar los probióticos en distintos sistemas alimentarios. Los estudios indicaron, sin embargo, que las bacterias no pueden sobrevivir en número suficiente cuando se incorporan a los alimentos. En consecuencia, la provisión de probióticos con una barrera física contra la dureza de las condiciones ambientales durante el procesamiento de la producción de alimentos comerciales está recibiendo un considerable interés (Kailasapathy, 2002). Hasta la fecha, se ha llevado a cabo poca investigación con el objetivo de incorporar probióticos en alimentos ácidos tratados por calor como el zumo de frutas.

Cuando se desarrollan distintos alimentos que contienen probióticos, hay varios factores incluyendo la acidez titulable, el pH, el peróxido de hidrógeno, el contenido de oxígeno disuelto, la temperatura de almacenamiento, y las especies y cepas de microorganismos pueden afectar la viabilidad de los probióticos (Anal y Singh, 2007). Como se ha descrito previamente, las bacterias probióticas encapsuladas en perlas de WPI-alginato desarrolladas en el presente estudio podrían mejorar la viabilidad del *L. acidophilus* ATCC 4356 contra la dureza de las condiciones como el SGF o el tratamiento térmico alto.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio fueron *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis* HN019 (Howaru), que fueron proporcionados por Christian Hansen (Dinamarca) y Danisco (USA), respectivamente. Las bacterias se cultivaron en caldo MRS de lactobacillus (Difco Laboratories, Detroit, Milch.) a 37 ºC durante 24 horas en condiciones anaeróbicas (GasPak EZ anaerobe container system, Becton, Dickinson y Company, USA). Antes de su uso en los experimentos, las bacterias se subcultivaron al menos tres veces. El número de UFC se determinó por el procedimiento de recuento en placa con las diluciones de cultivo apropiadas como se describe en el Ejemplo 1.

Microencapsulación

Las células se propagaron en dos botellas que contenían 400 ml de caldo MRS durante 24 horas a 37 ºC en condiciones anaeróbicas, se recolectaron por centrifugación a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 ºC y luego se suspendieron en agua con un 0,1 % de peptona. Las cápsulas de 75:25 WPI-alginato se prepararon asépticamente con la suspensión celular de una botella, como se ha descrito en el Ejemplo 1, excepto que la concentración de WPI era del 10 % (p/v). La otra suspensión celular se utiliza para las células libres como una muestra de control.

Supervivencia de células libres y encapsuladas del tratamiento por calor en condiciones ácidas

Se determinó la tolerancia de *L. casei* y *B. lactis* al tratamiento por calor en condiciones ácidas incubando una cantidad (1 Gram o 1 mililitro) de cápsulas 75:25 WPI:alginato que contenían encapsuladas las células bacterianas, y células libres, en 9 ml de tampón fosfato (100 mM, pH 7,0) o tampón de ácido cítrico (10 mM, pH 3,5, 3,8 y 4,1) como medio de suspensión. Las condiciones del tratamiento fueron las siguientes:

1) 60 ºC durante 5, 10 y 20 minutos a pH 7

2) 60 ºC durante 5 y 10 minutos a pH 3,5

3) 60, 70 y 80 ºC durante 5 minutos a pH 3,5

4) 65 ºC durante 5 minutos a pH 3,8 y pH 4,1

5) 92 ºC durante 4 segundos a pH 3,5

Después de estos tratamientos, cada muestra se enfrió inmediatamente a temperatura ambiente y se enumeraron las células viables como se describe en el Ejemplo 1. Para las células encapsuladas tratadas con ácido, las cápsulas se transfirieron a 9 ml de tampón fosfato para ser despolimerizadas y luego digeridas utilizando un digestor durante hasta 30 minutos. Se tomaron entonces alícuotas de un mililitro y se enumeraron los recuentos celulares.

En referencia a la FIG. 10, las células libres de *L. casei* (véase la FIG. 10A) y *B. lactis* (véase la FIG. 10B) en tampón de fosfato (pH 7) se redujeron aproximadamente 2 y 3 log UFC/ml durante el tratamiento por calor a 60 ºC durante 10 minutos, respectivamente. Se descubrió que la supervivencia de las células encapsuladas de cada cepa se era mayor que en las células libres, con una supervivencia de aproximadamente 1,5 log UFC/ml para *L. casei* y aproximadamente 1 log UFC/ml para *B. lactis*. Después de 20 minutos de incubación a 60 ºC, la viabilidad de *L. casei* encapsulado era aproximadamente 2 log de UFC/ml mayor que las células libres, pero no había diferencia entre las células encapsuladas y libres para el *B. lactis*. De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 60 ºC durante hasta 10 minutos en una solución de pH 7,0 comprende de 0 a 1 x 10^3 UFC/ gramo de cápsulas, preferentemente de 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas. De manera similar, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 60 ºC durante hasta 20 minutos en una solución a pH 7,0 comprende de 0 a 1 x 10^4 UFC/gramo de cápsulas, preferentemente de 0 a 1 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas.

En referencia a la FIG. 11, los recuentos de células libres viables (*L. casei*) disminuyeron ¡, con una reducción aproximadamente de 3 log sobre el tratamiento por calor a 60 ºC durante 5 minutos cuando se exponían a un pH de 3,5, mientras que se observó una reducción de aproximadamente 2 log en las células viables tratadas a un pH neutro. Este resultado ilustra que el calor en condiciones de pH ácido puede reducir la viabilidad de los microorganismos en comparación con la condición de pH neutro. Las células encapsuladas de *L. casei* resultaron en una supervivencia mejor (aproximadamente 1 log UFC/ml mayor) que la de las células libres bajo un tratamiento por calor a 60 ºC durante cinco minutos a pH bajo de 3,5. También se observó una supervivencia más alta en *B. lactis* encapsulado en las mismas condiciones (datos no mostrados). Sin embargo, la microencapsulación no protegió ningún tipo de microorganismo después del tratamiento con calor durante 10 minutos a pH 3,5. De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 60 ºC durante hasta 5 minutos en una solución con un pH 3,5 comprende de 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas. De manera similar, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 60 ºC durante hasta 10 minutos en una solución con un pH 3,5 comprende de 0 a 1 x 10^5 UFC/gramo de cápsulas. Por el contrario, de acuerdo con aspectos de la invención la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 60 ºC durante hasta 5 minutos en una solución de pH 7,0 comprende de 0 a 50 UFC/gramo de cápsulas. De manera similar, la disminución de bacterias probióticas viable en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 60 ºC durante hasta 10 minutos en una solución de pH 7,0 comprende de 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas.

En referencia a la FIG. 12, cuando las células libres y encapsuladas de *L. casei* se exponían a temperaturas de 70 ºC y 80 ºC durante cinco minutos a pH 3,5, todas las células libres eran destruidas, mientras que como mucho aproximadamente un log 3,5 de las células encapsuladas calentadas a 70 ºC sobrevivían. Esta tasa de supervivencia es muy baja para aplicaciones prácticas, sin embargo, debido a que los comestibles deben contar con al menos 10^6-10^7 UFC de probióticos viables para que un alimento se venda afirmando ser saludable por la adición de probióticos. De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 70 ºC durante hasta 5 minutos en una solución de pH 3,5 comprende de 0 a 1 x 10^7 UFC/gramo de cápsulas.

En referencia a la FIG. 13, cuando las células libres y encapsuladas de *L. casei* se expusieron a un pH 3,8 a 65 ºC durante 5 minutos, no se observó ningún efecto protector en el recuento viable en las células encapsuladas (véase la FIG. 13A), pero había un efecto protector de la encapsulación en la exposición a un pH de 4,1 y el recuento de células encapsuladas era de al menos 1,5 log UFC/ml mayor que en las células libes. Para el *B. lactis*, la viabilidad de las células encapsuladas era mayor en comparación con las células libres incluso a un pH de 3,8 así como a pH 4,1 (véase la FIG. 13B). A pH 4,1, en comparación con los recuentos iniciales era solo aproximadamente 2 log UFC/ml de disminución en el número de células encapsuladas de *B. lactis* y aproximadamente una reducción de 3,5 log UFC/ml en las células libres. De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 65 ºC durante hasta 5 minutos en una solución de pH 3,8 comprende de 0 a 1 x 10^5 UFC/gramo de cápsulas, preferentemente de 0 a 1 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas. La disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 65 ºC durante hasta 5 minutos en una solución de pH 4,1 comprende de 0 a 5 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas.

La viabilidad de las células encapsuladas disminuyó proporcionalmente con la exposición a un tiempo de calor más largo. Después de 10 minutos de tratamiento de calor, no había diferencia entre las células libres y las encapsuladas (datos no mostrados). Tampoco se observó diferencia en la viabilidad entre las células encapsuladas y libres de ambas cepas en el tratamiento de calor a 65 ºC durante 5 minutos a pH 3,5 (datos no mostrados).

En referencia a la FIG. 14, se observó una supervivencia más alta en las células encapsuladas de ambas cepas de *Lactobacillus casei* (véase la FIG. 14A) y *Bifidobacterium lactis* (Howaru) (véase, la FIG. 14B) en pH ácido de 3,5 a 92 ºC durante 4 segundos, los que muestra que las células encapsuladas pueden sobrevivir durante la esterilización comercial de las bebidas de pH bajo. De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en cápsulas inventivas al someterlas a una temperatura de hasta 92 ºC durante hasta 5 segundos en una solución de pH 3,5 comprende de 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas.

El efecto del tamaño de la cápsula sobre la viabilidad de las bacterias no se ha investigado en el presente estudio, pero Chandramouli y col. (2004) demostraron que la viabilidad de una bacteria encapsulada en condiciones gástricas simuladas aumentaba con el aumento del tamaño de la cápsula (200-1000 µm), Lee y Heo (2000) publicaron que la supervivencia de las células bacterianas disminuía al disminuir el tamaño de la cápsula (diámetros de 1- 2,6 mm). Sheu y Marshall (1993) incida ron que los diámetros de la perla más grandes proporcionaban más protección a *Lactobacillus bulgaricus* en postres congelados.

Las microcápsulas de calidad alimentaria que contienen probióticos sensibles se desarrollaron en el presente estudio utilizando una relación de peso de 75:25 de aislado de proteínas de suero de leche respecto a alginato, y se probó que eran eficaces para aumentar la viabilidad de bacterias probióticas en comparación con las células libres expuestas a algunos tratamientos de calor y pH bajo (es decir 60 ºC durante 5 minutos a pH 3,5 y 65 ºC durante 5 minutos a pH 4,1), así como una condición de esterilización comercial de exposición a una temperatura de 92 ºC durante 4 segundos.

Ejemplo 9

Incorporación de probióticos encapsulados en zumos de fruta comerciales

El consumo de alimentos y bebidas que contienen probióticos parece ser una tendencia del consumidor global en crecimiento (Verbeke, 2005). Por ejemplo, en Europa un gran segmento del mercado de alimentos funcionales comprende alimentos fortificados con probióticos. Normalmente las bacterias utilizadas para aplicaciones de probióticos comerciales incluyen especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Sheehan y col., 2007).

Las bebidas tales como los zumos de frutas, que se consumen regularmente y tienen un sector del mercado establecido pueden representar un medio de suministro ideal para los probióticos. Sin embargo, el desarrollo de zumos funcionales fortificados con probióticos puede extinguirse debido a la sensibilidad de las bacterias a las condiciones ácidas y los componentes particulares de los zumos, Normalmente, el nivel mínimo recomendado de probióticos viables que debería estar presente en los alimentos para cualquier beneficio en la salud puede ser de aproximadamente 10^6 UFC ml^{-1} en el momento del consumo (Boylston y col., 2004). Los sabores extraños causados por los cultivos de probióticos en los zumos de fruta pueden producir también que a los consumidores no les guste el producto (Luckow y Delahunty, 2004). La microencapsulación es una técnica que se puede utilizar para reducir la sensibilidad bacteriana y los olores no deseables; sin embargo, hay algunas limitaciones tales como el tamaño de la microcápsula, si se va a incorporar en un zumo de frutas. El tamaño se mantiene preferentemente lo más pequeño posible para minimizar los efetos de textura sensorial.

En este ejemplo, se encapsularon *L. casei* y *B. lactis* Howaru utilizando un aparato Encapsulador (Inotech) y se añadieron a tres tipos de zumos comerciales: zumo de naranja, zumo de uva, y zumo de arándanos. Se examinó la viabilidad de las células encapsuladas y libres en los zumos cada dos semanas durante 10 semanas de tiempo de almacenamiento total a una temperatura óptima. También se llevaron a cabo ensayos sensitivos con el zumo de naranja y el zumo de uva fortificado con células encapsuladas.

Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y enumeración

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio fueron *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis* HN019 (Howaru), que fueron proporcionados por Christian Hansen (Dinamarca) y Danisco (USA), respectivamente. Las condiciones de cultivo y recuento de bacterias en las placas fueron como se describe en el Ejemplo 1.

Microencapsulación

Se propagaron 8 mililitros de células recién preparadas en 400 ml de caldo MRS durante 24 horas a 37 ºC en condiciones anaeróbicas, se recolectaron por centrifugación a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 ºC y luego se suspendieron en agua con un 0,1 % de peptona. Se prepararon soluciones de alginato sódico al 1 % p/v y WPI al 10 % como se describe en el Ejemplo 1, excepto la mezcla de WPI y alginato se diluyó en agua MIlli-Q esterilizada en autoclave para evitar el bloqueo de la boquilla. Las cápsulas de WPI-alginato se prepararon asépticamente con una suspensión celular en una solución al 4 % p/v de solución de cloruro cálcico utilizando un Encapsulator (IE-50R, Inotech, Suiza) con una boquilla de 300 µm. La frecuencia de vibración se fijó en 1800 Hz, la tensión electrostática era de 1 kV, y la velocidad de la bomba de jeringa era de 320. Se utilizó otra suspensión celular para las células libres como muestra de control. Las cápsulas se endurecieron en solución de cloruro cálcico durante 30 minuto antes de lavarse con agua Milli-Q. Las células viables de las cápsulas se determinaron entonces utilizando el procedimiento de recuento en placas.

Supervivencia de células encapsuladas en zumos de frutas

Se utilizaron tres tipos de zumos de fruta comerciales, como se muestra en la Tabla 3. Diez gramos de células encapsuladas y células libres, respectivamente se añadieron a 500 ml de cada zumo. Se examinó la viabilidad de las células encapsuladas y libres en cada zumo utilizando el procedimiento de recuento en placa cada dos semanas durante 10 semanas de almacenamiento a la temperatura óptima.

Distribución del tamaño de las partículas

Las microcápsulas se analizaron por el diámetro medio medido por volumen en un Malvern Mastersizer 2000 Ver. 5.54 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) utilizando tecnología de difracción láser.

Table 3. Zumos de fruta comerciales

Nombre del producto	Fabricante	Ingredientes clave	Brix	pH	Acidez	Almacenamiento
McCoy Real Dark Grape Juice	Frucor Beverages Ltd., NZ	Zumo de uva reconstituido (100 %), saborizante, Vitamina C	15,1	3,46	9,68	Ambiente

(continuación)

Nombre del producto	Fabricante	Ingredientes clave	Brix	pH	Acidez	Almacenamiento
Ocean Spray Cranberry Classic	Ocean Spray International INC, Australia	Zumo de arándanos concentrado (25 %), azúcar, Vitamina C	11,9	2,73	16,50	Ambiente
Charlies Honest Juice Orange	Charlies Trading Company Ltd., Australia y NZ	Zumo de naranja exprimido. Vitamina C	9,9	3,74	7,10	Refrigerado

Ensayo del triángulo sensorial

Se añadieron diez gramos de cápsulas por cada 500 ml al zumo de uva y de naranja y se ensayaron por seis expertos sensoriales entrenados. La cantidad (10 g) de microcápsulas era la misma que de microcápsulas utilizadas para el ensayo de almacenamiento. Dos de las muestras eran solo zumos y una muestra tenía zumo que contenía microcápsulas.

Los recuentos de células bacterianas viables de cada zumo fortificado con células encapsuladas y libres de *L. casei* eran aproximadamente 6,44 x 10^7 UFC/ml y 1,29 x 10^8 UFC/ml, respectivamente (véase la Tabla 4). Para el *B. lactis* Howaru, los recuentos iniciales de cada zumo fortificado con células encapsuladas y libres era de aproximadamente 1,03 x 10^8 UFC/ml y 6,35 x 10^7 UFC/ml, respectivamente (véase la Tabla 5).

Para el zumo de uva McCoy fortificado con *L. casei*, aunque el recuento celular disminuyó en el zumo con el tiempo de almacenamiento, la encapsulación de las células bacterianas proporcionaba un efecto algo protector para las bacterias probióticas. Como se muestra en la Tabla 3 el zumo que contenía microcápsulas presentaba mayores recuentos celulares (es decir, 6,4 log UFC/ml que el zumo que contenía células libres (es decir, 5,1 log UFC/ml) después de 10 semanas de almacenamiento. Sin embargo, para *B. lactis* Howaru, la viabilidad disminuyó repentinamente hasta aproximadamente 1 log UFC en ambos tipos de zumos después de 6 semanas de almacenamiento (véase la Tabla 5). De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a almacenamiento a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente de 22-25 ºC) durante hasta 8 semanas en un zumo de uva con un pH 3,5 comprendía de 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas.

El zumo de arándanos tenía un pH menor y una mayor acidez en comparación con los otros zumos pocas de las células libres de *L. casei* y *B. lactis* Howaru sobrevivieron, incluso después de solo dos semanas de almacenamiento. La viabilidad de las microcápsulas también se demostró una disminución gradual. Se descubrió que el *B. lactis* Howaru (véase la Tabla 5) era más sensible a este zumo en comparación con la cepa de *L. casei* encapsulada (véase la Tabla 4). De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a almacenamiento a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente de 22-25 ºC) durante hasta 2 semanas en un zumo de arándanos con un pH 2,75 comprendía de 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas.

Para el zumo de naranja refrigerado fortificado con *L. casei* encapsulado y células libres disminuían gradualmente, aunque se mantenía la viabilidad por encima de 5,1 log UFC/ml después de 10 semanas de almacenamiento (véase la Tabla 4). El recuento de células viables del zumo que contenía las microcápsulas parecía ser menor que el del zumo que contenía las células libres; sin embargo, esta diferencia se debía solo a la dificultad en el recuento de las células debido a la presencia de pulpa de naranja. Por el contrario, para el *B. lactis* Howaru, la viabilidad en ambos zumos no ese mantenía de manera similar a los resultados del zumo de arándanos (véase la Tabla 5). De acuerdo con aspectos de la invención, la disminución de bacterias probióticas viables en las cápsulas inventivas al someterlas a almacenamiento a temperatura ambiente de 1,67 ºC (25 ºF) durante hasta 10 semanas en un zumo de naranja con un pH 3,75 comprendía de 0 a 1 x 10^3 UFC/gramo de cápsulas, preferentemente 0 a 1 x 10^2 UFC/gramo de cápsulas.

Los ensayos sensoriales con el zumo de naranja demostraron que cinco de los expertos sensoriales entrenados no detectaron ninguna diferencia entre los dos tipos de zumo, el que contenía cápsulas y el que no, posiblemente debido a la pulpa de naranja. Además, la única persona que detectó la diferencia no podía detectar una sensación en boca diferente. Se estima en general que un tamaño de partícula por encima de 1000 µm de diámetro produce aspereza en la lengua, pero no es detectable por debajo de 3 µm de tamaño. El tamaño medio de las micropartículas utilizado en este Ejemplo se encontró que era aproximadamente 490 µm. En los ensayos sensoriales con el zumo de uva, tres de los seis expertos sensoriales entrenados detectaron las microcápsulas y notaron algunos pequeños grumos o aspereza, pero no detectaron ningún sabor desagradable.

Tabla 4. Número (log_{10}/ml zumo) de células encapsuladas o libres (*L. casei*) en tres tipos de zumo comercial durante 10 semanas de almacenamiento a temperatura óptima.

Semanas de almacenamiento	Zumo de uva		Zumo de arándanos		Zumo de naranja	
	Células libres	Perlas	Células libres	Perlas	Células libres	Perlas
0	8,1	7,8	8,1	7,8	8,1	7,8
2	7,7	7,6	<4*	6,2	7,1	5,4
4	6,7	7,3	0	3,2	6,7	6,3
6	6,1	7,1	0	1	6,1	5,7
8	5,5	6,9	0	0,5	6,0	6,0
10	5,1	6,4	0	0,5	5,3	5,1

* ND, fuera del intervalo de dilución

Tabla 5. Número (log_{10}/ml zumo) de células encapsuladas o libres (*B. lactis* Howaru) en tres tipos de zumo comercial durante 8 semanas de almacenamiento a temperatura óptima.

Semanas de almacenamiento	Zumo de uva		Zumo de arándanos		Zumo de naranja	
	Células libres	Perlas	Células libres	Perlas	Células libres	Perlas
0	7,8	8,0	7,8	8,0	7,8	8,0
2	6,7	6,8	0	<2,4*	<3*	4,1
4	5,1	5,6	0	0,6	0	0,4
6	<1*	<1,3*	0	0,5	0	<1*
8	-	-	-	-	-	-

* ND, fuera del intervalo de dilución

Como se muestra en la Tabla 4, en el zumo de uva fortificado con *L. casei*, la encapsulación proporciona un efecto protector. En el zumo de naranja, se descubrió que la viabilidad de las células encapsuladas y libres de *L. casei* se mantenía alrededor de 5,1 log UFC/ml después de 10 semanas de almacenamiento, posiblemente debido a la baja temperatura de almacenamiento y la baja acidez.

Se encontró que el diámetro medio medido por el volumen de las cápsulas era aproximadamente de 490 µm. Los ensayos sensoriales indicaban que los consumidores no pueden sentir ninguna diferencia en el zumo de naranja fortificado con microcápsulas, potencialmente debido a la presencia de pulpa en el zumo de naranja. Aunque la presencia de microcápsulas en el zumo de uva pudo ser detectada, las microcápsulas no producían ningún sabor o sensación en boca desagradable.

Los expertos en la técnica entenderán que, por conveniencia, algunos ingredientes se describen en el presente documento en ciertos casos en referencia a la forma original del ingrediente en el que se añade a los productos bebibles, formulaciones y procedimientos desvelados en el presente documento. Dicha forma original puede ser diferente de la forma en la que se encuentra el ingrediente en el producto de bebida o formulación terminados. Así, por ejemplo, la sacarosa y la sacarosa líquida se disolverían normalmente de manera sustancialmente homogénea y se dispersarían en una solución. De la misma manera, otros ingredientes identificados como sólidos, concentrados (por ejemplo, zumo concentrado), etc., se dispersarían normalmente de manera homogénea en el producto de la formulación más que permanecer en su forma original. Por lo tanto, la referencia a la forma de un ingrediente de un producto o formulación no se debería tomar como limitación de la forma del ingrediente en el producto o formulación, sino más bien como un medio conveniente de describir el ingrediente como un componente aislado del producto comestible o formulación.

Se debería entender que el uso de un artículo definido o indefinido en singular (por ejemplo, “un”, “una”, “el”, etc.) en esta divulgación y en las reivindicaciones siguientes sigue la estrategia tradicional en patentes de que significa “al menos uno” a menos de que en un caso particular esté claro por el contexto que en ese caso particular significa específicamente uno y solo uno. Al igual, el término “comprende” es de extremos abiertos, no excluyendo artículos adicionales, características, componentes, etc.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de bebida que comprende:

al menos un líquido acuoso; y
cápsulas sin revestimiento que comprenden una mezcla gelificada de alginato y aislado de proteínas de suero de leche desnaturalizado, y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada, en el que la relación de peso de la proteína de suero de leche respecto al alginato es desde 1:1 a 9:1, y en el que las cápsulas comprenden un tamaño medio de partícula de menos de 500 micrómetros (μm) de diámetro; en el que al someter el producto de bebida a una temperatura de hasta 92 grados Celsius durante hasta 5 segundos da como resultado una disminución de las células bacterianas probióticas de entre 0 y 1 x 10^3 UFC por gramo de cápsulas.

2. El producto de bebida de la reivindicación 1 que tiene uno de los siguientes:

• comprende entre 0,1 gramos y 3 gramos de cápsulas por cada 30 ml del producto de bebida,
• en el que la relación de peso de la proteína de suero de leche con respecto al alginato es de 1:1 a 4:1, en el que al menos un líquido acuoso consiste esencialmente en zumo de fruta o de verduras.
• en el que al menos un líquido acuoso comprende un zumo de fruta seleccionado de entre el grupo que consiste en zumo de naranja, zumo de arándanos, zumo de uva, zumo de piña, zumo de manzana, zumo de mango, zumo de coco, y una combinación de cualquiera de ellos,
• que comprende adicionalmente un componente de verduras,
• que comprende adicionalmente un edulcorante no nutritivo natural seleccionado de entre el grupo que consiste en un rebaudiósido, un glucósido de esteviol, extracto de Stevia rebaudiana, Lo Han Guo, mogrósido V, monatina, gliciricina, taumatina, monelina, brazzeína, y mezclas de cualquiera de ellos, preferentemente en el que el edulcorante natural no nutritivo se selecciona de entre el grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rabaudiósido E, esteviósido, dulcósido A, y cualquier combinación de cualquiera de ellos,
• en el que las cápsulas comprenden perlas,
• en el que la bacteria probiótica comprende *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus sp*., o mezclas de cualquiera de ellos,
• en el que el producto de bebida comprende una bacteria probiótica en una cantidad de al menos 1,0 x 10^6 UFC/gramo de cápsulas cuando el producto de bebida está almacenado a una temperatura de 22-25 ºC durante al menos dos semanas,
• en el que la relación de peso de la proteína de suero de leche respecto al alginato es de 1:1 a 3:1,
• que comprende adicionalmente al menos un ingrediente adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en modificadores del sabor, ácidos orgánicos, saborizantes, vitaminas, minerales, agentes tampón, colorantes, y mezclas de cualquiera de ellos, preferentemente en el que el ingrediente adicional es al menos un ácido orgánico seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido tartárico, ácido láctico, y mezclas de cualquiera de ellos,
o
• en el que el ingrediente adicional es al menos un mineral seleccionado de entre el grupo que consiste en calcio, magnesio, y mezclas de los mismos,
o
• en el que el ingrediente adicional es la vitamina D.

3. El producto de bebida de la reivindicación 1 en el que la relación de peso de la proteína de suero de leche con respecto al alginato es desde 2:1 – 3:1.

4. Un procedimiento de preparación de bacterias probióticas encapsuladas que consiste esencialmente en:

proporcionar una mezcla que comprende alginato sódico, proteína desnaturalizada y células probióticas activas; y
combinar la mezcla con uno o más cationes divalentes para iniciar la gelificación en frío del alginato sódico y de la proteína desnaturalizada,
en el que las cápsulas resultantes comprenden un tamaño medio de partícula de menos de 500 micrómetros (μm) de diámetro y
una mezcla gelificada de alginato y proteína desnaturalizada, y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada,
en el que la relación de peso de la proteína desnaturalizada con respecto al alginato es de 1:1 a 9:1.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, que tiene uno de los siguientes:

en el que las cápsulas comprenden un tamaño medio de partícula de 300 micrómetros (μm) o menos de diámetro,
en el que las cápsulas comprenden una relación de peso de proteína respecto a alginato en un intervalo de desde 1:1 a 4:1, preferentemente

en el que las cápsulas comprenden una relación de peso de proteína respecto a alginato en un intervalo de desde 2:1 a 3:1,
en el que la proteína comprende un aislado de proteína de suero de leche.

6. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente:

mezclar una solución acuosa que comprende el alginato sódico y la proteína desnaturalizada con una suspensión de células probióticas activas en agua con un 0,1 % de peptona, para formar la mezcla;
en el que la gelificación en frío del alginato sódico y la proteína desnaturalizada forman una segunda mezcla; y
pasar la segunda mezcla a través de una abertura para formar cápsulas que tienen un tamaño medio de partícula de menos de 500 micrómetros (µm) de diámetro, en el que las cápsulas sin revestimiento resultantes comprenden una mezcla gelificada de alginato y proteína desnaturalizada, y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada.

7. El procedimiento de la reivindicación 6 que tiene uno de los siguientes:

• que comprende adicionalmente la incubación de la primera mezcla en un baño de agua a una temperatura de entre 36 ºC y 46 ºC durante al menos 5 minutos,
• que comprende adicionalmente el endurecimiento de las cápsulas en una solución de cloruro cálcico durante al menos 15 minutos, seguido por lavado de las cápsulas endurecidas con agua,
• en el que la abertura comprende una boquilla,
• en el que el paso se lleva a cabo utilizando un aparato de extrusionado,
• en el que las cápsulas comprenden al menos 1 x 10^9 UFC/g de bacterias probióticas en el momento de la fabricación,
• que comprende adicionalmente la adición de las cápsulas a un producto alimentario y el envasado del producto alimentario, preferentemente en el que el producto alimentario comprende un producto de bebida seleccionado de entre el grupo que consiste en una bebida carbonatada, una bebida no carbonatada, una bebida de grifo, una bebida congelada lista para beber, una bebida carbonatada congelada, un concentrado de una bebida, un concentrado en polvo, una bebida de café, una bebida de té, una bebida de un lácteo, un agua aromatizada, un agua mejorada, un zumo de fruta, un batido, una bebida con sabor a zumo de frutas, una bebida con sabor a fruta, una bebida deportiva, una bebida de soja, una bebida hidratante, una bebida energética, una bebida de verduras, una bebida basada en granos, una bebida de malta, una bebida fermentada, una bebida de yogur, una bebida de kéfir, y una bebida alcohólica, o en el que el producto alimentario es un tentempié.

8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que la bacteria probiótica comprende *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, o mezclas de cualquiera de ellos.

9. El procedimiento de la reivindicación 6, 7 u 8, en el que la solución acuosa del catión divalente comprende un 4 % de peso por volumen de cloruro cálcico.

10. Las cápsulas formadas por el procedimiento que comprende:

la mezcla de una solución acuosa que comprende alginato sódico y una proteína desnaturalizada con células probióticas activas, para formar una primera mezcla;
la combinación de la primera mezcla con una solución acuosa de un catión divalente para iniciar la gelificación en frío del alginato sódico y la proteína desnaturalizada para formar una segunda mezcla; y
el paso de la segunda mezcla a través de una abertura que tiene un diámetro de menos de 500 micrómetros (µm) para formar cápsulas que tienen un tamaño medio de partícula de menos de 500 micrómetros (µm) de diámetro,
en el que las cápsulas resultantes comprenden una mezcla gelificada de alginato y una proteína desnaturalizada, y bacterias probióticas atrapadas dentro de la mezcla gelificada, y en el que la relación de peso de la proteína desnaturalizada con respecto al alginato es desde 1:1 a 9:1.

11. Las cápsulas de la reivindicación 10 que tienen uno de los siguientes:

• en el que las cápsulas comprenden una relación de peso de la proteína respecto al alginato en el intervalo de desde 1:1 a 4:1,
• en el que la proteína comprende un aislado de proteína de suero de leche,
• en el que la abertura comprende una boquilla,
• en el que la primera mezcla se incuba en un baño de agua a una temperatura de entre 36 ºC y 46 ºC durante al menos 5 minutos, preferentemente que comprende adicionalmente el endurecimiento de las cápsulas en una solución de cloruro cálcico durante al menos 15 minutos, seguido por un lavado de las cápsulas duras con agua.

12. Las cápsulas de la reivindicación 11, en las que la relación de peso de la proteína de suero de leche con respecto al alginato sódico es desde 2:1 – 3:1.

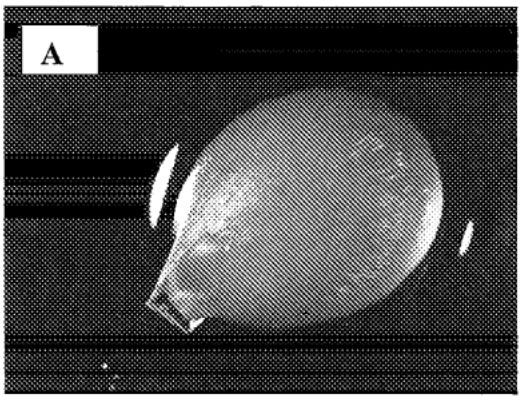

FIG. 1A

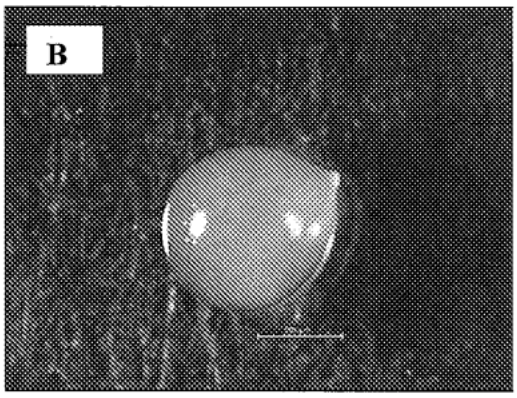

FIG. 1B

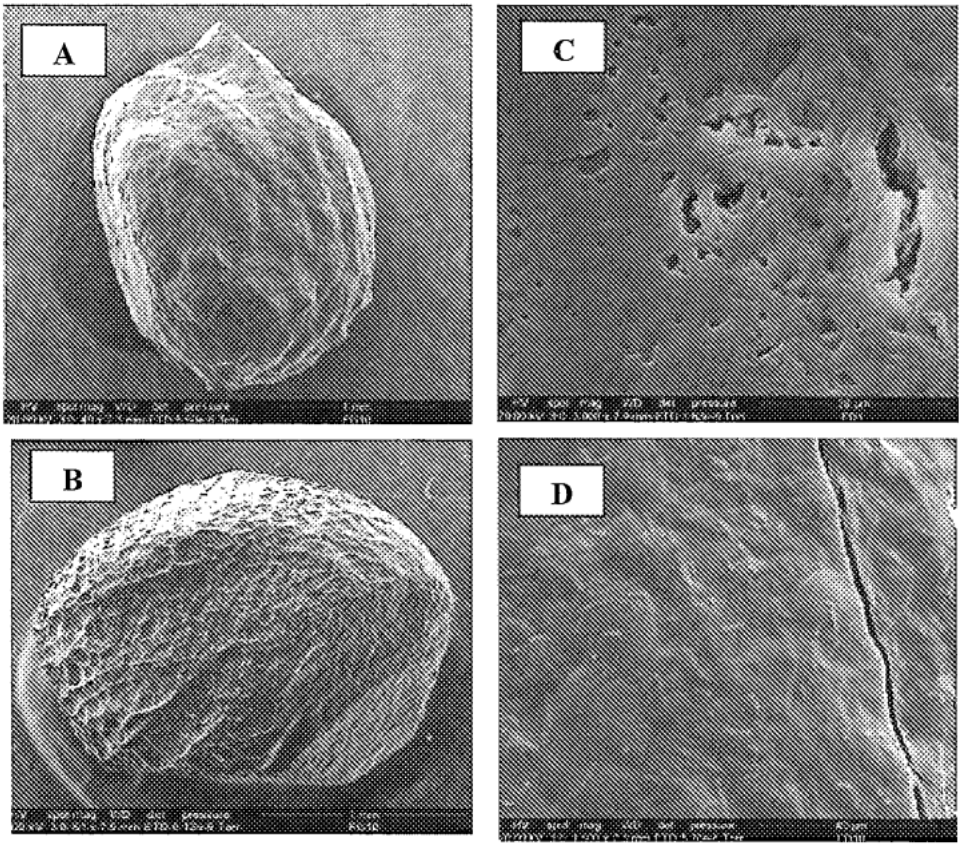

FIG. 2

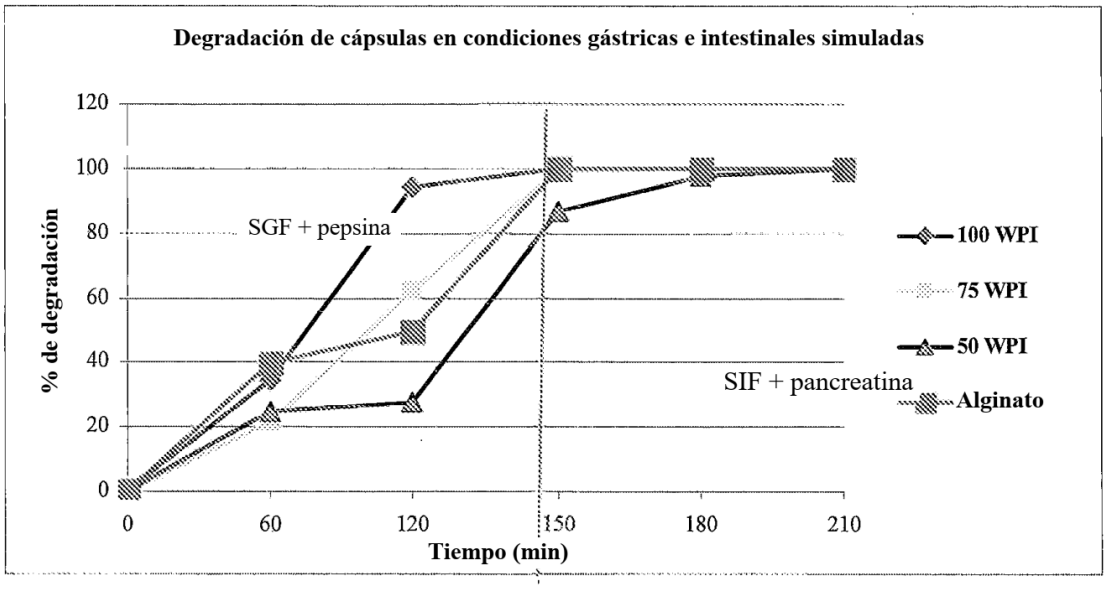
Degradación de cápsulas en condiciones gástricas e intestinales simuladas
% de degradación
120
100
80
60
40
20
0
0
60
120
150
180
210
Tiempo (min)
SGF + pepsina
SIF + pancreatina
100 WPI
75 WPI
50 WPI
Alginato

FIG. 3

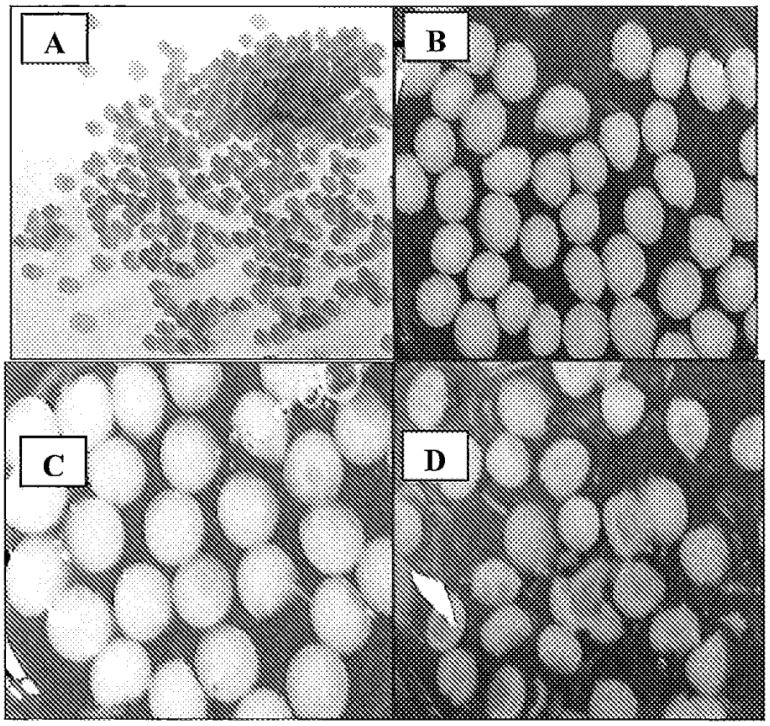
A
B
C
D

FIG. 4

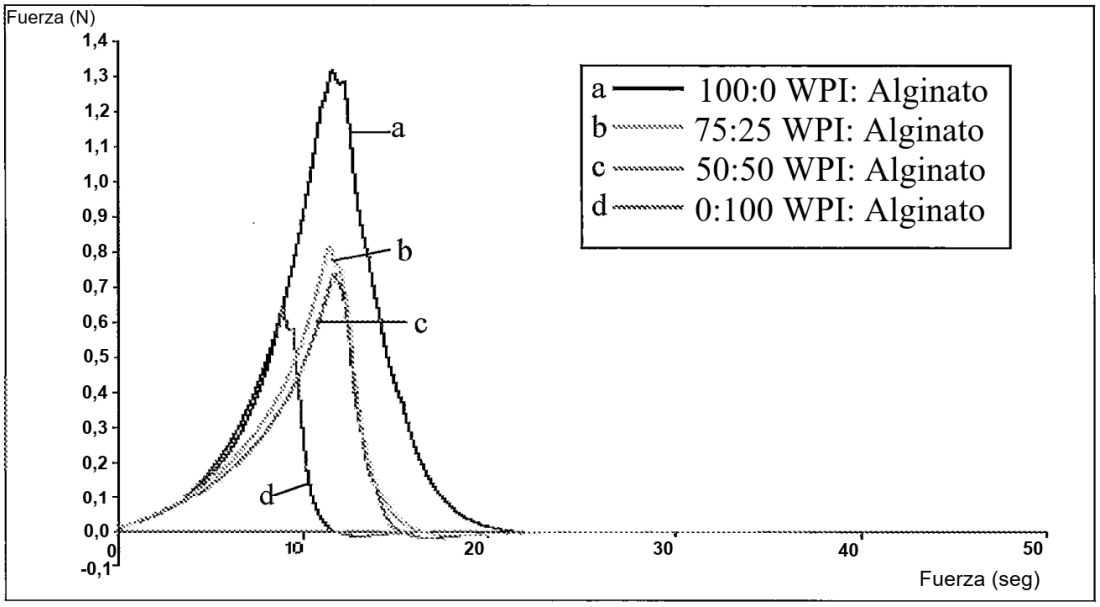
Fuerza (N)
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
0
10
20
30
40
50
Fuerza (seg)
a
b
c
d
a 100:0 WPI: Alginato
b 75:25 WPI: Alginato
c 50:50 WPI: Alginato
d 0:100 WPI: Alginato

FIG. 5

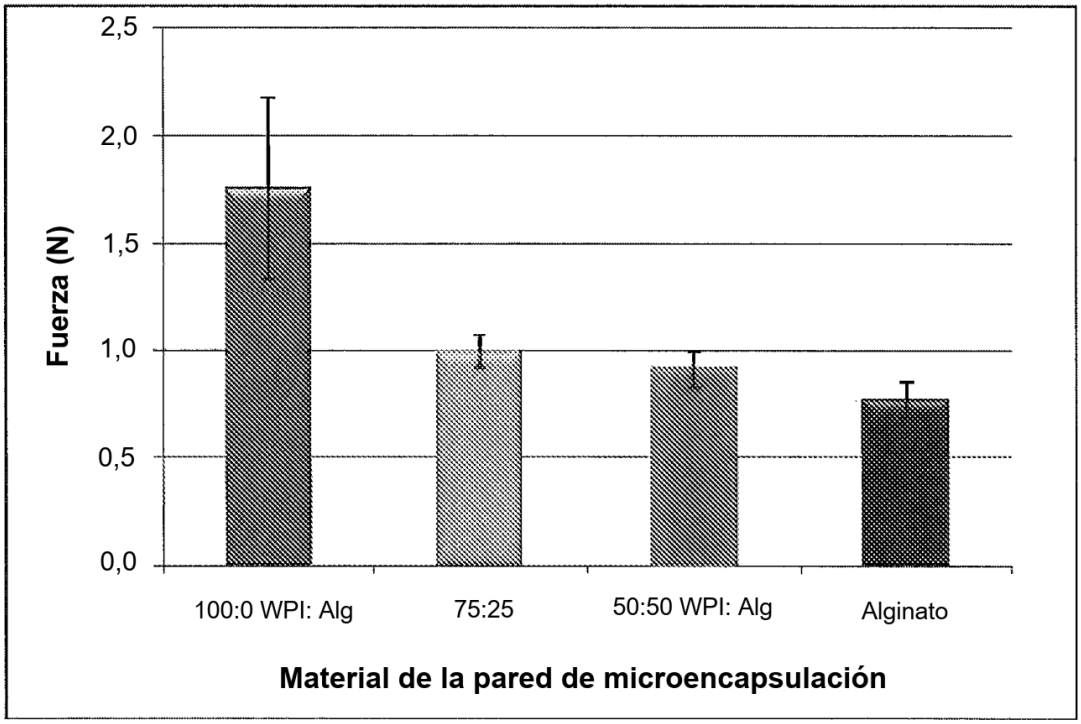
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Fuerza (N)
100:0 WPI: Alg
75:25
50:50 WPI: Alg
Alginato
Material de la pared de microencapsulación

FIG. 6

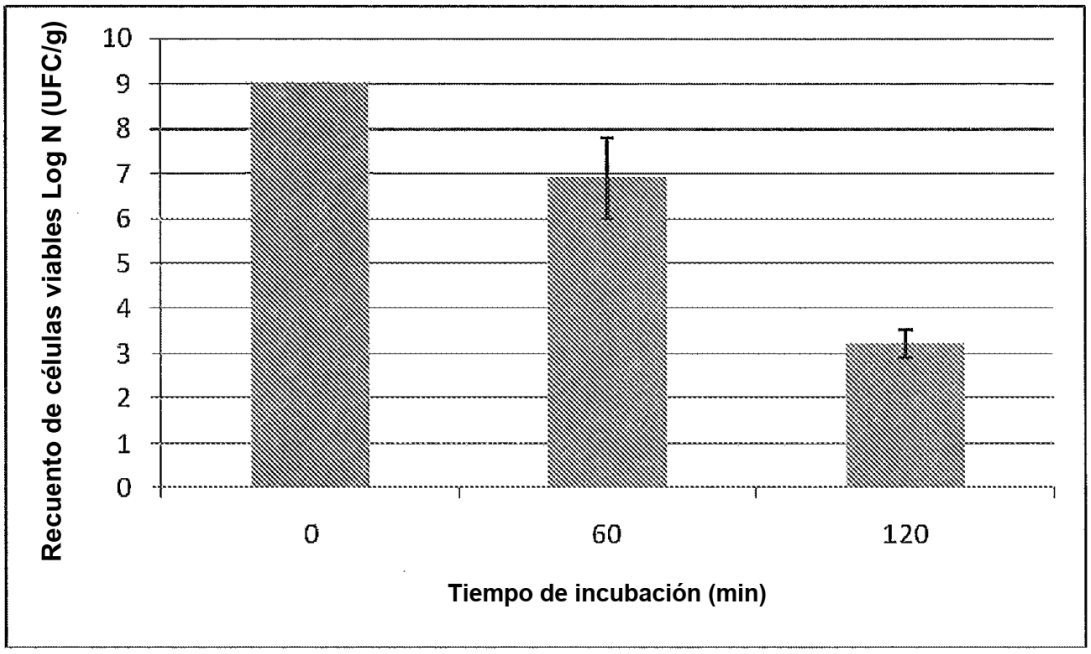
Recuento de células viables Log N (UFC/g)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
60
120
Tiempo de incubación (min)

FIG. 7

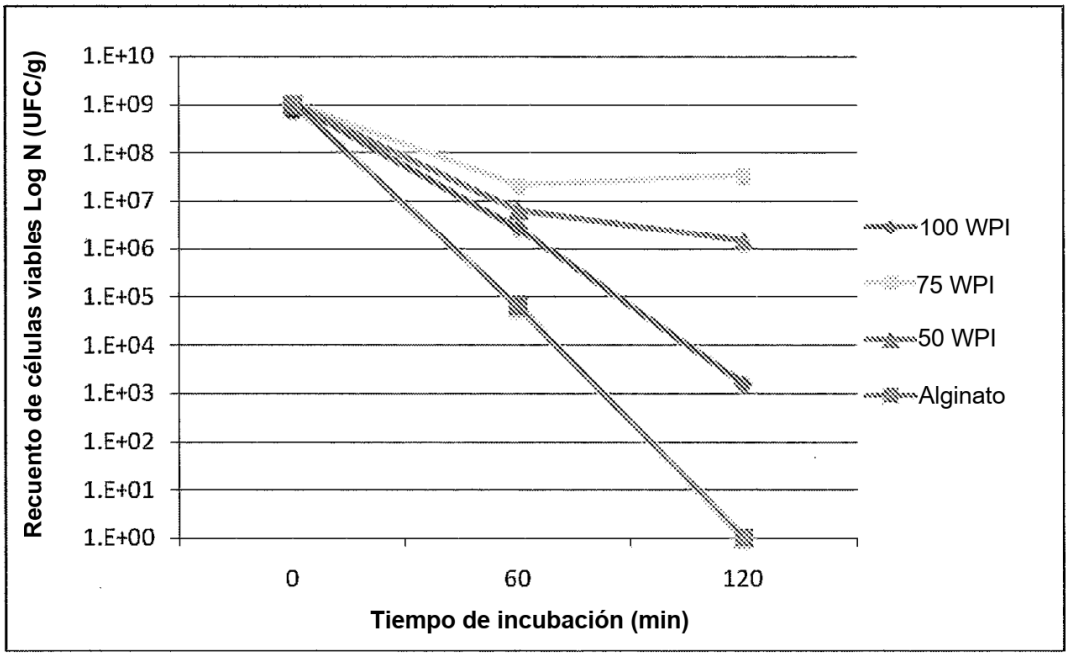
Recuento de células viables Log N (UFC/g)
1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
0
60
120
Tiempo de incubación (min)
100 WPI
75 WPI
50 WPI
Alginato

FIG. 8

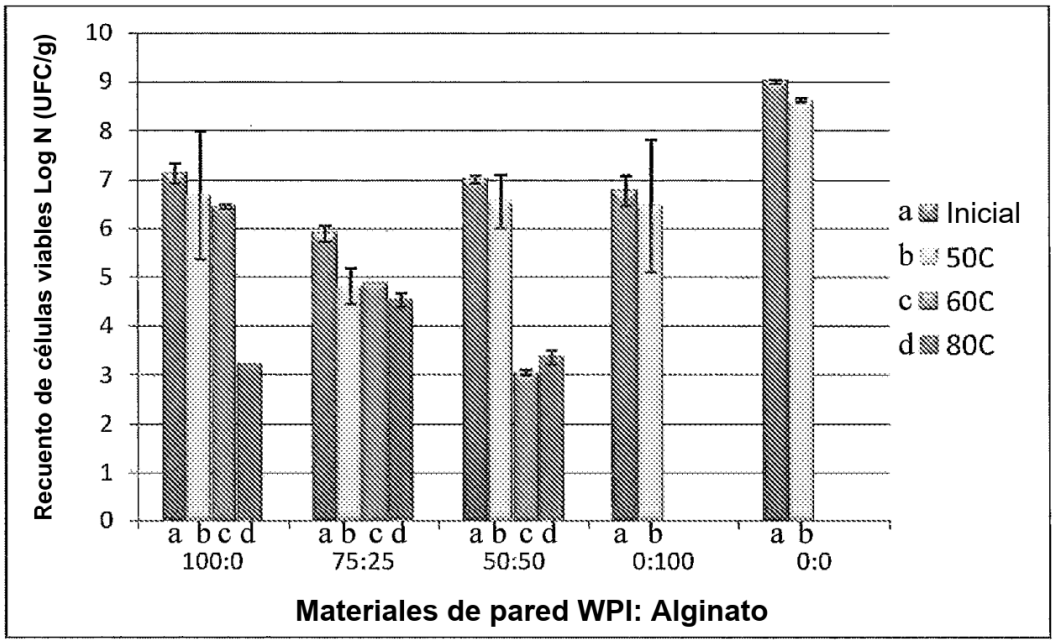
Recuento de células viables Log N (UFC/g)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
a b c d
100:0
a b c d
75:25
a b c d
50:50
a b
0:100
a b
0:0
Materiales de pared WPI: Alginato
a Inicial
b 50C
c 60C
d 80C

FIG. 9

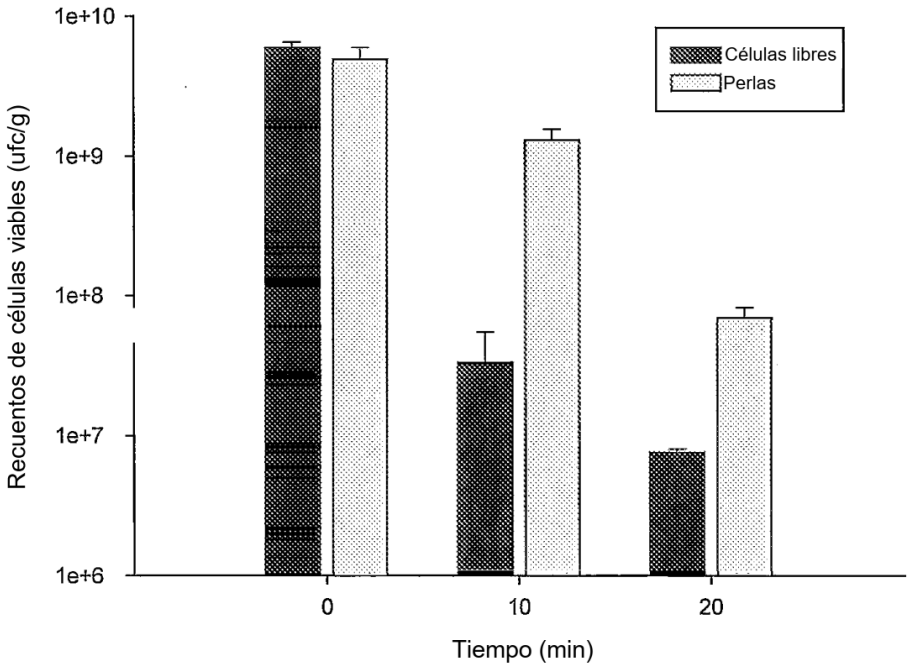
Recuentos de células viables (ufc/g)
1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
0
10
20
Tiempo (min)
Células libres
Perlas

FIG. 10A

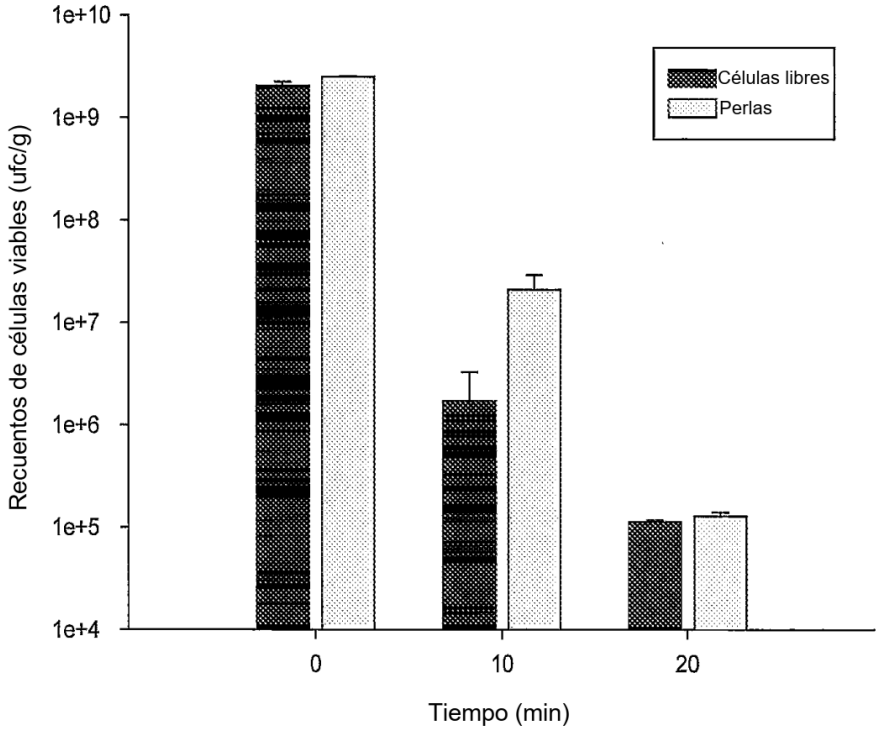

FIG. 10B

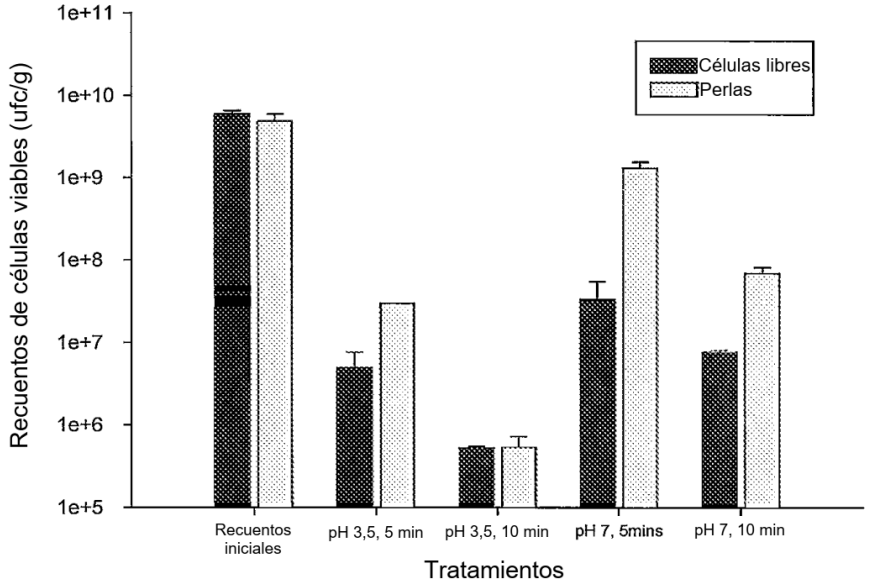

FIG. 11

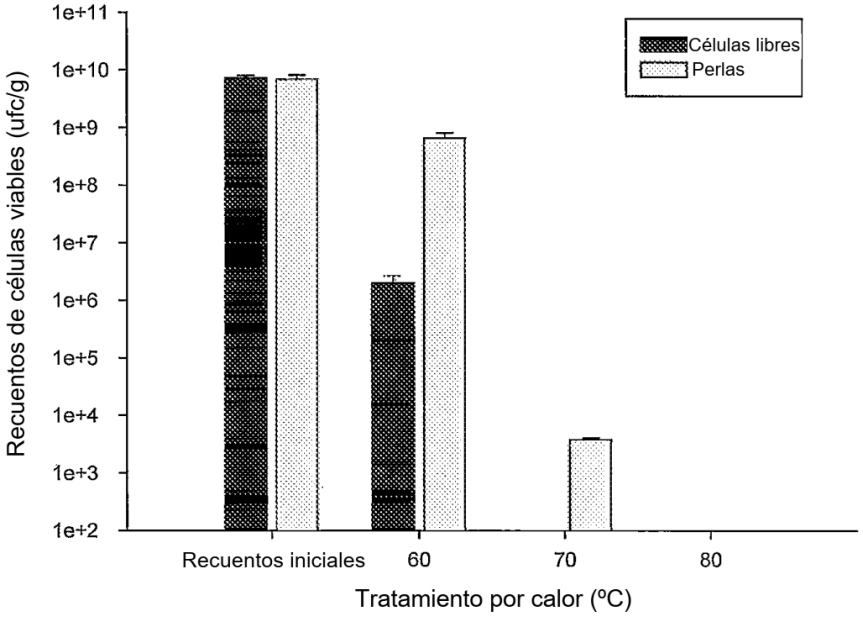

FIG. 12

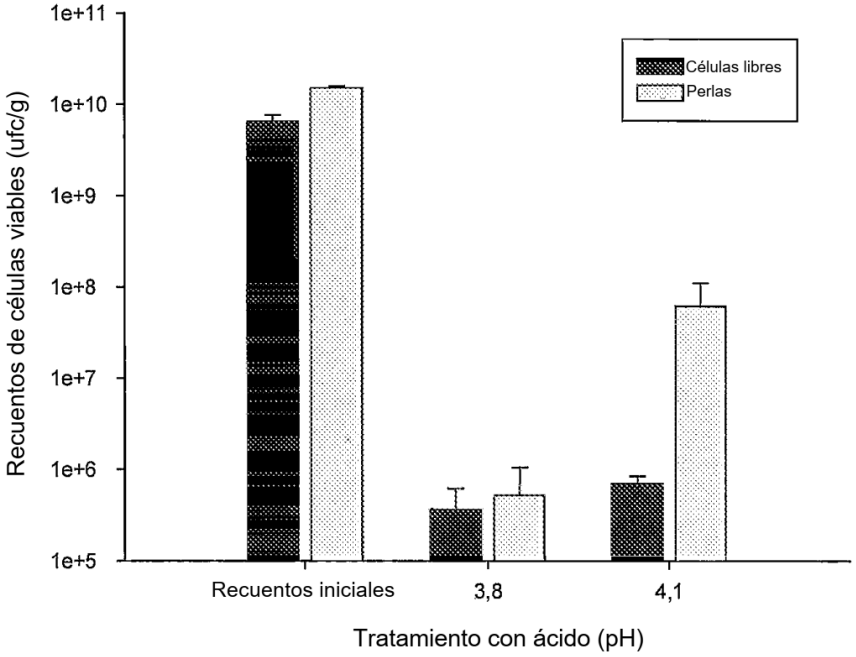

FIG. 13A

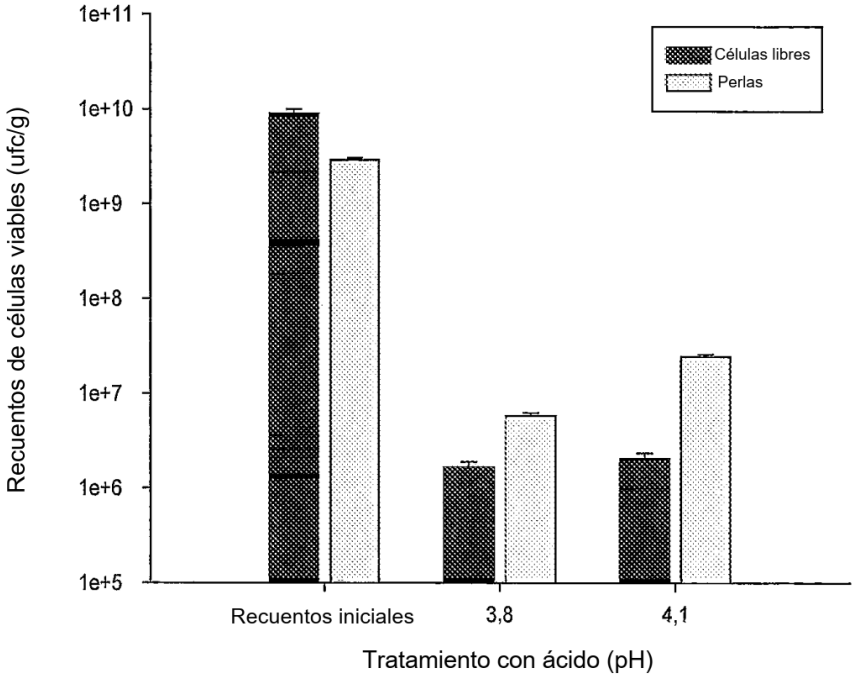

FIG. 13B

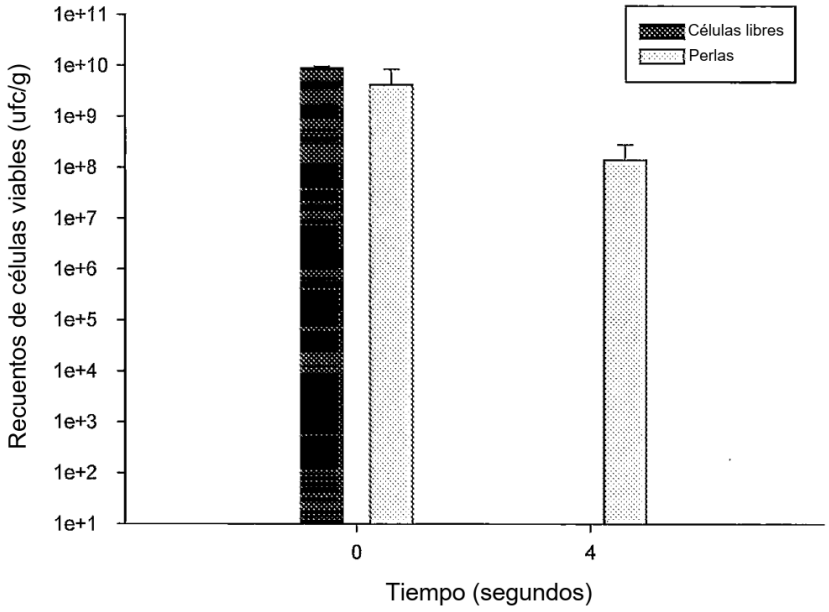

FIG. 14A

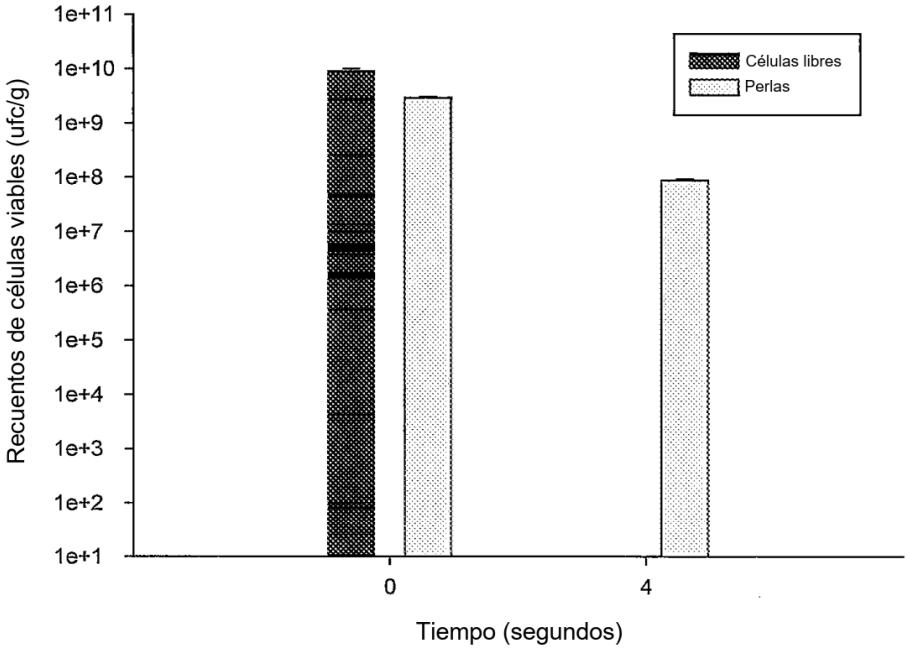

FIG. 14B

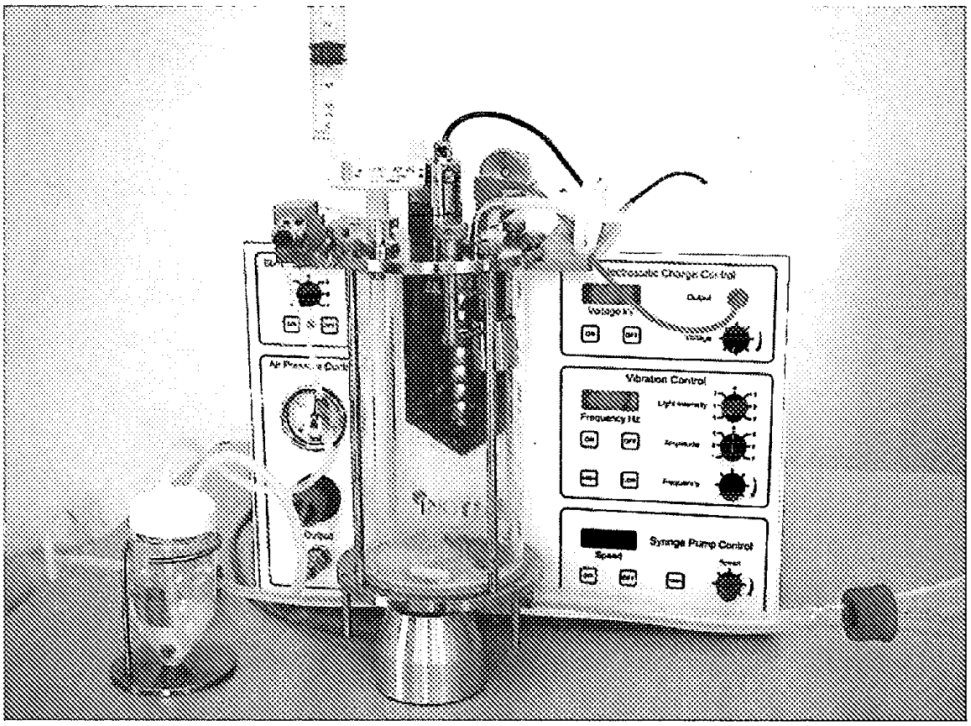

FIG. 15