

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 069**

51 Int. Cl.:

A23L 3/44 (2006.01)

F26B 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/EP2012/074759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12808718 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2787843**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de composición de microorganismos liofilizada**

30 Prioridad:

08.12.2011 US 201161568237 P
21.12.2011 GB 201121992

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HOLLARD, CHRISTOPHE y
AGEE, RONALD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 069 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

Procedimiento para la preparación de composición de microorganismos liofilizada

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición liofilizada que contiene un microorganismo.

5 **Antecedentes**

Como se describió en Bauer et al (*Journal of Biotechnology*, 2011, en prensa), en la fabricación de alimentos, hay una demanda de cultivos iniciadores, protectores y probióticos estables y bien acondicionados. Uno de los procedimientos de preservación (conservación) bien establecidos usados durante la preparación de estos cultivos es la liofilización, ya que se sabe que es un método de secado suave que conduce a daño mínimo en los microorganismos. La liofilización, también llamada criodesecación, es un procedimiento de preservación (o conservación) mediante el cual el material se congela (por ejemplo, en bloques, gotas o gránulos) a una temperatura inferior a 0°C. Después la presión circundante se reduce a un intervalo de 10-80 Pa (75-600 mTorr) (Bactéries lactiques De la génétique aux ferments, 2008), en general aproximadamente de 13-27 Pa (100-200 mTorr) y se añade suficiente calor para permitir que el agua congelada en el material sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa. El material se puede congelar en el liofilizador o introducir directamente en una forma congelada en el liofilizador.

Sin embargo, la liofilización es un procedimiento largo e intensivo en energía (Knorr, 1998; Regier et al., 2004). Además, la supervivencia de algunas cepas bacterianas es afectada negativamente por el procedimiento de congelación (Meryman et al., 1977; Meryman, 2007).

Un método de secado alternativo es el secado a vacío, que funciona a temperaturas positivas por aplicación de vacío. El uso de este método de secado en condiciones convencionales (intervalo de temperatura entre 30 y 80°C) puede causar grandes pérdidas de células debido al daño por calor (Valdramidis et al., 2005). Sin embargo, el estrés por calor se puede reducir reduciendo más la presión de la cámara a valores justo por encima del punto triple del agua, lo que conduce a temperaturas bajas del producto cercanas a 0°C. Este procedimiento se conoce como deshidratación al vacío a baja temperatura controlada (CLTV). King et al. (1989) desarrollaron este método para el secado de ingredientes alimenticios sensibles y también mostraron que es aplicable al secado de microorganismos tales como *Lactobacillus acidophilus* (King y Su, 1993).

Los documentos WO2011/094469 y WO2012/021783 describen un procedimiento de liofilización que se inicia por "una etapa corta de purgado y estabilización de estructura de las partículas congeladas a una presión de vacío de menos de <2000 mTorr seguido de una etapa de secado primario a más de >2000 mTorr de presión de vacío y a una temperatura deseada. Durante la etapa de secado secundario y final del material amorfo vítreo, se aplican una presión de vacío completa y temperatura elevada, para lograr una actividad de agua final deseable del material seco".

Los probióticos son bien conocidos y se usan como suplementos dietéticos. Algunos probióticos se han conservado por liofilización. También se sabe que las células que se liofilizan en presencia de agentes protectores son más adecuadas para mantener su viabilidad y estabilidad que las células que se liofilizan sin la adición de dichos agentes protectores. Por lo tanto, en general un protector se mezcla con concentrado celular reciente antes de la etapa de liofilización.

La liofilización se puede llevar a cabo usando diferentes técnicas. En particular, la liofilización se puede llevar a cabo por secado en bandejas. En este procedimiento, el concentrado celular estabilizado se carga directamente en bandejas del liofilizador. Las células se congelan por contacto con estantes mantenidos a una temperatura de congelación y se liofilizan en un liofilizador comercial. La torta resultante después se puede moler para hacer un polvo, por ejemplo, que se usa en mezclas de probióticos. Otro procedimiento de liofilización común usado para preservar los cultivos es liofilizarlos en forma de gránulos congelados. Los gránulos congelados se pueden formar por goteo del cultivo estabilizado sobre una superficie refrigerada (tal como un barril refrigerado o una cinta refrigerada) o en nitrógeno líquido. Los gránulos congelados se pueden producir y almacenar independientemente de la disponibilidad de liofilizador, y se pueden cargar fácilmente en bandejas de liofilizador. Los gránulos secos resultantes después se pueden moler para formar un polvo, que se usa, por ejemplo, en mezclas probióticas.

Probablemente la mayor diferencia entre los gránulos de secado en bandejas y de liofilización es la velocidad de congelación. Durante ambos procedimientos de congelación se forman cristales de hielo de agua pura, que empujan juntas las células y solutos disueltos a los espacios intersticiales entre los cristales. Cuando se congela en nitrógeno líquido, los cristales de hielo se forman casi instantáneamente, mientras que la congelación en bandejas permite que los cristales de hielo crezcan lentamente y, por lo tanto, a un tamaño mayor. La liofilización elimina los cristales de hielo dejando una matriz de espacios intersticiales de material ahora seco. La microscopía electrónica de barrido (SEM) del material seco muestra que los materiales granulados usando procedimientos de liofilización convencionales tienen canales microscópicos y matrices intersticiales y las células están en, o cerca de la superficie. Por el contrario, los materiales secados en bandejas tienen canales y matrices intersticiales mucho más grandes y las células están encapsuladas dentro del material de la matriz, lo que conduce a una mejor protección de las células. Por otro lado, los procedimientos de secado en bandejas convencionales requieren mucho tiempo en comparación con los de

5 liofilización en gránulos convencionales, en especial debido a dos factores: a) el tiempo de congelación lento limitado por la transferencia de calor de los estantes al material; b) el tiempo de secado lento debido a la mayor distancia necesaria para que el agua escape de las células (la torta resultante obtenida por el procedimiento de secado en bandejas es de mayor tamaño que los gránulos). Otro problema relacionado con el secado en bandejas es la dificultad que requiere su logística, por ejemplo, el liofilizador debe estar cerca de la fermentación y el momento de la recogida de la fermentación y el secado deben estar sincronizados.

Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar un procedimiento de liofilización mejorado que permita características mejoradas de los microorganismos (tales como una mejor estabilidad).

La presente invención alivia los problemas de la técnica anterior.

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de la composición de microorganismos liofilizada, que comprende la etapa de

15 (i) someter una composición congelada que comprende microorganismos a una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr] a una temperatura de 10 a 40°C durante un período de 24 a 72 horas para alcanzar una A_w inferior a 0,15, de modo que a la presión de secado la composición congelada se seca por sublimación del agua presente en la composición congelada

para proporcionar una composición liofilizada que comprende los microorganismos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un alimento o pienso, comprendiendo el procedimiento

(a) preparar un microorganismo liofilizado por un procedimiento que comprende la etapa de

20 (i) someter una composición congelada que comprende microorganismos a una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr] a una temperatura de 10 a 40°C durante un período de 24 a 72 horas, alcanzar una A_w inferior a 0,15, de modo que a la presión de secado la composición congelada se seca por sublimación del agua presente en la composición congelada para proporcionar una composición liofilizada que comprende los microorganismos;

25 (b) combinar la composición de microorganismos liofilizada con un producto alimenticio o alimento para animales.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de microorganismos liofilizada que se puede obtener por el procedimiento anterior.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de microorganismos liofilizada preparada por el procedimiento anterior.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un alimento o pienso que comprende

(a) una composición de microorganismos liofilizada como se define en la presente memoria; y

(b) un producto alimenticio o alimento para animales.

35 Se describe en la presente memoria el uso de presión de secado para preparar una composición de microorganismos liofilizada que tiene estabilidad mejorada y/o recuento de células mejorado y/o densidad aumentada y/o dispersabilidad mejorada,

en donde se aplica una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr] a una composición congelada que comprende microorganismos, para secar la composición congelada por sublimación del agua presente en la composición congelada para alcanzar una A_w inferior a 0,15. Los aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

40 La presente invención proporciona nuevas técnicas de secado para la preparación de composiciones liofilizadas que contienen microorganismos. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento en el que se liofilizan composiciones congeladas que contienen microorganismos.

45 En este procedimiento, la liofilización se lleva a cabo a presiones que son más altas que las usadas normalmente para la liofilización. El experto en la técnica no habría esperado obtener características mayores de los microorganismos, tales como estabilidad, puesto que se esperaría que una presión alta hubiera sido perjudicial para los microorganismos.

Una ventaja de la presente invención es que este procedimiento (es decir, el uso de una alta presión para la liofilización de microorganismos) se puede implementar en diferentes técnicas de secado, tales como secado de gránulos y secado en bandejas, conduciendo a resultados mejorados.

En comparación con los gránulos secos obtenidos usando técnicas de liofilización convencionales (dicho procedimiento que usa una presión de 100 mTorr), se mejoran los recuentos de células, la estabilidad en el almacenamiento, densidad y dispersabilidad de los microorganismos liofilizados.

5 En comparación con el procedimiento de secado en bandejas convencional, se ha encontrado que el recuento de células y la estabilidad celular de las composiciones liofilizadas según la presente invención superan los obtenidos para material secado en bandejas comercialmente. Además, la densidad aparente de las composiciones liofilizadas según la presente invención después de molienda es equivalente a los mejores productos secados en bandejas. Además, las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) indican que las células de microorganismos en las presentes composiciones están encapsuladas en una matriz; se entiende que esto se traduce en su mejor
10 estabilidad.

A modo de referencia, estos y otros aspectos de la presente invención ahora se describen bajo los títulos de sección adecuados. Sin embargo, las enseñanzas de cada sección no se limitan necesariamente a cada sección en particular.

Aspectos preferidos

Microorganismos

15 Como se describe en la presente memoria, la composición congelada comprende uno o más microorganismos. En la presente invención, "microorganismo" o "microorganismos" se usan indistintamente para abarcar uno o más microorganismos. Preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en levaduras, mohos, hongos, bacterias y sus mezclas.

20 En un aspecto, los microorganismos se seleccionan de levaduras. Ejemplos de levaduras adecuadas son: *Kluyveromyces spp*, *Debaryomyces spp*, *Yarrowia spp*, *Pichia spp*, *Williopsis spp*, *Saccharomyces spp*.

En un aspecto, los microorganismos se seleccionan de mohos. En un aspecto, los microorganismos se seleccionan de hongos. Los ejemplos de hongos/mohos adecuados son: *Penicillium spp*, *Geotrichum spp*, *Lecanicillium spp*, *Trichothecium spp*.

25 En un aspecto, los microorganismos se seleccionan de una o más cepas de bacterias. Ejemplos de bacterias adecuadas son: bacterias corineformes tales como por ejemplo *Arthrobacter spp*, *Corynebacterium spp*, *Brevibacterium spp*; bacterias del ácido láctico; *Micrococcaceae* y bacterias del género *Staphylococcus*.

30 En un aspecto preferido, la una o más cepas de bacterias se seleccionan de bacterias del ácido láctico. De acuerdo con la invención, las expresiones "bacterias del ácido láctico" o "bacteria del ácido láctico" incluyen cualquier bacteria capaz de producir, como el principal producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos, ácido láctico o al menos uno de sus derivados (incluyendo, pero no limitado a ácido propiónico). Por lo tanto, se pretende que la expresión incluya bacterias del ácido propiónico (PAB), que producen ácido propiónico como un producto de fermentación de carbohidratos.

Preferiblemente, las bacterias según la presente invención son bacterias del ácido láctico que son generalmente reconocidas como seguras para el consumo animal o humano (es decir, aprobado como GRAS).

35 Se pueden seleccionar bacterias adecuadas del género *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y sus mezclas. Típicamente, las bacterias del ácido láctico se seleccionan de las especies, subespecies o biovariedades *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovariedad diacetylactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus coryneformis*,
40 *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus kefirii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei ssp*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*,
45 *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus franciscensis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis subsp. animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, y combinaciones de cualesquiera de los mismos.

50 En una realización preferida, el microorganismo es una bacteria, preferiblemente una bacteria seleccionada del grupo que consiste en bacterias del género *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Propionibacterium* y/o *Streptococcus*. En una realización preferida, dicha bacteria es una bacteria seleccionada del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* y/o *Streptococcus*. En una realización preferida, las bacterias del ácido láctico se seleccionan de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*.

55 En un aspecto preferido, los microorganismos se seleccionan de probióticos o microbios para alimentación directa

(DFM). Según la invención, "probióticos" o "DFM" significa microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedante, siendo el hospedante un ser humano en el caso de los probióticos y un animal en el caso de los DFM. Los microorganismos probióticos o DFM más habitualmente usados son principalmente bacterias y levaduras de los siguientes géneros: *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Saccharomyces spp.*

Congelación

Como se describe en la presente memoria, una composición congelada que comprende microorganismos se somete a una presión de secado tal que a la presión de secado la composición congelada se seca por sublimación del agua presente en la composición congelada. Un experto en la técnica apreciará que la composición congelada que comprende microorganismos se puede preparar por cualquier método adecuado. Un experto en la técnica entenderá además que la etapa de congelación para proporcionar la composición congelada no es una etapa esencial de la presente invención. En otras palabras, la composición puede estar ya congelada y ser proporcionada al presente procedimiento. En una realización preferida, la composición congelada que comprende microorganismos está en forma de gránulos congelados.

Sin embargo, en otro aspecto preferido, una etapa del procedimiento de la presente invención es la congelación de una composición que comprende microorganismos para proporcionar la composición congelada. Por lo tanto, en un aspecto preferido, el procedimiento comprende la etapa adicional de (i') congelar una composición que comprende microorganismos para proporcionar la composición congelada de la etapa (i). Un experto en la técnica apreciará que la etapa (i') en la que una composición que comprende microorganismos se congela para proporcionar la composición congelada, se debe llevar a cabo antes de la etapa (i) para así proporcionar la composición congelada a la etapa (i). Por lo tanto, una realización preferida de la invención es un procedimiento para la preparación de una composición de microorganismos liofilizada, que comprende las etapas de

(i') congelar una composición que comprende microorganismos para obtener una composición congelada que comprende microorganismos,

(i) someter dicha composición congelada que comprende microorganismos a una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr] para alcanzar una A_w inferior a 0,15, de modo que a la presión de secado la composición congelada se seca por sublimación del agua presente en la composición congelada

para proporcionar una composición liofilizada que comprende los microorganismos.

En una realización específica, la etapa (i') se lleva a cabo extendiendo la composición de microorganismos en estantes mantenidos a una temperatura de congelación (procedimiento de secado en bandejas). Preferiblemente, la etapa (i') es una etapa de preparación de gránulos congelados, en donde los gránulos se forman por goteo de la composición de microorganismos sobre una superficie enfriada (tal como un barril enfriado o una cinta enfriada) o en nitrógeno líquido. Preferiblemente, la etapa (i') es una etapa de preparación de gránulos congelados por goteo de la composición de microorganismos en nitrógeno líquido (procedimiento de granulación-secado).

La congelación se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento adecuado. En un aspecto, una composición que comprende el microorganismo se congela para preparar gránulos congelados. Dichos gránulos se preparan típicamente por goteo de una composición líquida que contiene el microorganismo en nitrógeno líquido. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la presente invención incluye la etapa de congelar una composición líquida que comprende microorganismos por goteo de la composición líquida en nitrógeno líquido para preparar gránulos congelados y posteriormente usar los gránulos congelados en la etapa (i) del presente procedimiento.

La composición que contiene el microorganismo se puede congelar a cualquier temperatura adecuada de modo que el microorganismo esté entonces en una forma para la liofilización. En un aspecto preferido, la composición que comprende microorganismos se congela a una temperatura menor que 0°C, preferiblemente de -196°C a -1°C, preferiblemente de -196°C a -17°C, preferiblemente de -196°C a -40°C. En algunas realizaciones, la composición que comprende microorganismos se congela a una temperatura de -40°C a -10°C, por ejemplo, cuando se usa secado en bandejas. En un aspecto preferido, la composición que comprende microorganismos se congela a una temperatura de -196°C a -130°C, por ejemplo, cuando se preparan gránulos congelados.

Composición

Un experto en la técnica apreciará que la composición de microorganismos liofilizada puede contener componentes además del microorganismo. Por lo tanto, en un aspecto la composición de microorganismos liofilizada comprende además componentes adicionales tales como al menos un protector.

El protector (o agente protector) se puede seleccionar de crioprotectores, lioprotectores y sus mezclas.

Los crioprotectores se pueden definir como sustancias usadas para prevenir o reducir el daño a las células o tejidos durante la congelación y para prevenir o reducir además el daño durante el almacenamiento congelado. Los crioprotectores a menudo funcionan cambiando las características del hielo.

Los lioprotectores se pueden definir como sustancias usadas para prevenir o reducir el daño a las células o tejidos durante la desecación o liofilización y, opcionalmente, para prevenir o reducir además el daño durante el almacenamiento en seco. Los lioprotectores a menudo funcionan protegiendo las estructuras biológicas después de que se haya eliminado el agua.

5 Algunas sustancias pueden actuar tanto como crioprotectores como lioprotectores.

Por lo tanto, se han usado diversos agentes protectores en la técnica, con diferentes grados de éxito. Estos agentes protectores incluyen antioxidantes, aminoácidos, proteínas, hidrolizados de proteínas, ciertos polímeros, leche desnatada, glicerol, carbohidratos tales como oligosacáridos y polisacáridos. Los ejemplos adecuados de proteínas o hidrolizados de proteínas incluyen los seleccionados del grupo que consiste en extracto de malta, leche desnatada en polvo, suero de leche en polvo, extracto de levadura, gluten, colágeno, gelatina, elastina, queratina y albúminas.

10

El protector también puede ser preferiblemente un compuesto implicado en la biosíntesis de ácidos nucleicos.

Preferiblemente, el protector es un carbohidrato. Los carbohidratos adecuados preferidos incluyen los seleccionados del grupo que consiste en pentosas (por ejemplo, ribosa, xilosa), hexosas (por ejemplo, fructosa, manosa, sorbosa), disacáridos (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, melibiosa, lactulosa), oligosacáridos (por ejemplo, rafinosa), oligofruktosas (por ejemplo Actilight, fribrolosas), polisacáridos (por ejemplo maltodextrinas, goma de xantano, pectina, alginato, celulosa microcristalina, dextrano, PEG) y alcoholes de azúcar (sorbitol, manitol, lactitol, maltitol, glicol, glicerol, eritritol, treitol, arabitol, xilitol, ribitol, dulcitol, iditol, isomalt y poliglicitol). En un aspecto, el carbohidrato es un carbohidrato con un peso molecular (MW) de 150 a 100.000 g/mol, más preferiblemente de 250 a 100.000 g/mol, incluso más preferiblemente de 300 a 40.000 g/mol y lo más preferiblemente de 500 a 15.000 g/mol. Preferiblemente, el protector se selecciona de trehalosa, sacarosa y maltodextrina. En un aspecto de la invención, el protector es trehalosa.

15

20

El protector se puede añadir a la composición de la presente invención en cualquier cantidad adecuada para proporcionar la protección deseada contra, por ejemplo, congelación o liofilización. Un experto en la técnica conoce las cantidades típicas de protector y un experto en la técnica puede identificarlas fácilmente. En un aspecto, se proporciona protector en la presente composición de microorganismos liofilizada en una cantidad menor que 90% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad menor que 85% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad menor que 80% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad menor que 75% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad menor que 70% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad menor que 65% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad de 40 a 80% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad de 50 a 70% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad de al menos 10% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad de al menos 20% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad de al menos 30% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad de al menos 40% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada, tal como en una cantidad de al menos 50% en peso basado en el peso total de la composición de microorganismos liofilizada.

25

30

35

El protector se puede añadir a la composición de microorganismos de modo que se incorpore en la composición de microorganismos liofilizada. En un aspecto preferido, el protector se añade a la composición de microorganismos antes de la congelación.

40

En otra realización, el procedimiento comprende una etapa adicional de adición de un protector antes de la etapa (i) y/o antes de la etapa de congelación (i').

La composición de microorganismos liofilizada puede contener el microorganismo, tal como una o más cepas de bacterias, en una cantidad adecuada que depende del uso final de la composición. En un aspecto preferido, la composición de microorganismos liofilizada comprende la una o más cepas de bacterias en una cantidad de 1E8 a 5E12 UFC/g, preferiblemente de 1E9 a 1E12 UFC/g, preferiblemente de 1E10 a 1E12 UFC/g, preferiblemente de 1E11 a 1E12 UFC/g de composición de microorganismos liofilizada

45

En un aspecto, el protector que se puede usar contiene sal de fosfato en un nivel bajo. En un aspecto, la composición liofilizada contiene cantidades bajas de sales de fosfato. En un aspecto, la composición liofilizada contiene cantidades bajas de fosfatos. Por "cantidades bajas" se entiende que la composición contiene menos de 15% en peso, preferiblemente menos de 12% en peso, preferiblemente menos de 10% en peso, preferiblemente menos de 8% en peso, preferiblemente menos de 5% en peso, preferiblemente menos de 3% en peso, preferiblemente menos de 2% en peso, preferiblemente menos de 1% en peso, preferiblemente menos de 0,5% en peso del material basado en el peso total de la composición.

50

55

En un aspecto, el protector que se puede usar no es o no contiene una sal de fosfato. En un aspecto, la composición

5 liofilizada está sustancialmente exenta de sales de fosfato. En un aspecto, la composición liofilizada está sustancialmente exenta de fosfatos. Por "sustancialmente exenta" se entiende que la composición contiene menos de 0,1% en peso, preferiblemente menos de 0,05% en peso, preferiblemente menos de 0,02% en peso, preferiblemente menos de 0,01% en peso, preferiblemente menos de 0,005% en peso, preferiblemente menos de 0,002% en peso, preferiblemente menos de 0,001% en peso, preferiblemente menos de 0,0001% en peso, preferiblemente menos de 0,00001% en peso del material basado en el peso total de la composición.

Liofilización

10 Como se describe en la presente memoria, una composición congelada que comprende microorganismos se somete a una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr] a una temperatura de 10 a 40°C durante un período de 24 a 72 horas para alcanzar una A_w inferior a 0,15, de modo que a la presión de secado la composición congelada se seca por sublimación del agua presente en la composición congelada, para proporcionar así una composición liofilizada que comprende los microorganismos.

Las presiones preferidas adicionales que se pueden aplicar a la composición congelada son

- de 133 Pa [1000 mTorr] a 330 Pa [2480 mTorr].
- 15 • de 133 Pa [1000 mTorr] a 320 Pa [2400 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 310 Pa [2330 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 300 Pa [2250 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 280 Pa [2100 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 275 Pa [2060 mTorr].
- 20 • de 133 Pa [1000 mTorr] a 270 Pa [2030 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 260 Pa [1950 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 250 Pa [1880 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 240 Pa [1800 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 230 Pa [1730 mTorr].
- 25 • de 133 Pa [1000 mTorr] a 220 Pa [1650 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 210 Pa [1580 mTorr].
- de 133 Pa [1000 mTorr] a 200 Pa [1500 mTorr].

Presiones más preferidas que se pueden aplicar a la composición congelada son

- de 140 Pa [1050 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- 30 • de 160 Pa [1200 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- de 180 Pa [1350 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- de 200 Pa [1500 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- de 220 Pa [1650 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- de 240 Pa [1800 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- 35 • de 260 Pa [1950 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- de 280 Pa [2100 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- de 300 Pa [2250 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].
- de 320 Pa [2400 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr].

Presiones más preferidas que se pueden aplicar a la composición congelada son

- 40 • de 140 Pa [1050 mTorr] a 320 Pa [2400 mTorr].

- de 160 Pa [1200 mTorr] a 300 Pa [2250 mTorr].
- de 160 Pa [1200 mTorr] a 280 Pa [2100 mTorr].
- de 160 Pa [1200 mTorr] a 260 Pa [1950 mTorr].
- de 160 Pa [1200 mTorr] a 240 Pa [1800 mTorr].

- 5
- de 160 Pa [1200 mTorr] a 220 Pa [1650 mTorr].
 - de 170 Pa [1280 mTorr] a 210 Pa [1580 mTorr].
 - de 180 Pa [1350 mTorr] a 200 Pa [1500 mTorr].

10 Un experto en la técnica entenderá que el secado de composiciones congeladas en el procedimiento conocido como liofilización implica aplicar una presión reducida a un material congelado y después permitir el aumento de la temperatura del material congelado de modo que el agua presente en el material congelado sublime. En un aspecto preferido de la presente invención, una vez que la presión reducida descrita en el presente documento se ha aplicado en la etapa (i), la composición se somete a una temperatura del estante de 10°C a 30°C, preferiblemente de 15°C a 30°C, más preferiblemente en la etapa (i) la composición se somete a una temperatura del estante de aproximadamente 25°C.

15 Un experto en la técnica entenderá que la temperatura aumentada aplicada al material congelado de manera que el agua presente en el material congelado sublime, se debe aplicar durante un período adecuado para permitir un secado sustancial de la composición. La presión de secado se aplica a la composición congelada que comprende microorganismos durante un período de 24 a 72 horas.

20 Un experto en la técnica entenderá que la presión de secado como se define en la presente invención se puede aplicar durante todo el procedimiento de secado. Sin embargo, en una realización particular, la presión de secado como se define en la invención se aplica solo a una parte del procedimiento de secado, tal como, por ejemplo, durante la primera parte, en medio y/o al final del procedimiento de secado. En una realización particular, la presión de secado como se define en la invención se aplica, por ejemplo, durante la primera parte, en medio y/o al final de la fase de secado primario. La fase de secado primario se puede definir como la parte del procedimiento de liofilización que implica la sublimación de hielo. En contraste, el secado secundario implica la desorción del agua unida.

25 En otra realización, el secado puede empezar usando una presión estándar baja (por ejemplo, 100 mTorr), después la presión de secado se puede aumentar a un valor como se define en la presente invención. Por lo tanto, la presión de secado como se define en la invención se puede aplicar durante un período de 5 a 100% del tiempo de secado, preferiblemente de 10 a 100%, preferiblemente de 20 a 100%, preferiblemente de 30 a 100%, preferiblemente de 40 a 100%, preferiblemente de 50 a 100%, preferiblemente de 60 a 100%, preferiblemente de 70 a 100%, preferiblemente de 80 a 100%, preferiblemente de 90 a 100% del tiempo de secado. En un ejemplo particular, la presión de secado como se define en la invención se aplica durante el procedimiento de secado entero (100% del tiempo de secado). Por lo tanto, la presión de secado como se define en la invención se puede aplicar durante un período de 5 a 100% del tiempo de la fase de secado primario, preferiblemente de 10 a 100%, preferiblemente de 20 a 100%, preferiblemente de 30 a 100%, preferiblemente de 40 a 100%, preferiblemente de 50 a 100%, preferiblemente de 60 a 100%, preferiblemente de 70 a 100%, preferiblemente de 80 a 100%, preferiblemente de 90 a 100% del tiempo de la fase de secado primario. En un ejemplo particular, la presión de secado como se define en la invención se aplica durante la fase de secado primario entera (100% del tiempo de secado primario).

40 La composición liofilizada se puede tratar además después de liofilización. En un aspecto, la composición liofilizada se muele después de completar la etapa (i).

Alimento o pienso

Como se describe en la presente memoria, la presente invención proporciona además

- un procedimiento para la preparación de un alimento o pienso, comprendiendo el procedimiento preparar una composición de microorganismos liofilizada según el presente procedimiento;
- 45 combinar la composición de microorganismos liofilizada con un producto alimenticio o alimento para animales.
- una composición de microorganismos liofilizada que se puede obtener por un procedimiento como se define en la presente memoria.
 - una composición de microorganismos liofilizada preparada por un procedimiento como se define en la presente memoria.
- 50 • un alimento o pienso que comprende

- (a) una composición de microorganismos liofilizada como se define en la presente memoria; y
- (b) un producto alimenticio o alimento para animales.

Según la presente invención, "alimento" significa productos adecuados para el consumo humano. Son materiales que contienen o consisten en nutrientes esenciales para el cuerpo, tales como carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas o minerales, y son ingeridos y asimilados por un organismo para producir energía, estimular el crecimiento y mantener la vida, presentados en forma de un sólido, líquido o pasta para el consumo. Estos materiales a menudo se combinan y mezclan a alta temperatura y tienen un contenido alto de humedad. Los microorganismos liofilizados de la presente invención son adecuados para usar en productos alimenticios. Se pueden mezclar con los materiales alimenticios que posteriormente se pueden hornear, tratar con vapor, comprimir, granular y/o moldear (barritas nutritivas, queso de hebra, cereales para el desayuno, etc.).

Los microorganismos liofilizados de la presente invención se pueden usar como iniciadores, tales como iniciadores lácteos. Los microorganismos liofilizados de la presente invención se pueden usar como un ingrediente en la preparación de alimentos y se añaden a productos alimenticios. Un producto alimenticio es un ingrediente que es adecuado para el consumo humano, ya sea solo o cuando se mezcla con otros ingredientes. Un ejemplo particular de producto alimenticio es la leche de origen animal y/o vegetal, tal como la leche de vaca, que se puede fermentar mediante los microorganismos liofilizados de la presente invención para obtener alimentos.

Los alimentos (o productos alimentarios) se pueden seleccionar del grupo que comprende barritas nutritivas, cereales para el desayuno, fórmulas infantiles, galletas bizcochos, mezclas para bizcochos, bocadillos, comidas y bebidas equilibradas, rellenos de frutas, glaseados para pasteles, rellenos de chocolate de pastelería, rellenos con sabor a pastel de queso, rellenos para pasteles con sabor a frutas, glaseados para pasteles y donuts, cremas para rellenos de pastelería instantáneos, rellenos para galletas, rellenos de pastelería listos para usar, rellenos reducidos en calorías, postres, productos de confitería (por ejemplo, ositos de goma, caramelos, chocolates y crujientes de chocolate, pralinés, gomitas de mascar, polos), bebidas tales como bebidas en polvo, refrescos, zumos de frutas, bebidas que comprenden proteínas de suero, téis saludables, bebidas de cacao, bebidas a base de leche, leches de soja completa y de chocolate enriquecidas en calcio, bebidas de café enriquecidas en calcio, bebidas basadas en bacterias del ácido láctico, bebidas nutricionales para adultos, bebidas de soja/zumo acidificadas, bebidas de chocolate asépticas/retorta, yogures, yogures para beber, quesos, quesos de hebra, quesos recombinados, helados, sorbetes, carnes.

En una realización específica, el producto alimenticio es un producto lácteo. Ejemplos de productos lácteos según la invención son leche fermentada, yogur, yogur para beber, nata madurada, queso, queso fresco, queso de hebra, bebida a base de leche, concentrado de producto lácteo, queso procesado, queso recombinado, postre de crema, requesón y leche para lactantes.

Entre los productos preferidos se encuentran los suplementos dietéticos, iniciadores lácteos, productos lácteos y productos cárnicos.

De acuerdo con la presente invención, "pienso" significa productos adecuados para el consumo animal y se pueden seleccionar del grupo que comprende "alimentos para mascotas" (pasteles, galletas, masticables, snacks ... para mascotas), productos de ensilaje y piensos granulados. El término "animal" debe entenderse con un significado amplio. Se puede referir a un "herbívoro poligástrico" que incluye, pero no se limita a bovinæ, cervidæ, antilocapridæ y camelidæ. Se puede referir, por ejemplo, a un "rumiante poligástrico" que incluye, pero no se limita a vacas, animales ovinos, ovejas, cabras, cérvidos, camellos, jirafas. También se puede referir a un "herbívoro monogástrico" tal como equinos y porcinos, así como a animales domesticados o mascotas (por ejemplo, perros, gatos, conejos, pájaros, ratas, ratones, cobayas, peces, reptiles ...). También se puede referir a aves de corral, gallinas, pollos, y también a cualquier clase de animales del campo de la acuicultura tales como gambas, etc.

Los microorganismos liofilizados de la invención se pueden añadir a piensos (un ingrediente que es adecuado para el consumo animal ya sea solo o cuando se mezcla con otros ingredientes) tal como mezcla de piensos sin granular, que se puede tratar posteriormente con vapor y/o que se granulan con vapor o secan. La mezcla no granulada se refiere a premezclas y masas. Las "premezclas" típicamente contienen vitaminas y minerales. Otros ingredientes tales como granos y arcillas también se pueden añadir a las premezclas. Las "masas" típicamente contienen la dieta animal completa. Los "gránulos" son partículas de forma esférica o cilíndrica creadas típicamente por compresión de la mezcla de pienso original que puede contener los microorganismos deshidratados recubiertos de la invención. Antes de la compresión, la mezcla de pienso se trata con vapor en un acondicionador durante 30 segundos a 5 min, a temperaturas que varían de 60°C a 95°C usando vapor inyectado.

Características de los microorganismos liofilizados

En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de presión de secado para preparar una composición de microorganismos liofilizada que tiene estabilidad mejorada y/o recuento de células mejorado y/o densidad aumentada y/o dispersabilidad mejorada, en donde se aplica una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr] a una temperatura de 10 a 40°C durante un período de 24 a 72 horas para alcanzar una A_w inferior a 0,15, a una composición congelada que comprende microorganismos para secar la composición congelada por sublimación

del agua presente en la composición congelada

La presente invención proporciona nuevas técnicas de secado para la preparación de composiciones liofilizadas que contienen microorganismos. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento en el que las composiciones congeladas que contienen microorganismos se liofilizan.

- 5 En este procedimiento, la liofilización se lleva a cabo a presiones que son mucho más altas que las usadas normalmente para la liofilización. El experto en la técnica no habría esperado obtener características mayores de los microorganismos, tales como la estabilidad, ya que podría haber pensado que una presión alta habría sido dañina para los microorganismos. Una ventaja de la presente invención es que este procedimiento (es decir, el uso de una presión alta para la liofilización de microorganismos) se puede implementar en diferentes técnicas de secado, tales como el secado de gránulos y el secado en bandejas, lo que conduce a mejores resultados.

10 En comparación con los gránulos obtenidos usando técnicas de liofilización convencionales (dicho procedimiento usando una presión de 100 mTorr), mejora tanto los recuentos de células, estabilidad, densidad como la dispersabilidad de los microorganismos liofilizados.

- 15 En comparación con el procedimiento de secado en bandejas convencional, se ha encontrado que los recuentos de células y la estabilidad celular de las composiciones liofilizadas de acuerdo con la presente invención superan las obtenidas para material comercialmente secado en bandejas. Además, la densidad aparente de las composiciones liofilizadas de acuerdo con la presente invención después de la molienda es equivalente a los mejores productos secados en bandejas. Además, las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) indican que las células de microorganismos en las presentes composiciones están encapsuladas en una matriz; se entiende que esto se traduce en su mejor estabilidad.

20 Una composición de microorganismos liofilizada que tiene estabilidad mejorada y/o recuento de células mejorado y/o densidad aumentada y/o dispersabilidad mejorada, significa que tiene uno o más de

- estabilidad (expresada en porcentaje de supervivencia) aumentada en al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces, preferiblemente al menos 4 veces, preferiblemente al menos 5 veces, preferiblemente al menos 6 veces, preferiblemente al menos 7 veces, preferiblemente al menos 8 veces, preferiblemente al menos 9 veces
- recuento de células (expresado en ufc o unidad formadora de colonias por gramo) aumentado en al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces
- densidad (definida como su masa por unidad de volumen) aumentada al menos 2 veces
- dispersabilidad aumentada al menos 1,5 veces

- 30 en comparación con el procedimiento de liofilización de gránulos convencional.

El término "estabilidad" debe entenderse como la viabilidad de un microorganismo durante un cierto período de tiempo.

El término "dispersabilidad" debe entenderse como la capacidad de una composición de microorganismos para dispersarse/suspenderse/disolverse/difundirse en una disolución acuosa.

- 35 La presente invención se describirá ahora con más detalle a modo de ejemplo solo con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La figura 1 muestra imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) del interior de un gránulo liofilizado de forma convencional de una cepa de *S. thermophilus*. (a) aumento de 54X del gránulo seco; (b) aumento de 540X del gránulo seco; (c) aumento de 2700X del gránulo seco. Las imágenes demuestran una estructura finamente texturizada y homogénea de la matriz de célula/protector.

- 40 La figura 2 representa imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) del interior de un gránulo liofilizado con alta presión de la misma cepa de *S. thermophilus*. (a) aumento de 34X del gránulo seco; (b) aumento de 540X del gránulo seco; (c) aumento de 2700X del gránulo seco (lo que parecen agujeros en esta foto son cavidades donde las células individuales han sido expulsadas del sitio en esta superficie fracturada).

Las imágenes demuestran una reorganización de la estructura de la matriz de célula/protector.

- 45 La presente invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Introducción

Las comparaciones de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de gránulos liofilizados de forma convencional y gránulos liofilizados con presión alta demuestran diferencias reales en las características físicas que

resultan de los dos procedimientos. Los gránulos congelados de forma criogénica de un lote de una cepa de *Streptococcus thermophilus* se dividieron en dos grupos. La mitad de los gránulos se secaron con un ciclo de liofilización convencional usando un ajuste de vacío de 100 mTorr, la otra mitad de los gránulos se secaron con un ciclo de presión alta usando un ajuste de vacío de 1400 mTorr. La figura 1 muestra que los gránulos bacterianos liofilizados de forma convencional tienen una estructura friable uniforme que consiste en una matriz intersticial estrecha y canales abiertos, a veces no más gruesos que una sola bacteria de 1,0 μm . La figura 2 muestra que los gránulos bacterianos liofilizados con presión alta tienen una matriz menos organizada, en la que el interior de un gránulo secado con presión alta se ha reorganizado. Los espacios abiertos se han convertido de canales estrechos en una serie interconectada de huecos esféricos, y las bacterias han quedado encapsuladas en bandas espesas de matriz.

La microscopía electrónica de barrido se realizó en un JEOL JCM 5000 NeoScope SEM. Las muestras se prepararon para la formación de imágenes por SEM por revestimiento con una placa de oro de 4-6 nm usando un dispositivo de revestimiento de pulverización catódica Cressington 108.

Parte experimental

Streptococcus thermophilus se produjo por fermentación discontinua. Las células se lavaron por adición de agua corriente al fermentado de células en una relación 1:1, y las células se concentraron por centrifugación para alcanzar una densidad celular de aproximadamente $3,0\text{E}+11$ ufc/ml a $4,0\text{E}+11$ ufc/ml. Se añadió una solución de referencia de trehalosa, un protector conocido, al concentrado celular. La combinación de concentrado celular/protector se mezcló completamente, y la mezcla se echó gota a gota en nitrógeno líquido para formar gránulos congelados. Los pellets congelados se almacenaron a -85°C hasta que se llevaron a cabo los experimentos de secado.

Se secaron partes alícuotas de 100 g de gránulos congelados de *Streptococcus thermophilus* en un liofilizador Virtis Genesis 35 EL a varias presiones:

para el ejemplo 1: 100, 1425 mTorr y 2010 mTorr; y

para el ejemplo 2: 100, 1000 y 1400 mTorr.

La capa de gránulos congelados varió de 1,6 a 3,8 cm. Para todos los experimentos, la temperatura del estante se controló a 25°C . El secado se mantuvo hasta que la temperatura de los gránulos era estable y cercana a 25°C . Los gránulos congelados se secaron durante un período tal que al final del ciclo de liofilización se proporcionaron gránulos liofilizados que tenían una A_w inferior a 0,15.

Después el material se molió usando un molino a escala de laboratorio (Jupiter Family Grain Mill) para proporcionar un polvo con un tamaño de partículas menor que n° de malla 30. Después, los gránulos liofilizados y el polvo liofilizado se caracterizaron con una serie de pruebas. El contenido de agua de los gránulos secos se evaluó midiendo la actividad de agua (A_w) usando un medidor HygroLab A_w (Rotronic). La concentración celular de los gránulos secos se midió resucitando las células en un tampón de peptona durante 2 minutos con agitación, y después se sembraron en placas usando un medio Ellikers (DIFCO). La incubación se llevó a cabo a 38°C durante 48 h. La estabilidad en el almacenamiento de los gránulos liofilizados se evaluó con un ensayo acelerado de vida en anaquel que consiste en colocar durante 14 días el material liofilizado en una incubadora a 38°C y medir los recuentos de células después de ese período de tiempo. Después se calculó un porcentaje de supervivencia dividiendo los recuentos de células obtenidos después de 14 días entre los recuentos de células iniciales.

La densidad aparente del polvo se calculó midiendo el peso de 10 ml de un polvo liofilizado. La densidad compactada se midió dando golpecitos en la probeta hasta alcanzar un volumen constante. La densidad compactada se calculó dividiendo el peso entre el volumen obtenido después de la compactación. La dispersabilidad del polvo liofilizado en agua se evaluó dejando caer una cucharada de polvo (2 g) en 100 ml de agua a temperatura ambiente, y después observando si el polvo flotaba en la superficie o se hundía rápidamente después de 1 minuto y 2 minutos. Después el agua se mezcló durante 10 segundos y se observó la disolución y se estimó visualmente la cantidad de polvo residual que flotaba o se decantaba en el fondo. Después se calculó un índice de dispersabilidad con una escala del 1 al 5, representando un índice de 5 un polvo altamente dispersable (como polvo que se hunde al fondo en menos de 1 minuto y no hay partículas que flotan o en el fondo del recipiente después de mezclado) y representando un índice de 1 un polvo poco dispersable (no se hunde el polvo en 2 minutos y la mayoría de las partículas flotan o están en el fondo después de mezclado).

Ejemplo 1

Se recogió un primer conjunto de datos que muestra que la densidad aparente y compactada aumenta en función de la presión de secado. Además, se puede observar que el recuento de células para una presión de secado de 1425 y 2010 mTorr era mayor que cuando la presión de secado se establecía en 100 mTorr.

ES 2 773 069 T3

Presión de secado (mTorr)	Aw	UFC/g	Densidad aparente (g/ml)	Densidad compactada (g/ml)
100	0,004	5,10E+11	0,20	0,33
1425	0,092	8,54E+11	0,44	0,58
2010	0,02	7,80E+11	0,58	0,74

Ejemplo 2:

En la segunda serie de experimentos, se evaluaron la estabilidad y la dispersabilidad. El ensayo de cultivo secado en bandejas también se ensayó en paralelo (el material secado en bandejas se hizo en un marco industrial). Los datos muestran que no solo el secado a una presión según la presente invención aumentaba la densidad del polvo, sino que también mejoraba la dispersabilidad, el recuento de células y la estabilidad en comparación con el polvo procedente de un procedimiento de secado de gránulos a 100 mTorr. La densidad y dispersabilidad del polvo secado según la presente invención también se acercaba a la densidad y dispersabilidad del polvo con el procedimiento en bandejas.

En este experimento, se obtuvo una composición de microorganismos liofilizada que tenía una estabilidad mejorada, un recuento de células mejorado, una densidad aumentada y una dispersabilidad mejorada. En efecto:

- la estabilidad aumentó en al menos 9 veces en comparación con el procedimiento de liofilización de gránulos convencional;
- el recuento de células aumentó en al menos 3 veces en comparación con el procedimiento de liofilización de gránulos convencional;
- la densidad aumentó al menos 2 veces en comparación con el procedimiento de liofilización de gránulos convencional;
- y la dispersabilidad aumentó al menos 1,5 veces en comparación con el procedimiento de liofilización de gránulos convencional.

Procedimiento de secado	Presión de secado (mTorr)	Temperatura del estante (grados °C)	Aw	Recuento de células	Porcentaje de supervivencia después de 14 días a 38°C	Densidad aparente	Densidad compactada	Dispersabilidad
Gránulos	100	25	0,008	2,6E11	8	0,25	0,31	1,5
Gránulos	1000	25	0,071	7E11	65	0,50	0,64	2,3
Gránulos	1400	25	0,075	6,5E11	63	0,47	0,57	2,1
Bandeja	100	Variable	0,046	5,5E11	37,5	0,57	0,71	3,5

Ejemplo 3 (Comparativo):

Se produjo *Lactobacillus acidophilus* por fermentación discontinua y se concentró por centrifugación. Después se mezclaron trehalosa y fosfato con el cultivo concentrado en cantidades convencionales para lioproteger la cepa, y la mezcla se echó gota a gota en nitrógeno líquido para formar gránulos congelados. Los gránulos congelados se almacenaron a -85°C hasta que se realizaron los experimentos de secado.

Se secaron partes alícuotas de 100 g de gránulos congelados de *Lactobacillus acidophilus* en un liofilizador Virtis Genesis 35 EL a varias presiones: 100 mTorr, 450 mTorr, 700 mTorr, 1000 mTorr y 1250 mTorr con una temperatura de estante de 15°C. La capa de gránulos congelados era de aproximadamente 2 cm. El secado se mantuvo hasta que la temperatura de los gránulos era estable y cercana a 15°C. Las Aw del material liofilizado se dan en la siguiente tabla.

Presión de secado (mTorr)	Aw
100	0,07
450	0,124
700	0,136
1000	0,181
1250	0,21

En conclusión, este ejemplo muestra que una cepa protegida con un protector basado en fosfato tiene una A_w que aumenta en función de la presión aplicada.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una composición de microorganismos liofilizada, que comprende la etapa de
5 (i) someter una composición congelada que comprende microorganismos a una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 338 Pa [2540 mTorr] a una temperatura de 10 a 40°C durante un período de 24 a 72 horas para alcanzar una A_w inferior a 0,15, de modo que a la presión de secado la composición congelada se seca por sublimación del agua presente en la composición congelada para proporcionar una composición liofilizada que comprende los microorganismos.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en levaduras, mohos, hongos, bacterias y sus mezclas.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en donde los microorganismos se seleccionan de una o más cepas de bacterias.
4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en donde la una o más cepas de bacterias se seleccionan de bacterias del ácido láctico, preferiblemente *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*.
- 15 5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición congelada está en forma de gránulos congelados.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el procedimiento comprende la etapa adicional de (i') congelar una composición que comprende microorganismos para proporcionar la composición congelada de la etapa (i).
- 20 7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición de microorganismos liofilizada comprende la una o más cepas de bacterias en una cantidad de 1E8 a 5E12 UFC/g de composición de microorganismos liofilizada.
- 25 8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en la etapa (i) la composición congelada se somete a una presión de secado de 133 Pa [1000 mTorr] a 300 Pa [2222 mTorr], preferiblemente de 133 Pa [1000 mTorr] a 275 Pa [2000 mTorr], más preferiblemente de 133 Pa [1000 mTorr] a 200 Pa [aproximadamente 1500 mTorr].
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en la etapa (i) la composición se somete a una temperatura de aproximadamente 25°C.
- 30 10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición liofilizada posteriormente se muele.
11. Un procedimiento para la preparación de un alimento o pienso, comprendiendo el procedimiento
(a) preparar una composición de microorganismos liofilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
(b) combinar la composición de microorganismos liofilizada con un producto alimenticio o alimento para animales.
- 35 12. Una composición de microorganismos liofilizada que se puede obtener o preparar por un procedimiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Un alimento o pienso que comprende
(a) una composición de microorganismos liofilizada como se define en la reivindicación 12; y
(b) un producto alimenticio o alimento para animales.

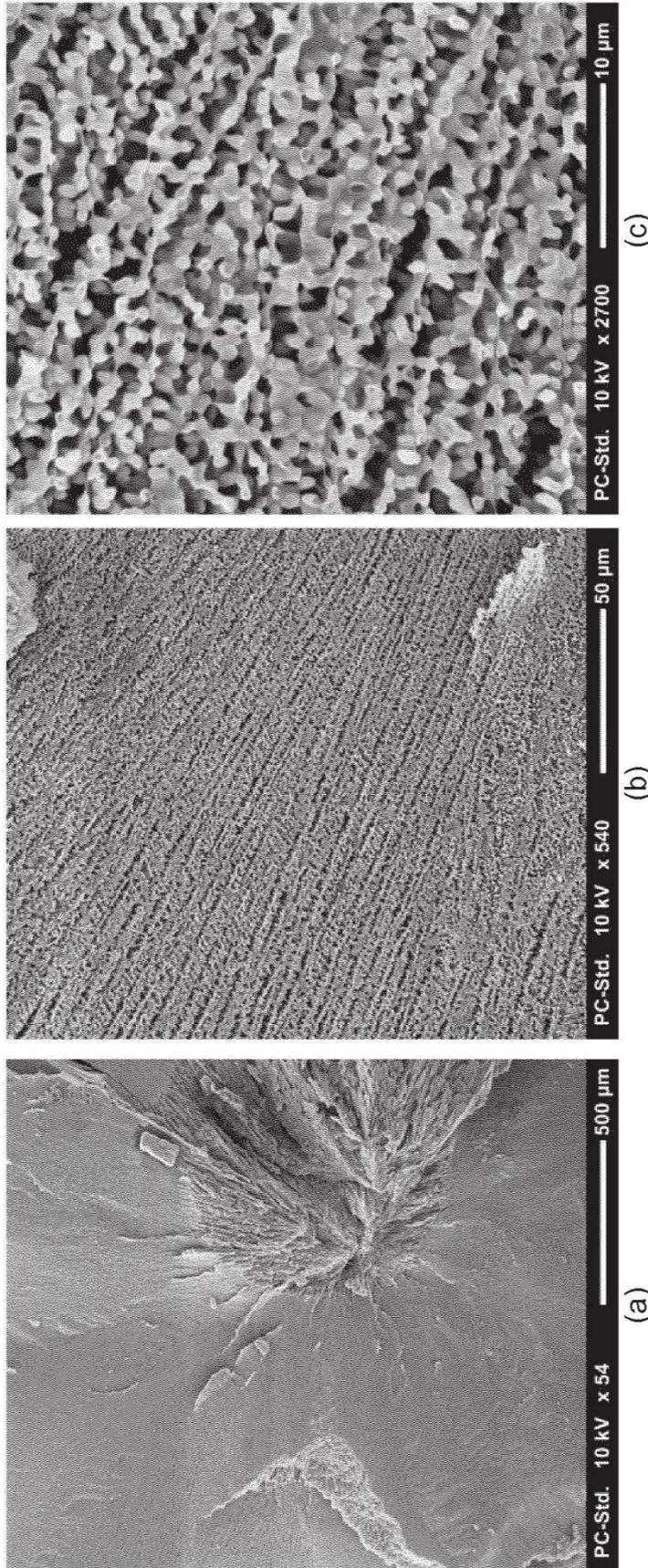


Figura 1. Imágenes de microscopio electrónico de barrido del interior de un gránulo liofilizado de forma convencional de una cepa de *S. thermophilus*. (a) aumento de 54X del gránulo seco; (b) aumento de 540X del gránulo seco; (c) aumento de 2700X del gránulo seco. Las imágenes demuestran una estructura finamente texturizada y homogénea de la matriz de célula/protector.

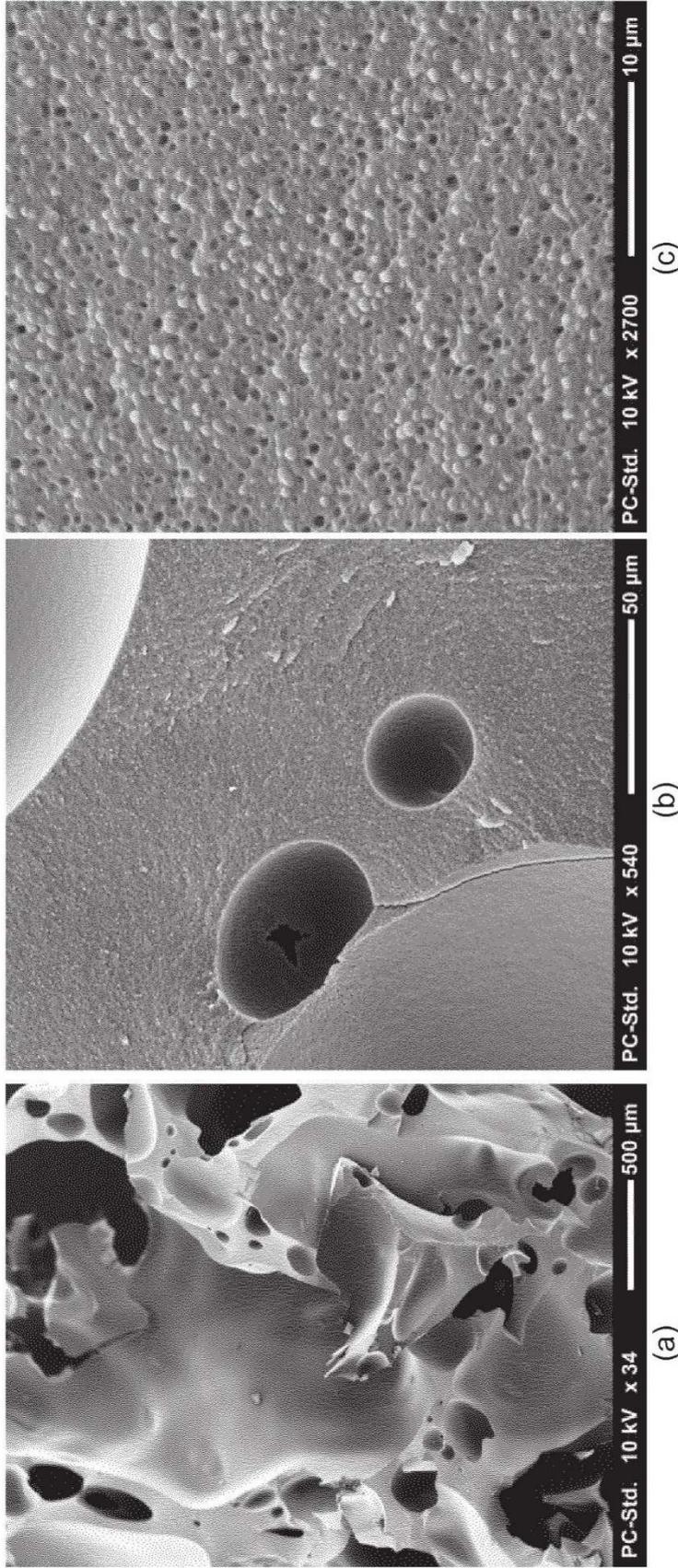


Figura 2. Imágenes de microscopio electrónico de barrido del interior de un gránulo liofilizado con presión alta de una cepa de *S. thermophilus*. (a) aumento de 34X del gránulo seco; (b) aumento de 540X del gránulo seco; (c) aumento de 2700X del gránulo seco (lo que parecen agujeros en esta foto son cavidades donde las células individuales han sido expulsadas del sitio en esta superficie fracturada).

Las imágenes demuestran una reorganización de la estructura de la matriz de célula/protector.