



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 707**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/04** (2006.01)

**C12N 11/04** (2006.01)

**A23L 1/03** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61K 35/66** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01917167 .7**

86 Fecha de presentación : **16.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1265983**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54

Título: **Procedimiento de producción de partículas que contienen microorganismos vivos recubiertos.**

30

Prioridad: **16.03.2000 FR 00 03409**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2008**

73

Titular/es: **Lallemand S.A.S.**  
**19, rue des Briquetiers**  
**31700 Blagnac, FR**

72

Inventor/es: **Durand, Henri y**  
**Panes, Jérôme**

74

Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 306 707 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 de producción de partículas que contienen microorganismos vivos recubiertos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de partículas que contienen microorganismos vivos deshidratados recubiertos con ayuda de una sustancia que permite aumentar la resistencia de dichos microorganismos a las tensiones fisicoquímicas tales como el calor, humedad, acidez o la compresión. La presente invención se refiere también a las aplicaciones de estas partículas en composiciones farmacéuticas, dietéticas o alimentarias.

10 El uso de microorganismos vivos deshidratados en aplicaciones farmacéuticas, dietéticas o agroalimentarias a menudo implica que cuando se fabrican, almacenan o se usan en la práctica, estos microorganismos estén sometidos a tensiones fisicoquímicas tales como, por ejemplo, condiciones de presión, temperatura, humedad o acidez elevadas. Esto tiene como resultado el efecto en su capacidad para recobrar una actividad normal después de la rehidratación, cuando su tasa de supervivencia no se ha reducido extremadamente simplemente por la agresividad de dichos tratamientos.

Se han propuesto varias soluciones que apuntan a recubrir los microorganismos con una sustancia protectora.

20 Por ejemplo, la patente WO 99/49846 enseña el recubrimiento de bacterias con polímeros, tales como poliacrilamidas, o copolímeros asociados a fosfolípidos. Sin embargo, dichos polímeros no están autorizados en los productos alimentarios o farmacéuticos.

25 La patente FR 96 06215 describe el recubrimiento de bacterias con polímeros o polisacáridos hidrosolubles, lo cual excluye cualquier estabilización en medio acuoso. En particular, para la conservación de productos que contienen microorganismos deshidratados es obligatorio garantizar una tasa de humedad muy débil, con el fin de que no sea posible ninguna reanudación de actividad antes de su uso en el medio deseado.

Por este motivo se han propuesto otros procedimientos que usan a modo de materia protectora sustancias comestibles y resistentes a la humedad.

30 De acuerdo con el procedimiento descrito en el documento DE 3738599, se encapsulan levaduras en materias grasas, tales como ésteres de ácidos grasos, cuya temperatura de reblandecimiento es superior a 29°C. De este modo se retrasa algunas horas el inicio de la fermentación de pan en los trozos de pasta preparados o descongelados, aprovechando el reblandecimiento progresivo de la sustancia de recubrimiento usada. Por lo tanto, dichas partículas no permiten asegurar una protección mecánica contra la compresión, ni una protección térmica eficaz.

35 La patente WO 9212224 se refiere a bacterias deshidratadas encapsuladas en ácidos grasos, y más en particular a *Enterococcus faecium* encapsulado en ácido esteárico. Las cápsulas se forman a partir de una pasta compuesta de bacterias y ácido graso íntimamente mezclados en una relación de 50 a 90% en peso de ácido graso, y se presentan como microesferas de aglutinante en las que las bacterias están dispersas de forma aleatoria. El tamaño de las partículas obtenidas varía entre 75 y 300  $\mu\text{m}$ . Las partículas obtenidas se pueden usar como probióticos. Dichas cápsulas no conllevan una capa de protección depositada regularmente sobre los microorganismos que aporte una estabilidad química y una resistencia mecánica y térmica homogéneas. El procedimiento de fabricación que mezcla el aglutinante fundido y la bacteria limita esta técnica al recubrimiento de microorganismos raros que sobreviven a un tratamiento a temperaturas elevadas, ya que la temperatura de fusión del ácido esteárico es de  $70 \pm 1^\circ\text{C}$ . Además, el tamaño de las microesferas obtenidas está comprendido entre 75 y 300  $\mu\text{m}$ , lo cual limita también la aplicación del procedimiento al recubrimiento de masas celulares iniciales de tamaño inferior a estos valores (y también plantea problemas de taponamiento durante las manipulaciones).

50 La patente US 4888171 describe un producto granular constituido por un núcleo, de azúcar cristalizado por ejemplo, el cual está recubierto de una composición adherente formada de una mezcla de un aglutinante con punto de fusión comprendido entre 25 y 60°C y de células bacterianas secas. El producto obtenido tiene una estructura estratificada que rodea el núcleo. Este producto se prepara por un procedimiento según el cual el aglutinante se vaporiza en una cámara de granulación de forma concomitante con la alimentación de células bacterianas secas, estando comprendida la temperatura ambiente de la cámara entre 25 y 55°C. De esta forma, para un recubrimiento que tiene un punto de fusión superior a 60°C, la cámara de granulación deberá mantenerse a una temperatura superior a 55°C, a la cual los microorganismos mueren parcialmente o están tan deteriorados que perecen a continuación. Por este motivo este procedimiento está restringido al uso de materias de recubrimiento cuyo punto de fusión sea inferior a 60°C.

60 Todas las técnicas descritas anteriormente conllevan inconvenientes ligados al imperativo de conciliar los procedimientos de fabricación agresivos y las entidades biológicas frágiles, lo cual constituye un obstáculo para obtener una protección eficaz y duradera de microorganismos vivos, que no se ha superado hasta ahora.

Así pues, las soluciones técnicas propuestas no permiten a la vez:

- 65
- preparar partículas protectoras de microorganismos vivos,
  - y conservar los microorganismos durante la fabricación de dichas partículas.

## ES 2 306 707 T3

En efecto, hasta el momento o la materia de recubrimiento tiene un punto de fusión suficientemente bajo para no deteriorar los microorganismos durante la preparación de las partículas, pero no es sólida a temperatura ambiente y dichas partículas no pueden asegurar una protección eficaz y duradera; o se aplican condiciones elevadas de temperatura para obtener la fusión de la materia que debe recubrir las células, lo que permite obtener partículas sólidas y resistentes a temperatura ambiente, pero que dañan gravemente la viabilidad de los microorganismos.

Por lo tanto, parece que hasta el momento no se han podido producir, a partir de aglomerados de células de microorganismos vivos deshidratados preexistentes, partículas recubiertas que presenten una resistencia elevada a las tensiones fisicoquímicas tales como el calor, humedad, acidez gástrica o la presión, de forma eficaz y duradera, y que puedan usarse en aplicaciones de dietética, farmacia y agroalimentación.

Las partículas obtenidas según la invención presentan la ventaja de una buena resistencia a las tensiones mecánicas, una excelente estabilidad química en condiciones de almacenamiento poco exigentes y para el uso buscado unido a una viabilidad perfecta, gracias a la puesta a punto de un procedimiento sencillo y de alcance general, que a partir de ahora hace posible el uso de un gran número de sustancias para el recubrimiento y la protección de microorganismos vivos variados.

El principio del procedimiento de preparación llevado a cabo en la presente invención se basa en el enfriamiento rápido de microgotas de sustancia de recubrimiento durante su inyección en una cámara de granulación, en el que la cámara contiene los microorganismos que se van a recubrir mantenida a una temperatura regulada compatible con la supervivencia de los microorganismos. La elección de la sustancia de recubrimiento ya no depende entonces de la compatibilidad entre su punto de fusión y la temperatura que tolera el microorganismo durante la preparación, sino únicamente de los criterios buscados para el producto final.

Se puede usar, por ejemplo, un recubrimiento cuyo punto de fusión sea superior a la temperatura del cuerpo humano, de modo que las partículas no se funden y permanecen intactas durante la ingestión, con el fin de no liberar el o los microorganismos útiles hasta que estén en el estómago. Si además el recubrimiento elegido es apto para resistir, al menos parcialmente, el ataque de los jugos gástricos, se podrá aportar la flora útil más allá de la barrera gástrica.

Las propiedades de resistencia mecánica elevada se obtienen por la combinación esencialmente de dos factores. Por una parte, la sustancia de recubrimiento se elige para que esté en estado sólido a la temperatura de conservación, y por otra parte, las partículas se forman con una sola capa de materia hidrófoba que recubre de forma homogénea el aglomerado de células secas, que no presenta cavidades que afloran en la superficie de forma que no se facilite la formación de fisuras ni los ataques químicos, ni la rotura y aplastamiento.

Por último, las partículas objeto de la presente invención son particularmente fáciles de usar, puesto que tienen una granulometría que les confiere propiedades de fluidez apreciables en la preparación y la manipulación de las partículas, ya que estas tienen una fluidez comparable a la de un líquido y no producen taponamiento.

Así pues, la presente invención mediante la elección razonable de diferentes parámetros químicos y físicos que se expondrán a continuación, propone un procedimiento de producción de partículas dotadas de propiedades originales, que contienen microorganismos vivos de naturaleza variada, que permite conciliar las diferentes exigencias técnicas a nivel de su fabricación, su conservación y su aplicación.

La solución del problema reside en la realización de partículas constituidas por un aglomerado de microorganismos vivos deshidratados y una capa de recubrimiento hidrófobo homogéneo.

La capa hidrófoba está compuesta principalmente de una sustancia elegida entre las materias grasas, y en particular entre ácidos grasos o ceras, puros o mezclados entre sí. La característica esencial de la capa de recubrimiento es su punto de fusión que puede estar comprendido entre 20 y 100°C, preferiblemente entre 30 y 80°C. Se prefieren los ácidos grasos saturados y en particular el ácido esteárico. También puede usarse el ácido palmítico por sus cualidades técnicas. Las ceras animales o vegetales, tales como la cera de carnauba también son adecuadas.

A esta capa de recubrimiento se le pueden añadir otras moléculas de aditivos conocidos, tales como antioxidantes, azúcares o proteínas, para mejorar la estabilidad de los microorganismos en las condiciones de fabricación y/o de conservación de los microorganismos recubiertos según la invención.

La capa de recubrimiento recubre las masas celulares de forma homogénea, es decir, su espesor varía poco y sobretodo tiene una estructura uniforme y no contiene inclusiones ni cavidades que puedan afectar a la regularidad de su superficie y de la misma forma a su rigidez y cohesión. También es químicamente homogénea.

Está claro que se recomienda la elección de compuestos compatibles con los usos previstos de las partículas según la invención. En particular, se elegirán preferiblemente materias que respondan al criterio de calidad alimentaria.

Los microorganismos dirigidos a ser recubiertos son células vivas secadas por liofilización, atomización o en lecho fluidizado, y de un modo que se puedan revivir. Estas técnicas son conocidas por los expertos en la técnica. Después de la molienda se obtienen aglomerados de células que se presentan en forma de polvo más o menos fino. Estas masas

## ES 2 306 707 T3

celulares pueden ser prácticamente esféricas, ovoides o alargadas, lisas o rugosas, regulares o irregulares. Su tamaño está comprendido entre algunos micrómetros y varios milímetros.

5 Hay una gran variedad de microorganismos, incluso los más frágiles y sensibles a las condiciones del medio, que son susceptibles de usarse en la preparación de partículas según la invención, en la medida en que el procedimiento de fabricación de las partículas es poco agresivo comparado con las técnicas anteriores conocidas. Se pueden citar las bacterias de uso alimentario, dietético o farmacéutico tales como por ejemplo los lactobacilos, en particular *Lactobacillus casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. helveticus*; bifidobacterias; estreptococos, en particular *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*; lactococos tales como *Lactococcus lactis*; pediococos en particular *Pediococcus acidilactici*; enterococos; levaduras de los géneros *Saccharomyces* (en particular *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*), *Kluyveromyces*, etc. La elección de uno o de una mezcla de estos microorganismos vendrá determinada ante todo por la aplicación final a la que esté destinado, no siendo el criterio limitante las condiciones de fabricación relativamente suaves propuestas por la presente invención.

15 Los polvos secos de los microorganismos mencionados antes, obtenidos por liofilización, atomización o secado en lecho fluidizado, son adecuados como material de partida, no siendo la lista limitante. Así, las partículas según la invención también pueden contener microorganismos que pertenecen a otras especies y que tienen interés para otros campos de aplicación, tales como el cosmético, la protección medioambiental, los procedimientos industriales que necesitan, por ejemplo, el aporte dirigido de aditivos, o cualquier otro campo.

20 En las partículas según la invención, la proporción de materia de recubrimiento en relación a la cantidad de microorganismos está comprendida entre 10 y 90% en peso, ventajosamente entre 30 y 80%. Si la capa de recubrimiento es demasiado fina, la protección será insuficiente; a la inversa, si la capa es demasiado espesa, la liberación de los microorganismos será más larga. Por lo tanto, este parámetro se regulará según la aplicación final prevista, en función de la rapidez de liberación de los microorganismos deseada.

30 La concentración de bacterias viables en las partículas recubiertas se deduce a partir de la proporción relativa entre la sustancia de recubrimiento y el polvo seco usado. Efectivamente, conociéndose el número de microorganismos por gramo de polvo seco antes del recubrimiento, se puede calcular la concentración por partícula después del recubrimiento. Este valor teórico se compara con el valor real medido por los procedimientos clásicos, a modo de control.

35 La concentración de bacterias viables se expresa en UFC/g: unidades formadoras de colonia recubiertas del microorganismo pertinente por gramo de partículas. El procedimiento de medición se hace por recuento microbiológico en placa Petri, después de dilución adecuada, según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

40 Las partículas finales tienen un tamaño controlado, que depende del tamaño de los aglomerados de microorganismos del polvo de partida y del espesor del recubrimiento depositado, con un diámetro medio que puede variar entre 100 y 5000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 300 y 2000  $\mu\text{m}$ . Se puede variar el tamaño de los aglomerados liofilizados en función de la aplicación prevista, usando cualquier técnica disponible para el experto en la materia, por ejemplo por molienda prolongada.

45 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de partículas de microorganismos vivos deshidratados recubiertos como se ha descrito anteriormente, que consiste en inyectar en una cámara materia hidrófoba fundida, en una masa de microorganismos agitados permanentemente por rotación del disco que hace las veces de base de la cámara, y barrida por una corriente de aire seco de temperatura fijada.

50 Este procedimiento se caracteriza porque se inyecta una sustancia hidrófoba a una temperatura superior a su temperatura de fusión, estando comprendida dicha temperatura de inyección entre 30 y 120°C, en una cámara que contiene dichos microorganismos agitados por rotación de la base de dicha cámara y barridos por un flujo de aire a una temperatura comprendida entre 10 y 50°C, de modo que la temperatura dentro de la cámara no supere en más de 5°C la temperatura de viabilidad de dichos microorganismos.

55 Efectivamente, de forma sorprendente se ha encontrado que se puede obtener, mediante inyección de productos hidrófobos fundidos en una cámara en la que las partículas están sometidas a una agitación rotatoria y a un barrido por un flujo de aire, y habiéndose escogido razonablemente los parámetros, partículas recubiertas que presentan las características deseadas de estabilidad física y química.

60 El procedimiento de recubrimiento usa un equipamiento comercial estándar, llamado granulador, disponible en diferentes tamaños compatibles con volúmenes de producción desde centenares de gramos a centenares de kilogramos por operación.

65 La figura 1 es una representación esquemática del dispositivo. Con referencia a este dibujo, el dispositivo comprende una cámara de acero inoxidable, cuya base (2) está constituida por un disco provisto de un movimiento rotatorio por un motor (3). Un flujo de aire es inyectado por el espacio (4) entre la base (2) y el cuerpo (1) de la cámara. El aire se escapa de la cámara por un filtro (5) puesto en la parte superior de la cámara. La masa de microorganismos en polvo (6) es agitada por la rotación del disco (2). Una boquilla (7) permite la inyección, por medio de una bomba (8), del producto de recubrimiento mantenido a una temperatura superior a su punto de fusión a un recipiente con termostato (9).

## ES 2 306 707 T3

En la puesta en práctica del procedimiento según la invención, los parámetros cuya elección es crítica para obtener un recubrimiento homogéneo son la temperatura del producto de recubrimiento, la temperatura del aire que barre la cámara, la velocidad de rotación, el caudal de inyección del producto de recubrimiento, y las masas de productos usadas. Los ejemplos 1 a 4 ilustran modos de realización particulares de la invención, sin limitar su alcance.

5

La temperatura de la sustancia de recubrimiento puesta en el recipiente con termostato (9) está comprendida entre 30 y 120°C, preferiblemente entre 60 y 120°C. En todo caso debe ser superior al punto de fusión de dicha sustancia, sea esta un producto puro o una mezcla.

10

La temperatura del aire que barre la cámara de granulación está comprendida entre 10 y 50°C. Esta controlada estrictamente, de forma que en el momento de la inyección del producto de recubrimiento fundido, la elevación de temperatura que sufren los microorganismos no sea más de unos grados, como máximo 5°C. Para algunos microorganismos que soportan mal las temperaturas superiores a 40°C, se reducirá, por supuesto, la temperatura de la cámara.

15

La velocidad de rotación y el caudal de inyección del producto de recubrimiento son parámetros interdependientes y asociados a las masas de producto usadas. La velocidad de rotación en general está comprendida entre 50 y 500 rpm (rotaciones por minuto). La inyección del producto de recubrimiento se puede hacer con ayuda de una o varias boquillas repartidas en la periferia de la cámara.

20

El conjunto de los parámetros también se ajusta en función de la forma de los aglomerados de células de partida y de la naturaleza del producto de recubrimiento.

25

Las ventajas del procedimiento descrito antes residen en la posibilidad de recubrir de forma no agresiva masas de microorganismos de forma y tamaño variados, mediante una capa hidrófoba resistente que permite una protección eficaz y duradera, así como en las numerosas posibilidades de aplicación que ofrecen dichas propiedades por la gran diversidad de organismos que pueden recubrirse de este modo, en particular en los campos farmacéutico, dietético o alimentario.

30

La invención también tiene como objeto el uso de las partículas descritas en lo que antecede en los campos farmacéutico, dietético o agroalimentario. En particular, la invención permite añadir microorganismos en diferentes productos alimentarios como cereales, dulces, leche en polvo, en comprimidos, etc. permitiendo una viabilidad suficiente de dichos microorganismos durante la fabricación de dichos productos y durante el periodo del almacenamiento que precede al consumo. También permiten proteger a los microorganismos contra la acidez gástrica para una mejor actividad en el intestino. A partir de las propiedades originales de las partículas de la invención, se pueden prever igualmente muchos otros usos.

35

Los siguientes ejemplos ilustran de forma no limitante modos de realización de la presente invención, y parámetros usados para producir diferentes tipos de partículas.

40

### Ejemplo 1

#### *Recubrimiento de Lactobacillus acidophilus con ácido esteárico*

45

Se introducen 600 g de un polvo liofilizado de bacterias *Lactobacillus acidophilus*, cepa R052, depositada en el CNCM con el N° I-1722, comercializado por el Instituto Rosell, 8480, boulevard Saint-Laurent, Montreal, Canadá, en un granulador con flujo de aire de marca Glatt, modelo GPCG1, en la configuración de "rotor", que tiene una capacidad de 3 litros. Se introducen 900 g de ácido esteárico (Fluka, referencia 85683, punto de fusión P.F. = 69-71°C) en el recipiente con termostato (9).

50

La operación de recubrimiento se lleva a cabo de acuerdo con los siguientes parámetros:

55

- velocidad del rotor: 300 rpm
- velocidad del aire en la cámara: 3 a 4 m/s con abertura de la válvula de entrada al 40%
- presión de pulverización del recubrimiento: 2 bares (200 kPa)
- caudal de recubrimiento: 40 g/minuto
- temperatura del aire de pulverización: 120°C
- temperatura del ácido esteárico: 100°C
- temperatura del aire de entrada: 30°C
- temperatura del producto: 32-35°C.

60

65

## ES 2 306 707 T3

Al final de la operación, el granulador se vacía y las partículas se recogen y se almacenan en sobres herméticos.

Las partículas así obtenidas tienen las siguientes características:

- 5 - El diámetro medio de las partículas es de 400  $\mu\text{m}$ , con el 92% comprendido entre 100 y 600  $\mu\text{m}$ .
- El contenido de recubrimiento es de 60%.
- 10 - La concentración de bacterias viables del polvo de partida es de  $3,2 \cdot 10^{11}$  UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo), la de las partículas recubiertas  $1,2 \cdot 10^{11}$  UFC/g de polvo introducido inicialmente.

### Ejemplo 2

#### 15 *Recubrimiento de Lactobacillus casei con una mezcla de ácidos grasos*

Se introducen 600 g de un polvo liofilizado de *Lactobacillus casei*, cepa EQ 85 (depositada en el CNCM con el N° MA 64/4U), comercializado por Lallemand SA, 15130 Saint Simon, en el mismo granulador que el usado en el ejemplo 1, y el producto de recubrimiento se pone en el recipiente con termostato. El producto de recubrimiento es una mezcla de ácido esteárico/ácido palmítico a partes iguales, cuyo punto de fusión es P.F. = 55°C, comercializado por Exaflor (47, ailée de Chanteraine, 91190 Gif sur Yvette, Francia), con la denominación Stéarine™ 50/50.

Los parámetros usados son los mismos que los mencionados en el ejemplo 1, excepto:

- 25 - temperatura del producto de recubrimiento: 80°C
- temperatura del aire de entrada: 25°C
- 30 - temperatura del producto: 28-32°C

Las partículas obtenidas tienen las siguientes características:

- 35 - Tienen un diámetro medio de 750  $\mu\text{m}$ , con el 90% comprendido entre 100 y 1000  $\mu\text{m}$ .
- El contenido de ácido graso es de 60%.
- 40 - La concentración de bacterias viables del polvo de partida es de  $4,8 \cdot 10^{11}$  UFC/g, la de las partículas recubiertas  $1,6 \cdot 10^{11}$  UFC/g.

### Ejemplo 3

#### 45 *Recubrimiento de Saccharomyces cerevisiae con una cera vegetal*

Se introducen 750 g de una preparación de levadura seca *Saccharomyces cerevisiae*, depositada en el CNCM con el N° I-1079, comercializada con la marca Levucell SB, por Lallemand Sarl, 15130, Saint SIMON, en el granulador con flujo de aire usado en el ejemplo 1, y se recubren con 750 g de una cera vegetal, cera de carnauba, cuyo punto de fusión es P.F. = 83-88°C, (comercializada por Exaflor, Gif sur Yvette, Francia).

50 Los parámetros son idénticos a los del ejemplo 1, excepto:

- temperatura de la cera: 120°C
- 55 - temperatura del aire de entrada: 40°C
- temperatura del producto: 45-48°C

60 Las partículas obtenidas tienen las siguientes características:

- Tienen un diámetro medio de 1200  $\mu\text{m}$ , con el 90% comprendido entre 500 y 25000  $\mu\text{m}$ .
- El contenido de ácido graso es de 50%.
- 65 - La concentración de células viables del polvo de partida es de  $3 \cdot 10^{10}$  UFC/g, la de las partículas recubiertas  $1,45 \cdot 10^{10}$  UFC/g del polvo de partida.

## ES 2 306 707 T3

### Ejemplo 4

#### *Recubrimiento de Pediococcus acidilactici con una mezcla de ácidos grasos*

5 Se introducen 80 g de polvo liofilizado de *Pediococcus acidilactici*, cepa depositada en el CNCM con el N° MA 18/5M, comercializado por Lallemand SA, 15130, Saint SIMON, con la marca Bactocell, en un granulador GLATT<sup>(TM)</sup>, modelo CRG200, de 450 litros de capacidad, equipado con 2 boquillas de inyección. Las células liofilizadas se recubren con 160 kg de Stéarine 50/50<sup>(TM)</sup> (Exaflor, Gif sur Yvette, Francia).

10 Los parámetros de preparación de las partículas son los siguientes:

- velocidad del rotor: 120 rpm
- caudal de aire: 1500 a 2000 m<sup>3</sup>/h
- 15 - presión de pulverización: 5 bares (500 kPa)
- caudal del ácido graso: 800 g/min (400 g/min por boquilla, en las 2 boquillas)
- 20 - temperatura del recubrimiento: 80°C
- temperatura del aire de pulverización: 120°C
- temperatura del aire de entrada: 25°C
- 25 - temperatura del producto: 30°C±2°C.

Las partículas obtenidas tienen las siguientes características:

- 30 - El diámetro medio es de 400 μm, con el 87% comprendido entre 100 y 600 μm.
- El contenido de recubrimiento es de 75%.
- 35 - La concentración de bacterias viables del polvo de partida es de 3.10<sup>11</sup> UFC/g, la de las partículas recubiertas 7,5.10<sup>11</sup> UFC/g.

### Ejemplo 5

#### *Estabilidad térmica*

Se estudió la viabilidad de las bacterias *Lactobacillus acidophilus* en el polvo liofilizado usado en el ejemplo 1 por una parte, y en las partículas recubiertas obtenidas según este mismo ejemplo 1 por otra parte, en las siguientes condiciones:

Se introducen muestras de 10 gramos de cada preparación en tubos herméticos, mantenidos en un baño maría a 50°C. Se retira un tubo de cada preparación del baño maría después de 1 hora, 4 horas, 7 horas y 24 horas, y se determina inmediatamente la concentración de bacterias viables.

50 Los resultados se dan en la siguiente tabla 1. Las concentraciones se expresan en UFC/g y en porcentaje de la concentración de cada muestra a T = 0:

TABLA 1

55

60

65

Tiempo	0	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses
Polvo liofilizado	3,1.10 <sup>9</sup> (100%)	1,3.10 <sup>9</sup> (42%)	1,2.10 <sup>9</sup> (38%)	9,9.10 <sup>8</sup> (32%)	4,8.10 <sup>8</sup> (15%)
Partículas recubiertas	7,5.10 <sup>8</sup> (100%)	6,4.10 <sup>8</sup> (85%)	5,5.10 <sup>8</sup> (73%)	5,3.10 <sup>8</sup> (71%)	5,2.10 <sup>8</sup> (69%)

## ES 2 306 707 T3

La estabilidad a 50°C de las bacterias en forma de partículas recubiertas según la presente invención mejora mucho en relación con la de las bacterias en forma de polvo liofilizado.

### 5 Ejemplo 6

#### *Estabilidad en la leche en polvo*

10 Se estudió la viabilidad de las bacterias *Pediococcus acidilactici* en el polvo liofilizado usado en el ejemplo 4 por una parte, y en las partículas recubiertas obtenidas según este mismo ejemplo 4 por otra parte, en las siguientes condiciones:

15 Las preparaciones de bacterias se mezclan con leche en polvo (marca Régilait) en una relación de 1% en peso de preparación bacteriana por 99% de leche en polvo. Las mezclas se reparten en muestras de 100 gramos en sobres de polietileno sellados. Los sobres se mantienen a 30°C en una estufa. Cada mes se analiza el contenido de bacterias viables en un sobre de cada mezcla.

20 Los resultados se indican en la siguiente tabla 2. Las concentraciones se expresan en UFC/g y en porcentaje de la concentración de cada muestra a T = 0:

TABLA 2

Tiempo	0	1 h	4 h	7 h	24 h
Polvo liofilizado	3,1.10 <sup>11</sup> (100%)	2,9.10 <sup>11</sup> (93%)	1,1.10 <sup>11</sup> (35%)	9.10 <sup>10</sup> (29%)	2,5.10 <sup>9</sup> (8%)
Partículas recubiertas	1,2.10 <sup>11</sup> (100%)	1,2.10 <sup>11</sup> (100%)	1,2.10 <sup>11</sup> (100%)	1,1.10 <sup>11</sup> (92%)	9.10 <sup>10</sup> (69%)

35

En presencia de leche en polvo a 30°C, la estabilidad de las bacterias en forma de partículas recubiertas según la presente invención mejora mucho en relación con la de las bacterias en forma de polvo liofilizado.

40

### Ejemplo 7

#### *Estabilidad gástrica*

45 Se estudió la estabilidad de las bacterias *Lactobacillus acidophilus* en condiciones que simulan el paso al estómago, según el siguiente protocolo:

50 Se preparan dos muestras, una a partir del polvo liofilizado como el usado en el ejemplo 1 y la otra a partir de partículas recubiertas según el mismo ejemplo 1. Para cada muestra, se introduce 1 gramo de polvo liofilizado o de partículas recubiertas en un matraz que contiene 100 ml de una solución de ácido clorhídrico 0,1 N (pH 1,2). El matraz se pone con agitación en un baño maría a 37°C durante 1 hora. Después la suspensión se centrifuga, y el sedimento se recoge en 100 ml de tampón de fosfato a pH 7,0. Se determina entonces la concentración residual de bacterias viables y se compara con la de un testigo en el que el ácido clorhídrico se ha sustituido por una solución tamponada a pH 7,0.

55 En estas condiciones, las bacterias *Lactobacillus acidophilus* en forma de polvo liofilizado son destruidas prácticamente por completo (supervivencia inferior a 0,01%), mientras que las mismas bacterias contenidas en las partículas recubiertas presentan una tasa de supervivencia de 15%.

60 Se estudió la estabilidad de las bacterias *Lactobacillus casei* según el mismo protocolo:

Las bacterias *Lactobacillus casei* contenidas en el polvo liofilizado como el usado en el ejemplo 2 son destruidas casi por completo por el ensayo gástrico (supervivencia inferior a 0,01%), mientras que las mismas bacterias contenidas en las partículas recubiertas según el mismo ejemplo 2 presentan una tasa de supervivencia en este mismo ensayo de 25%.

65

## ES 2 306 707 T3

### Ejemplo 8

#### *Estabilidad en la compresión*

5 Se prepararon comprimidos a base de microorganismos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pediococcus acidilactici*, secados por liofilización, como los descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 respectivamente, según el siguiente protocolo:

10 Para cada muestra microbiana, el polvo liofilizado se mezcla en una relación de 5% en peso en un excipiente compuesto de la siguiente forma:

- 49% de sorbitol (referencia Neosorb 60w, UPSA),
- 49% de lactosa (referencia Fast flow, Seppic)
- 15 - y 2% de estearato magnésico (UPSA).

20 Se introduce cada mezcla sucesivamente en un aparato de compresión de tipo alterno, modelo EKOD comercializado por Korsh. Las fuerzas de compresión ejercidas son 17500 N en el pistón superior y 16400 N en el pistón inferior.

25 Se determinan las concentraciones de células viables en cada mezcla antes de la compresión y después en los comprimidos. Los resultados expresados en porcentaje de supervivencia después de la compresión, se indican en la siguiente tabla 3:

TABLA 3

Especie	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Polvo no recubierto	44%	3%	2%	48%
35 Partículas recubiertas	98%	10%	16%	100%

40 La supervivencia después de compresión de las bacterias o levaduras contenidas en las partículas recubiertas mejora mucho en relación con los correspondientes polvos no recubiertos.

#### 45 **Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse posibles errores u omisiones y la OEP niega cualquier responsabilidad al respecto.

#### 50 **Documentos de patentes citados en la descripción**

- WO 9949846 A [0004]
- WO 9212224 A [0008]
- 55 • FR 9606215 [0005]
- US 4888171 A [0009]
- DE 3738599 [0007]

60

65

# ES 2 306 707 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de recubrimiento de microorganismos vivos deshidratados con una capa hidrófoba homogénea que comprende una sustancia elegida entre ácidos grasos, ceras o una mezcla de los mismos, **caracterizado** porque dicha sustancia hidrófoba se inyecta a una temperatura superior a su temperatura de fusión, estando comprendida dicha temperatura de inyección entre 30 y 120°C, en una cámara que contiene dichos microorganismos agitados por rotación de la base de dicha cámara y barrida por un flujo de aire a una temperatura comprendida entre 10 y 50°C, de modo que la temperatura de la cámara no supere en más de 5°C la temperatura de viabilidad de dichos microorganismos.
- 10 2. Procedimiento de recubrimiento de microorganismos vivos deshidratados según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la temperatura de inyección de dicha sustancia hidrófoba está comprendida entre 60 y 120°C.
- 15 3. Procedimiento de recubrimiento de microorganismos vivos deshidratados según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque dicha sustancia hidrófoba de recubrimiento tiene un punto de fusión comprendido entre 20 y 100°C.
- 20 4. Procedimiento de recubrimiento según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque dicha sustancia hidrófoba de recubrimiento tiene un punto de fusión comprendido entre 30 y 80°C.
- 25 5. Procedimiento de recubrimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque dichos microorganismos vivos deshidratados se eligen entre lactobacilos, bifidobacterias, estreptococos, enterococos, pediococos, levaduras o una mezcla de los mismos.
- 30 6. Procedimiento de recubrimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la proporción de dicha sustancia de recubrimiento inyectada está comprendida entre 10 y 99% en peso de partículas finales.
- 35 7. Procedimiento de recubrimiento según la reivindicación precedente, **caracterizado** porque la proporción de dicha sustancia de recubrimiento inyectada está comprendida entre 30 y 80% en peso de partículas finales.
- 40 8. Procedimiento de recubrimiento de microorganismos vivos deshidratados según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la velocidad de rotación de la base de dicha cámara está comprendida entre 50 y 500 rpm.
- 45 9. Procedimiento de recubrimiento de microorganismos vivos deshidratados según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el diámetro medio de las partículas obtenidas está comprendido entre 100 y 5000  $\mu\text{m}$ .
- 50 10. Aplicación de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, para preparar partículas destinadas a producir composiciones farmacéuticas, dietéticas o alimentarias.
- 55
- 60
- 65