

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 979**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2018 PCT/EP2018/050761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2018 WO18134135**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2018 E 18702616 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3571287**

54 Título: **Microorganismo desecado con excipiente**

30 Prioridad:

19.01.2017 US 201762448066 P
07.03.2017 EP 17159494

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2024

73 Titular/es:

INTERNATIONAL N&H DENMARK APS (100.0%)
Parallelvej 16
2800 Kongens Lyngby, DK

72 Inventor/es:

HOLLARD, CHRISTOPHE y
BABIN, GEOFFREY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 973 979 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

Microorganismo desecado con excipiente

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de microorganismos desecados.

10 **Antecedentes de la invención**

Es común secar microorganismos para el almacenamiento, por ejemplo mediante liofilización o pulverización. Tales microorganismos desecados se utilizan en usos industriales y alimentarios, por ejemplo en la fabricación de queso y yogur, y también como probióticos. Durante el almacenamiento, la viabilidad del organismo desecado se degrada en cierta medida, de modo que el recuento celular vivas disminuye con el tiempo. Esto es un problema particularmente en ambientes con humedad elevada.

Los probióticos son microorganismos vivos que son beneficiosos para la salud humana o animal cuando se administran en dosis apropiadas. Una forma de administrar probióticos es a través de la ingestión de probióticos desecados mezclados con excipientes y envasados en cápsulas o sobres. Desafortunadamente, las células probióticas desecadas no son muy estables durante el almacenamiento, con lo cual los recuentos de células vivas disminuyen con el tiempo, lo que hace que el tratamiento sea menos efectivo. Esto es particularmente cierto cuando los probióticos se mezclan con excipientes que tienen un contenido en humedad elevado, cuando las paredes del recipiente son permeables a la mezcla atmosférica externa y cuando el probiótico se almacena en un ambiente de humedad relativa elevada.

25 **Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una combinación de (a) microorganismo desecado y (b) una sal de fosfato en forma de polvo, en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$ y mezclas de las mismas, y en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una dosis microbiana unitaria que contiene una composición que comprende una mezcla de (a) microorganismo desecado y (b) una sal de fosfato en forma de polvo, en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$ y mezclas de las mismas, y en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición que comprende los siguientes pasos:

(i) disposición de (a) un microorganismo desecado y (b) una sal de fosfato en forma de polvo; y

(ii) mezclado del microorganismo desecado y la sal de fosfato en forma de polvo para proporcionar la composición

en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$ y mezclas de los mismos; y en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** muestra el % de supervivencia después de 3 meses de almacenamiento en condiciones de humedad ($a_w = 0,4$) a $30^\circ C$ para diferentes cepas bacterianas mezcladas con un excipiente según la invención (" K_2HPO_4 ") frente a excipiente convencional ("MCC") o sin excipiente ("probiótico liofilizado").

La **Figura 2** muestra el % de supervivencia después de 3 meses a $30^\circ C$ como una función de a_w ($a_w = 0,1$, $a_w = 0,2$ y $a_w = 0,3$), para *Lactobacillus acidophilus* liofilizado mezclado con excipiente según la invención (" K_2HPO_4 ") frente a excipiente convencional ("MCC").

La **Figura 3** muestra el % de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* como una función del porcentaje del excipiente K_2HPO_4 en una combinación bajo condiciones de humedad ($a_w 0,4$) a $30^\circ C$ durante 6 meses

La **Figura 4** muestra el % de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* como una función del porcentaje del excipiente K_2HPO_4 en una combinación con MCC bajo condiciones de humedad ($a_w 0,4$) a $30^\circ C$ durante 6 meses

La **Figura 5** muestra el impacto del pH del excipiente en el % de supervivencia de polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado bajo condiciones secas (a_w 0,1) a 30°C después de 1 mes y después de 3 meses. "KP" indica K_2HPO_4 con pH ajustado al pH indicado, "K2HPO4" indica K_2HPO_4 sin ajuste de pH y "MCC" indica celulosa microcristalina.

La **Figura 6** muestra el impacto del pH del excipiente en el % de supervivencia de polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado bajo condiciones de humedad (a_w 0,4) a 30°C después de 3 meses. "K2HPO4" indica K_2HPO_4 con pH ajustado al pH indicado, "MCC" indica celulosa microcristalina.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la supervivencia de microorganismos desecados mejora mediante el uso de una sal de fosfato como excipiente. El efecto es particularmente notable en ambientes de actividad de agua elevada (a_w). Se considera que una actividad de agua elevada es $a_w > 0,15$.

Normalmente, los polvos secos de microorganismo, en particular los probióticos, están mezclados con excipientes para estandarizar la concentración de microorganismos. Uno de los excipientes más utilizados, especialmente cuando el microorganismo se incorpora en cápsulas y sobres, es celulosa microcristalina (MCC). Los inventores han utilizado MCC como un excipiente de referencia. Los inventores descubrieron que el uso de sales de fosfato puede proporcionar una supervivencia mayor que 60 % del microorganismo desecado durante 3 meses, en comparación con casi 0 % de supervivencia en el excipiente MCC. Este efecto es particularmente notable en ambientes de actividad de agua elevada ($a_w > 0,15$, particularmente $a_w > 0,2$, más particularmente $a_w > 0,3$).

La actividad de agua se mide preferiblemente con un higrómetro de punto de rocío.

La tasa de supervivencia de microorganismo se expresó de dos manera diferentes.

A) Porcentaje de supervivencia

$$\% \text{ de supervivencia} = (\text{CFU tras almacenamiento} / \text{CFU } t_0) \times 100 \%$$

B) Pérdida logarítmica

$$\text{Log pérdida} = \text{Log} (\text{CFU } t_0) - \text{Log} (\text{CFU tras almacenamiento})$$

Microorganismo desecado

La composición de la presente invención contiene un microorganismo desecado. El microorganismo, en particular un probiótico, se puede secar por cualquier medio, sin embargo, se prefiere la liofilización y la pulverización, prefiriéndose particularmente la liofilización.

Se entiende que la expresión microorganismo abarca cualquier bacteria o levadura, o mezclas de estos, y en particular un probiótico.

El término probiótico incluye cualquier microorganismos vivo que se administre a un huésped con el fin de conferir un beneficio para la salud del huésped. En particular, puede ser una levadura o una bacteria, o mezclas de cualquiera de estas.

El microorganismo desecado, en particular un probiótico, se puede proporcionar en cualquier forma adecuada para suministro. Por ejemplo, el microorganismo desecado, en particular un probiótico, se puede proporcionar en forma de gránulos o polvo. En un aspecto, el microorganismo, en particular un probiótico, está en forma de polvo.

La composición de la presente invención puede contener una especie de microorganismo, en particular un probiótico, una cepa de microorganismo, en particular un probiótico, una mezcla de especies de microorganismo, en particular un probiótico, o una mezcla de cepas de microorganismo, en particular un probiótico. En un aspecto, la composición de la presente invención contiene una especie de microorganismo, en particular un probiótico y, opcionalmente, una cepa de microorganismo, en particular un probiótico. En un aspecto, la composición de la presente invención contiene una mezcla de cepas de microorganismo, en particular un probiótico. En un aspecto, la composición de la presente invención contiene una mezcla de especies de microorganismo, en particular probióticos.

En una realización preferida, el microorganismo, en particular un probiótico, se selecciona a partir de lactobacilos, bifidobacterias, saccharomyces y mezclas de los mismos.

En una realización preferida, el microorganismo, en particular un probiótico, se selecciona a partir de especies seleccionadas entre *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Lactobacillus acidophilus*,

Lactobacillus paracasei, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus reuteri protectis*, *Lactobacillus reuteri prodentis*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y mezclas de los mismos.

- 5 En otra realización preferida, el microorganismo, en particular un probiótico, se selecciona a partir de especies seleccionadas entre *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium lactis*, y mezclas de los mismos.

En un aspecto, el microorganismo, en particular un probiótico, se selecciona a partir de microorganismos de las cepas *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086, *Bifidobacterium longum subsp. infantis* 35624, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus paracasei* St11 (or NCC2461), *Lactobacillus johnsonii* La1 (= *Lactobacillus* LC1, *Lactobacillus johnsonii* NCC533), *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 (*Lactobacillus reuteri* SD2112), *Lactobacillus reuteri protectis* (DSM 17938, cepa hija de ATCC 55730), *Lactobacillus reuteri prodentis* (DSM 17938/ATCC 55730 y ATCC PTA 5289 en combinación), *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *Lactobacillus reuteri* RC-14, *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, *Lactobacillus paracasei* 8700:2 y mezclas de los mismos.

En un aspecto, el microorganismo, en particular un probiótico, se selecciona a partir de probióticos de las cepas *Lactobacillus acidophilus* (cepa NCFM), *Lactobacillus Casei* (cepa LPC37), *Bifidobacterium Lactis* (HN0019) y mezclas de los mismos.

El microorganismo, en particular un probiótico, puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para suministrar la cantidad requerida de microorganismo, en particular un probiótico. La 'concentración' de microorganismo, en particular un probiótico en unidades formadoras de colonias (CFU) de microorganismos por gramo de composición también puede ser seleccionada por un experto en la materia. En un aspecto, el microorganismo, en particular un probiótico, está presente en una cantidad de al menos 1×10^8 CFU por gramo de la composición. En un aspecto, el microorganismo, en particular un probiótico, está presente en una cantidad de al menos 1×10^9 CFU por gramo de la composición. En un aspecto, el microorganismo, en particular un probiótico, está presente en una cantidad de al menos 1×10^{10} CFU por gramo de la composición. En un aspecto, el microorganismo, en particular un probiótico, está presente en una cantidad de al menos 1×10^9 a 5×10^9 CFU por gramo de la composición.

Cuando se formula como una dosis unitaria de probiótico, la dosis contiene cualquier cantidad deseada de probiótico. Una dosis unitaria típica contiene 10^8 a 10^{14} CFU por dosis, más preferiblemente 10^9 a 10^{12} CFU por dosis, de modo particularmente preferible 10^9 a 10^{11} CFU.

El microorganismo, en particular un probiótico, está en forma desecada, preferiblemente pulverizada o liofilizada, en particular liofilizada. Preferiblemente, el microorganismo desecado, en particular un probiótico, tiene una actividad de agua no mayor que 0,4, más preferiblemente no mayor que 0,3, de modo particularmente preferible no mayor que 0,2. De modo más particularmente preferible, el microorganismo desecado, en particular un probiótico, tiene una actividad de agua no mayor que 0,1.

Sal de fosfato

La composición de la presente invención contiene una sal de fosfato; en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$ y mezclas de los mismos; y en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato. Una sal de fosfato es cualquier sal de ácido fosfórico (H_3PO_4) e incluye sales basadas en dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$), hidrogenofosfato ($HP0_4^{2-}$) y fosfato (PO_4^{3-}). En una realización preferida, la composición de la presente invención contiene una sal de hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) o una mezcla de hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) y dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$).

Se pueden utilizar sales de fosfato tanto hidratadas como anhidras.

El catión de la sal de fosfato se selecciona a partir de sodio, potasio y magnesio. Las sales de fosfato incluyen K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$. En una realización particularmente preferida, la sal de fosfato es una sal de fosfato potásico.

Preferiblemente, la sal de fosfato es fosfato dipotásico (K_2HPO_4) o una mezcla de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) y dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4).

En una realización preferida, la sal de fosfato tiene un pH ajustado entre pH 6 y pH 9, preferiblemente entre pH 6,5 y 8, de modo más particularmente preferible pH 6,8 a 7,2. Por la expresión "pH de la sal" se entiende el pH de una disolución cuando la sal se disuelve en agua. El pH se puede ajustar mediante el uso de combinaciones de dihidrogenofosfato, hidrogenofosfato y fosfato. En una realización preferida, se utiliza una combinación de sales de HPO_4^{2-} y $H_2PO_4^-$. Las cantidades relativas de estas sales para producir un pH deseado son bien conocidas. Por ejemplo, una relación molar de 61,5/38,5 $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ proporciona un pH de 7. Alternativamente, las sales con pH

ajustado se pueden preparar mediante titración de disoluciones de sales de PO_4^{3-} y/o HPO_4^{2-} con un ácido o una base al pH deseado y después mediante secado de la disolución resultante, por ejemplo mediante pulverización.

5 La sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato. La sal de fosfato está presente en la composición de la invención en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato, para proporcionar la estabilización deseada del microorganismo desecado, en particular un probiótico. En el presente contexto, los % en peso se dan con respecto al peso total de microorganismo, en particular probiótico y sal de fosfato. La sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 60 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 70 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 80 % en peso de la composición.

15 En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de 50 a 90 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de 50 a 80 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de 50 a 90 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de 60 a 90 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de 70 a 90 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de 80 a 90 % en peso de la composición. En el presente contexto, los % en peso se dan con respecto al peso total de microorganismo, en particular probiótico y sal de fosfato.

25 Cuando en la composición están presentes componentes diferentes al microorganismo, en particular un probiótico, y sales de fosfato, la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso de la composición total. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 59 % o 60 % en peso de la composición. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 70 % en peso de la composición total. En un aspecto, la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 80 % en peso de la composición total.

Una mezcla adecuada es 80 % en peso de sal de fosfato y 20 % en peso de microorganismo, en particular un probiótico.

30 La sal de fosfato está preferiblemente en forma de un polvo. Preferiblemente, la distribución de tamaño de partícula tiene un valor D10 en micrómetros de 5-120 (más preferiblemente 5-90), un valor D50 en micrómetros de 70-180 (más preferiblemente 80-140) y un valor D90 en micrómetros de 160-400 (más preferiblemente 180-350).

35 La tasa de supervivencia de microorganismo, en particular un probiótico, aumenta particularmente bajo actividad de agua elevada ($a_w > 0,15$, preferiblemente $a_w > 0,2$, más preferiblemente $a_w > 0,3$).

40 La composición de la invención aumenta preferiblemente la supervivencia de microorganismo, en particular un probiótico, en al menos 30 % en comparación con el microorganismo por separado, más preferiblemente en al menos 40 %, de modo particularmente preferible más de 60 %.

45 La composición de la invención aumenta preferiblemente la supervivencia de microorganismo, en particular un probiótico, bajo condiciones de humedad ($a_w > 0,15$, preferiblemente $> 0,2$, más preferiblemente $> 0,3$) en al menos 1 % a 30 % en comparación con el microorganismo por separado, más preferiblemente en al menos 20 %, de modo particularmente preferible más de 30 %.

La composición de la invención aumenta preferiblemente la supervivencia de probiótico en al menos 30 % en comparación con MCC como excipiente, más preferiblemente en al menos 40 %, de modo particularmente preferible más de 60 %.

50 La composición de la invención aumenta preferiblemente la supervivencia de probiótico bajo condiciones de humedad ($a_w > 0,15$, preferiblemente $> 0,2$, más preferiblemente $> 0,3$), en al menos 30 % en comparación con el probiótico con MCC como excipiente, más preferiblemente en al menos 40 %, de modo particularmente preferible más de 60 %.

Componentes adicionales

55 La composición de la presente invención puede contener solo probiótico y sal de fosfato o puede contener uno o más componentes adicionales.

60 En una realización, la composición comprende además excipientes adicionales como maltodextrina, celulosa microcristalina (MCC), prebióticos como inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, polidextrosa, adyuvantes de flujo como sílice, estearato de magnesio.

65 Cuando están presentes componentes adicionales, esto constituyen preferentemente menos de 20 % en peso de la composición total, más preferiblemente menos de 10 % en peso.

Uso

5 La composición de la invención puede utilizarse para administración a un humano o animal como probiótico o puede utilizarse para aplicaciones industriales o alimentarias. Las aplicaciones alimentarias típicas incluyen la producción de queso, yogur, productos de soja fermentados (como miso, natto, etc), col fermentada, productos alcohólicos comestibles, etc. Las aplicaciones industriales típicas incluyen la producción de materias primas o acabadas por fermentación, como la producción industrial de alcohol.

Formas

10 Las composiciones de la invención pueden estar en forma de una mezcla de polvo a granel, por ejemplo, para almacenamiento o transporte antes del uso alimentario o industrial o antes de la administración a un humano o animal y/o antes de la división en formas de dosificación adecuadas.

15 En otro aspecto, la invención proporciona una dosis microbiana unitaria para administración a un humano o animal. La dosis microbiana unitaria comprende una cantidad adecuada de la composición de la invención, que puede envasarse, por ejemplo en sobres, cápsulas o comprimidos. Una dosis unitaria típica contiene 10^8 a 10^{14} CFU por dosis, más preferiblemente 10^{10} a 10^{12} CFU por dosis.

Proceso

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona un proceso para la preparación de la composición de la invención que comprende (i) disposición de (a) un microorganismo desecado y (b) una sal de fosfato en forma de polvo; (ii) mezclado del microorganismo desecado y la sal de fosfato en forma de polvo para proporcionar la composición, en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$ y mezclas de las mismas, y en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato. En una realización preferida del proceso, el microorganismo está liofilizado.

30 El mezclado se puede realizar mediante cualquier método que no dañe el microorganismo. Por ejemplo, rotación o agitación en un recipiente adecuado y/o mezclado con una herramienta de mezclado, como una paleta.

EJEMPLOS

Materiales

35 Los experimentos se realizaron con los siguientes probióticos liofilizados: *Lactobacillus acidophilus* (cepa NCFM), *Lactobacillus casei* (cepa LPC37), *Bifidobacterium lactis* (BBi), *Bifidobacterium lactis* (BBL) y *Bifidobacterium lactis* (HN0019).

40 La celulosa microcristalina fue suministrada por Mingtai Chemical Company y el fosfato dipotásico se obtuvo de BK Glulhi GmbH Company.

Las cápsulas utilizadas eran Vcaps, tamaño 0, CS, hipromelosa de Capsugel cie.

45 La sílice era Sipernat 50s, obtenida de Evonik industries AG.

El estearato de magnesio se obtuvo de Aceto corporation.

50 La maltodextrina (IT6) se obtuvo de Roquette.

Métodos analíticos

Medición de la actividad de agua (a_w)

55 Para las mediciones de actividad de agua se utilizó un Aqualab 3TE, Decagon. La muestra (aproximadamente 1 g) se equilibra dentro del espacio de cabeza de una cámara sellada que contiene un espejo, un sensor óptico, un ventilador interno y un sensor de temperatura infrarrojo.

Método de recuento celular

60 El método de recuento celular utilizado es el método de laboratorio de control de calidad según la cepa. Los resultados se dieron en unidades formadoras de colonias por gramo de producto (CFU/g).

65 El método consistía en:

(i) se pesó 1 g de muestra en un frasco; se añadió agua de peptona estéril hasta 100 g y se mezcló la mezcla durante 5 minutos a 400 rpm con un agitador de mesa. Se dejó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se mezcló de nuevo durante 5 minutos para obtener una disolución homogénea. Se obtuvo una dilución 10-2 a partir de la muestra original.

(ii) Las disoluciones posteriores se llevaron a cabo en pasos 1:10 y se realizaron mediante adición de 1 ml de la disolución a 9 ml de agua de peptona. Las disoluciones se homogeneizaron en cada paso durante 20 segundos mediante un sistema Vortex a velocidad máxima.

(iii) Se utilizó agar MRS y 1 % de cisteína para colocar las células en placas.

(iv) Para cada determinación se contaron 4 placas: se sembraron dos volúmenes diferentes de suspensión celular y cada volumen se hizo por duplicado.

Después se sumó el número de colonias obtenidas en las placas y se dividió por la suma total de los volúmenes de suspensión celular utilizados para estas placas.

(vi) Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas.

Ejemplo 1

Preparación de muestras

Las diversas especies probióticas se mezclaron con MCC para obtener una CFU entre $1,5 \times 10^{10}$ y 3×10^{10} CFU/g. Las combinaciones se mezclaron mediante rotación (alrededor de 60 rpm en un frasco de plástico durante 20 min. Después se llenaron las cápsulas con las combinaciones. La preparación de las muestras se realizó en una sala estéril a 40 % de HR y 25 grados C.

Pruebas de exposición a humedad elevada

Se expuso maltodextrina a una atmósfera a 40 % de HR hasta alcanzar el equilibrio. Como consecuencia, la a_w de la maltodextrina era cercana a 0,4. Se utilizó el mismo método para obtener maltodextrina equilibrada a a_w 's de 0,3 y 0,1.

Se prepararon cápsulas y se llenaron con:

1. solo polvo de probiótico,
2. combinación de probiótico (20 % en peso)-MCC (80 % en peso) y
3. combinación de probiótico (20 % en peso)- K_2HPO_4 (80 % en peso).

Estas cápsulas se introdujeron en un frasco de vidrio. La maltodextrina a una a_w de aproximadamente 0,4 se añadió entonces en la parte superior y se agitó el frasco durante el periodo de tiempo deseado.

Las cápsulas se almacenaron en una cámara ambiental a 30°C durante 6 meses. Se midieron CFU y a_w a los 0 meses, 1 mes y 3 meses para evaluar el impacto del tipo de excipiente en el rendimiento de estabilidad.

Cálculo de supervivencia

La tasa de supervivencia de probiótico se expresó de dos manera diferentes.

A) Porcentaje de supervivencia

$$\% \text{ de supervivencia} = (\text{CFU tras almacenamiento} / \text{CFU } t_0) \times 100 \%$$

B) Pérdida logarítmica

$$\text{Log pérdida} = \text{Log (CFU } t_0) - \text{Log (CFU tras almacenamiento)}$$

Resultados

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de supervivencia de diferentes cepas de bacterias en condiciones de humedad (a_w 0,4) después de tres meses según el excipiente utilizado. MCC representa el caso en el que el probiótico se mezcló con MCC, K_2HPO_4 representa el caso en el que los probióticos se mezclaron con K_2HPO_4 , y "probiótico liofilizado" representa el caso en el que se utilizó solo el polvo probiótico.

Tabla 1. porcentaje de supervivencia de diferentes cepas bacterianas después de tres meses de almacenamiento en condiciones de humedad (a_w 0,4) y dependencia del excipiente

	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i> (BBI)	<i>Bifidobacterium lactis</i> (BBL)	<i>Bifidobacterium lactis</i> (HN019)
MCC	0%	0%	0%	1%	2%
K ₂ HPO ₄	35%	1%	5%	26%	20%
Probiótico liofilizado	0%	0%	0%	0%	0%

5 La Figura 1 muestra el mismo resultado en forma gráfica. MCC representa el caso en el que el probiótico se mezcló con MCC, K₂HPO₄ representa el caso en el que los probióticos se mezclaron con K₂HPO₄, y "probiótico liofilizado" representa el caso en el que se utilizó solo el polvo probiótico.

10 La Tabla 1 y la Figura 1 muestra que el impacto de K₂HPO₄ en la estabilidad varía como una función de la cepa. La supervivencia es siempre más elevada con K₂HPO₄ como excipiente que solo con MCC o probiótico. Está claro que el uso de K₂HPO₄ como excipiente mejora la estabilidad (supervivencia) de las cepas, y en particular en condiciones de humedad.

Supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* bajo diferentes condiciones de humedad

15 En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* después de tres meses a 30°C como una función de a_w y excipiente. MCC representa el caso en el que el probiótico se mezcló con MCC, K₂HPO₄ representa el caso en el que los probióticos se mezclaron con K₂HPO₄.

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* después de tres meses a 30°C y diferente a_w y dependencia del excipiente

a_w	0,1	0,3	0,4
MCC	78%	6%	0%
K ₂ HPO ₄	66%	39%	60%

20 La Figura 2 muestra el mismo resultado en forma gráfica. MCC representa el caso en el que el probiótico se mezcló con MCC, K₂HPO₄ representa el caso en el que los probióticos se mezclaron con K₂HPO₄.

25 La Tabla 2 y la Figura 2 muestran que el porcentaje de supervivencia con K₂HPO₄ es siempre mayor que el porcentaje de supervivencia con MCC en las condiciones de humedad más elevada ($a_w > 0,1$). En las condiciones de menor humedad ($a_w = 0,1$), las estabilidades con K₂HPO₄ y MCC son similares.

A partir de estos resultados se puede observar que la adición de K₂HPO₄ mejora la estabilidad de cepas en condiciones de humedad.

30 **Ejemplo 2**

35 Este ejemplo contempla la estabilidad de probióticos en un ambiente de humedad como una función de la concentración de K₂HPO₄. Se añadieron Sipernat 50s y estearato de magnesio como adyuvantes de flujo para tener una composición de muestra similar a la composición de una combinación comercial. Para este ejemplo se utilizó polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado. El ejemplo se preparó en dos pasos. En la parte 1 se mezcló el probiótico solo con K₂HPO₄. En la parte 2 se mezcló el probiótico con K₂HPO₄ y MCC.

Preparación de muestras

Parte 1: Probióticos mezclados con K₂HPO₄

40 Se prepararon combinaciones que consistían en polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado, K₂HPO₄, Sipernat 50s y estearato de magnesio. Se realizaron diez muestras en las que se aumentó gradualmente la concentración de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado y se disminuyó gradualmente la concentración de K₂HPO₄, manteniéndose constantes las concentraciones de Sipernat 50s y estearato de magnesio. La siguiente tabla muestra la descripción de las diferentes muestras de la parte 1.

Tabla 3: Descripción de diferentes muestras para el Ejemplo 2, parte 1

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
<i>Lactobacillus Acidophilus</i> (g)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	49,5
K ₂ HPO ₄ (g)	44,5	39,5	34,5	29,5	24,5	19,5	14,5	9,5	4,5	0
Sipernat 50s (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Estearato de magnesio (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Masa total (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Recuento celular de combinación (CFU/g)	3,5E10	7E10	1,05E11	1,4E11	1,75E11	2,1E11	2,45E11	2,8E11	3,15E11	3,47E11
% K ₂ HPO ₄ (WW)	89%	79%	69%	59%	49%	39%	29%	19%	9%	0%

Parte 2: Probióticos mezclados con K₂HPO₄ y MCC

Se prepararon combinaciones que consistían en polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado y K₂HPO₄, MCC, Sipernat 50s y estearato de magnesio. Se realizaron nueve muestras en las que se aumentó gradualmente la concentración de K₂HPO₄ y se disminuyó gradualmente la concentración de MCC, manteniéndose constantes las concentraciones de polvo de *Lactobacillus acidophilus*, Sipernat 50s y estearato de magnesio. La siguiente tabla muestra la descripción de las diferentes muestras de la parte 2.

Tabla 4: Descripción de diferentes muestras para el Ejemplo 2, parte 2

	Muestra 11	Muestra 12	Muestra 13	Muestra 14	Muestra 15	Muestra 16	Muestra 17	Muestra 18	Muestra 19
<i>Lactobacillus Acidophilus</i> (g)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
MCC (g)	42	37	32	27	22	17	12	7	0
K ₂ HPO ₄ (g)	0	5	10	15	20	25	30	35	42
Sipernat 50s (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Estearato de magnesio (g)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Masa total (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Recuento celular de combinación (CFU/g)	5,25E10	5,25E10	5,25E10	5,25E10	5,25E10	5,25E10	5,25E10	5,25E10	5,25E10
% K ₂ HPO ₄ (W/W)	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	84%

Resultados

Resultados de la parte 1

5 En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* como una función del porcentaje en peso del excipiente K₂HPO₄ bajo condiciones de humedad (a_w 0,4) después de seis meses a 30°C.

Tabla 5. Porcentaje de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* como una función del porcentaje del excipiente K₂HPO₄ bajo condiciones de humedad (a_w 0,4) después de seis meses a 30°C.

% en peso de K ₂ HPO ₄ en combinación	% de supervivencia
0%	0%
9%	0%
19%	0%
29%	0%
39%	0%
49%	0%
59%	2%
69%	9%
79%	17%
89%	12%

La Figura 3 muestra el mismo resultado en forma gráfica.

10 La Tabla 5 y la Figura 3 muestran que la supervivencia varía como una función de la cantidad de K₂HPO₄. Los resultados muestran que la supervivencia aumenta significativamente por encima de 50 % en peso de K₂HPO₄. Por encima de 80 % en peso de K₂HPO₄, la supervivencia es significativamente menor que sin K₂HPO₄, aunque menor que a 80 % en peso.

15 **Resultados de la parte 2**

20 En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* como una función del porcentaje del excipiente K₂HPO₄ en una combinación con MCC bajo condiciones de humedad (a_w 0,4) después de 6 meses a 30°C.

Tabla 6. Supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* como una función del pH del excipiente K₂HPO₄ en una combinación con MCC bajo condiciones de humedad (a_w 0,4) a 30°C durante 6 meses

% K ₂ HPO ₄ en combinación	% de supervivencia
0%	0,0%
0%	0,0%
10%	0,0%
20%	0,0%
30%	0,0%
40%	0,2%
50%	0,8%
60%	3,2%
70%	15,3%
84%	20,4%

La Figura 4 muestra el mismo resultado en forma gráfica.

25 La Tabla 6 y la Figura 4 muestran que la supervivencia varía como una función del porcentaje de K₂HPO₄ y por encima de 40 % en peso de K₂HPO₄ es significativamente mejor que sin K₂HPO₄.

Ejemplo 3

Se evaluó el efecto del pH del excipiente K_2HPO_4 en *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*

5 Se elaboraron diferentes excipientes que comprendían K_2HPO_4 con diversos valores de pH (pH 6,5; pH 6,9; pH 7,1; pH 7,6 pH 8,1 y pH 9). Los excipientes a diferentes pH se prepararon mediante cualquiera de estos dos métodos:

1. Se preparó una disolución de K_2HPO_4 y se añadió ácido fosfórico para llevar el pH de la disolución al valor deseado y después se pulverizó la disolución para producir un polvo; o
2. Se mezcló K_2HPO_4 en forma seca con diversas cantidades de KH_2PO_4 calculadas para dar el pH deseado.

Preparación de muestras

15 Parte 1: Impacto del pH del excipiente en la supervivencia bajo condiciones secas:

Se mezcló polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado con los diferentes excipientes a diversos pH. La composición de cada combinación era 80 % de polvo de excipiente K_2HPO_4 y 20 % de polvo probiótico liofilizado. Las combinaciones se mezclaron mediante rotación (alrededor de 60 rpm en frascos de plástico durante 20 min. Después se llenaron los sobres con las combinaciones. La preparación de las muestras se realizó en una sala estéril a 40 % de HR y 25°C. Durante las pruebas, los sobres se almacenaron a 30°C en humedad seca ($a_w \leq 0,1$) durante 3 meses.

Parte 2: Impacto del pH del excipiente en la supervivencia bajo condiciones de humedad:

25 Se mezcló polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado con los diferentes polvos de K_2HPO_4 a diferentes pH y MCC. La composición de cada combinación era 80 % de excipiente y 20 % de polvo probiótico liofilizado. Las combinaciones se mezclaron mediante rotación (alrededor de 60 rpm en frascos de plástico durante 20 min. La preparación de las muestras se realizó en una sala estéril a 40 % de HR y 25°C. Las cápsulas se llenaron con las mezclas y se introdujeron las cápsulas en un frasco de vidrio. La maltodextrina a una a_w de aproximadamente 0,4 se añadió entonces en la parte superior y se agitó el frasco. Los frascos se almacenaron a 30°C durante 3 meses.

De la misma manera se preparó y se probó un control con 80 % de MCC seca y 20 % de polvo probiótico liofilizado.

Resultados

35 Resultados de la parte 1

En la Tabla 7 se muestra la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado como una función del pH del excipiente K_2HPO_4 tras almacenamiento bajo condiciones secas ($a_w \leq 0,1$) a 30°C durante uno y tres meses

40

Excipiente	% supervivencia después de 1 mes	% supervivencia después de 3 meses
K_2HPO_4 pH 6,5	63%	59%
K_2HPO_4 pH 6,9	87%	88%
K_2HPO_4 pH 7,1	73%	63%
K_2HPO_4 pH 7,6	68%	49%
K_2HPO_4 pH 8,1	71%	68%
$K_2 HPO_4$ (pH no ajustado)	58%	59%
MCC	50%	12%

La Figura 5 muestra el mismo resultado en forma gráfica.

45 La Tabla 7 y la Figura 5 muestran que la supervivencia/estabilidad bajo condiciones secas varía como una función del pH, pero en todos los casos es mejor que la supervivencia con MCC como único excipiente. La estabilidad se vio afectada por el pH del excipiente. Para la estabilidad bajo condiciones secas, el pH óptimo de K_2HPO_4 está entre 6,9 y 7,1. Otras especies evaluadas incluían *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus casei*.

50

Resultados de la parte 2

En la Tabla 8 se muestra la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado como una función del pH del excipiente K_2HPO_4 tras almacenamiento bajo condiciones de humedad ($a_w = 0,4$) a 30°C durante tres meses

Excipiente	% de supervivencia
K_2HPO_4 pH 6,5	37%
K_2HPO_4 pH 6,9	50%
K_2HPO_4 pH 7,1	13%
K_2HPO_4 pH 7,6	14%
K_2HPO_4 pH 8,1	26%
K_2HPO_4 pH 9	41%
MCC	1%

5

La Figura 6 muestra el mismo resultado en forma gráfica.

La Tabla 8 y la Figura 6 muestran que la estabilidad varía como función del valor de pH. Todos los excipientes con pH ajustado tienen una mayor estabilidad que el polvo de MCC bajo condiciones de humedad. Para obtener la mejor estabilidad bajo condiciones de humedad, el pH óptimo es 6,9.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una combinación de (a) microorganismo desecado y (b) una sal de fosfato en forma de polvo, en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$ y mezclas de las mismas, y en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 y mezclas de los mismos.
- 15 3. La composición según la reivindicación 1, en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y mezclas de los mismos.
- 20 4. La composición según la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la sal de fosfato es una mezcla de sales de HPO_4^{2-} y $H_2PO_4^-$.
- 25 5. La composición según cualquier reivindicación precedentes, en donde la sal de fosfato tiene un pH ajustado entre pH 6 y 9.
- 30 6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sal de fosfato tiene un pH ajustado entre 6,8-7,2.
- 35 7. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 60 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato.
- 40 8. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 80 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato.
- 45 9. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el microorganismo está liofilizado.
- 50 10. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el microorganismo es un probiótico.
- 55 11. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el microorganismo se selecciona a partir de lactobacilos, bifidobacterias, saccharomyces y mezclas de los mismos.
- 60 12. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el microorganismo se selecciona a partir de *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus reuteri protectis*, *Lactobacillus reuteri prodentis*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y mezclas de los mismos.
13. La composición de cualquier reivindicación precedente, en donde el microorganismo es un *Lactobacillus acidophilus*.
14. Una dosis microbiana unitaria que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. La dosis microbiana unitaria de la reivindicación 14 en forma de una cápsula que contiene la composición.
16. La dosis microbiana unitaria de la reivindicación 14 en forma de un sobre que contiene la composición.
17. La dosis microbiana unitaria de la reivindicación 14 en forma de un comprimido.
18. La dosis microbiana unitaria de la reivindicación 14 en forma de una fórmula nutricional en polvo.
19. Un proceso para la preparación de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende los pasos de:
 - (i) disposición de (a) un microorganismo desecado y (b) una sal de fosfato en forma de polvo; y
 - (ii) mezclado del microorganismo desecado y la sal de fosfato en forma de polvo para proporcionar la composición, en donde la sal de fosfato se selecciona a partir de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $MgHPO_4$, $Mg[H_2PO_4]_2$ y mezclas de los mismos; y en donde la sal de fosfato está presente en una cantidad de al menos 50 % en peso, basado en el peso total de microorganismo y sal de fosfato.

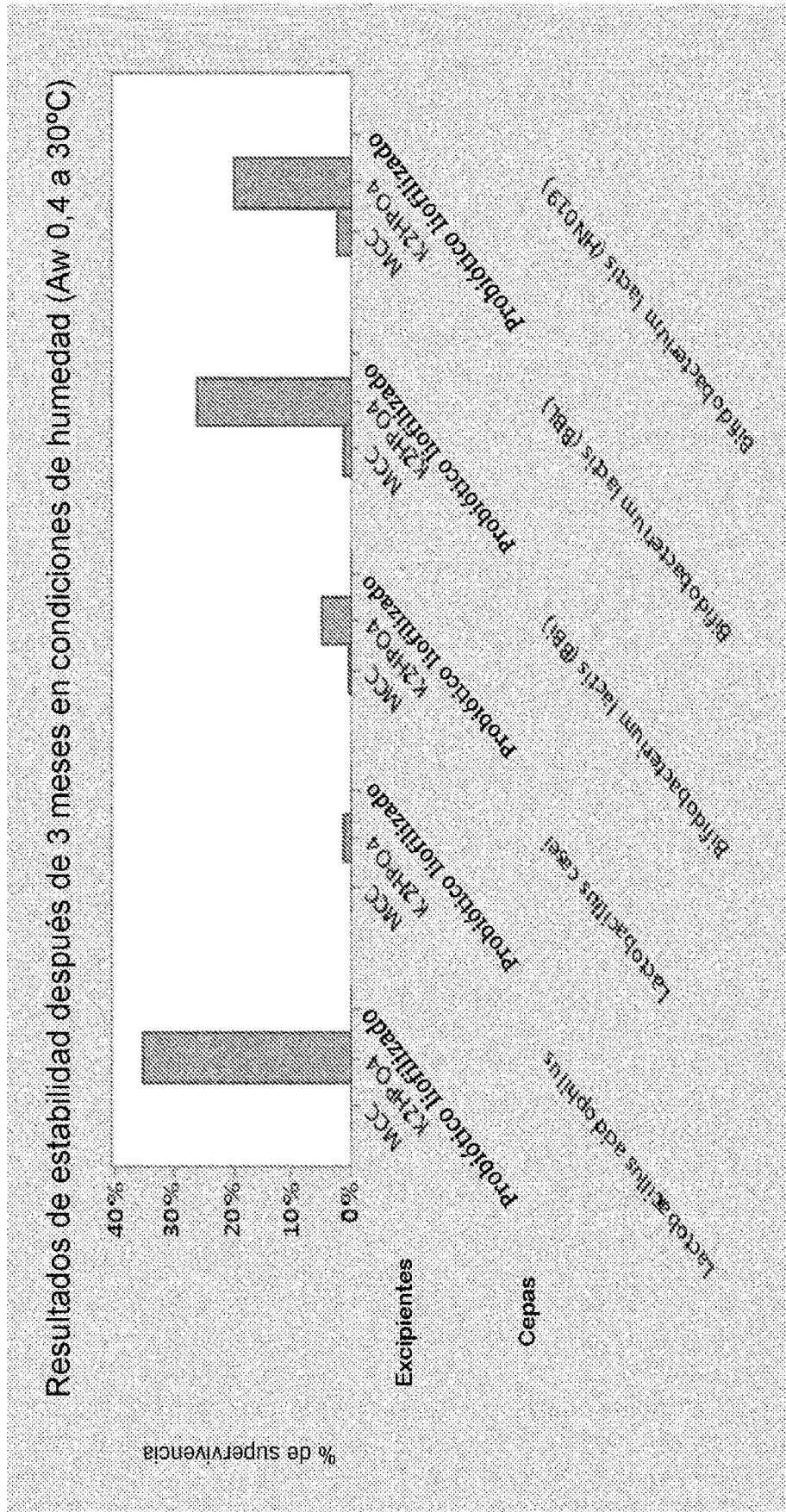


Fig. 1.

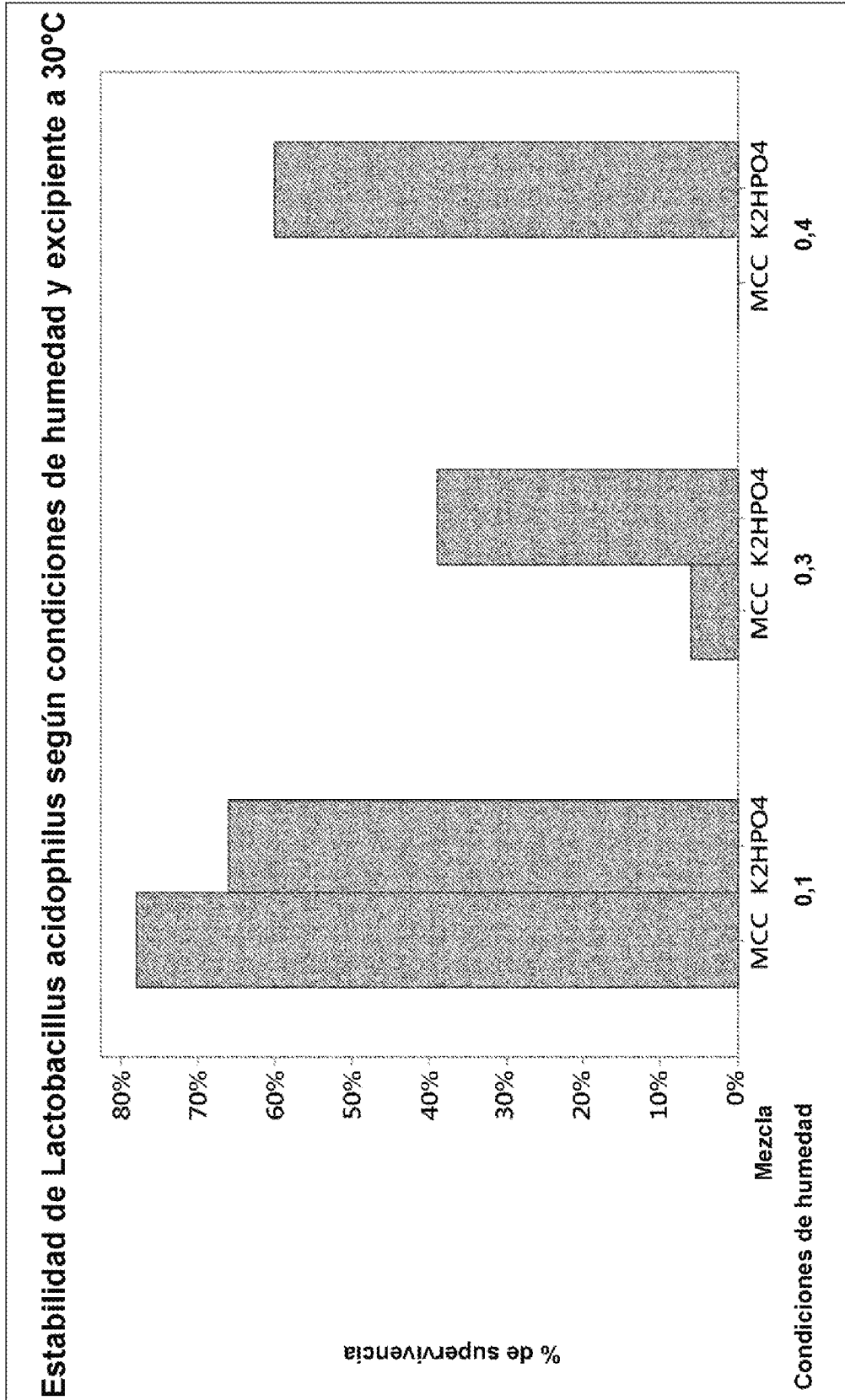


Fig. 2.

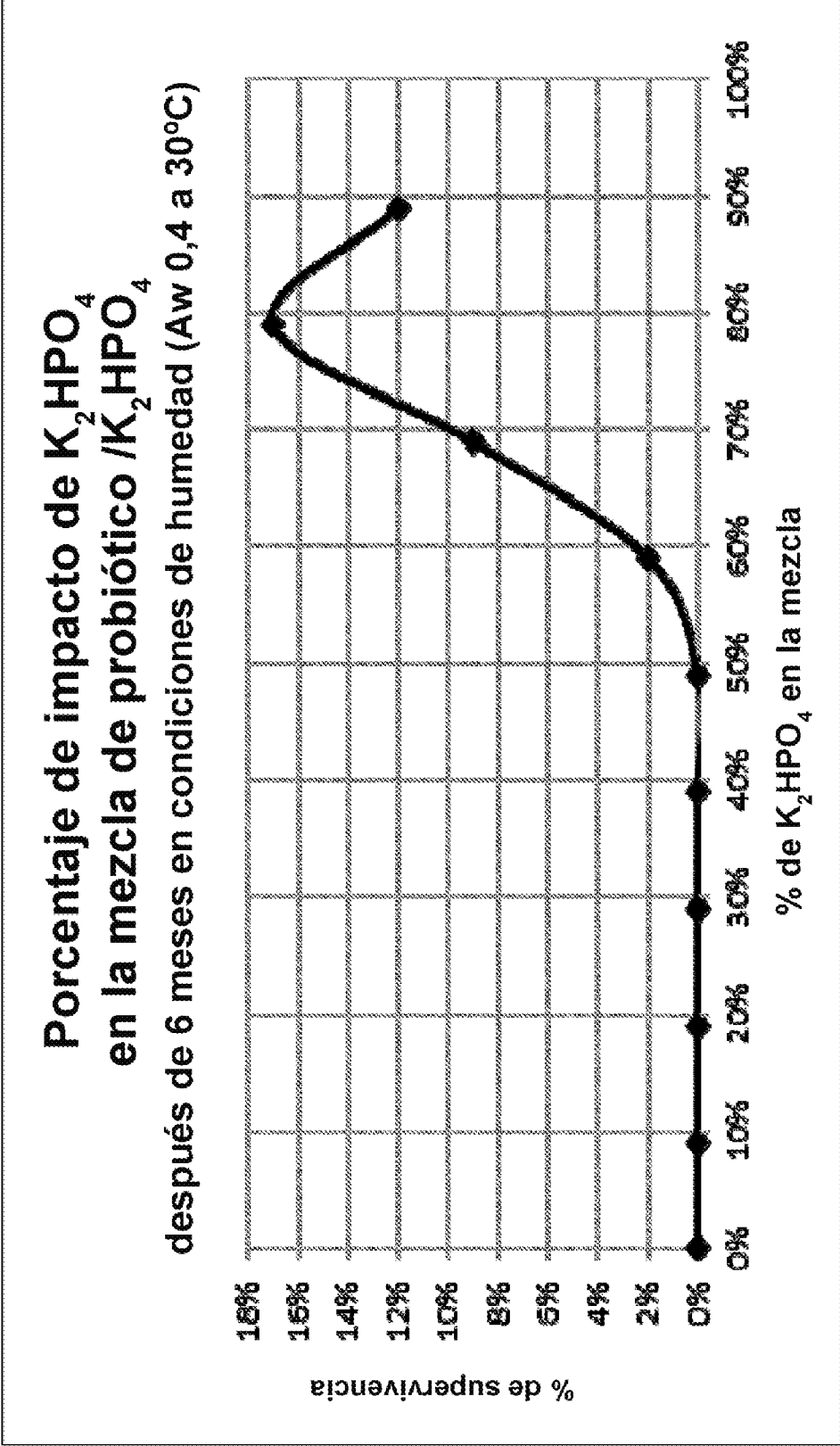


Fig. 3.

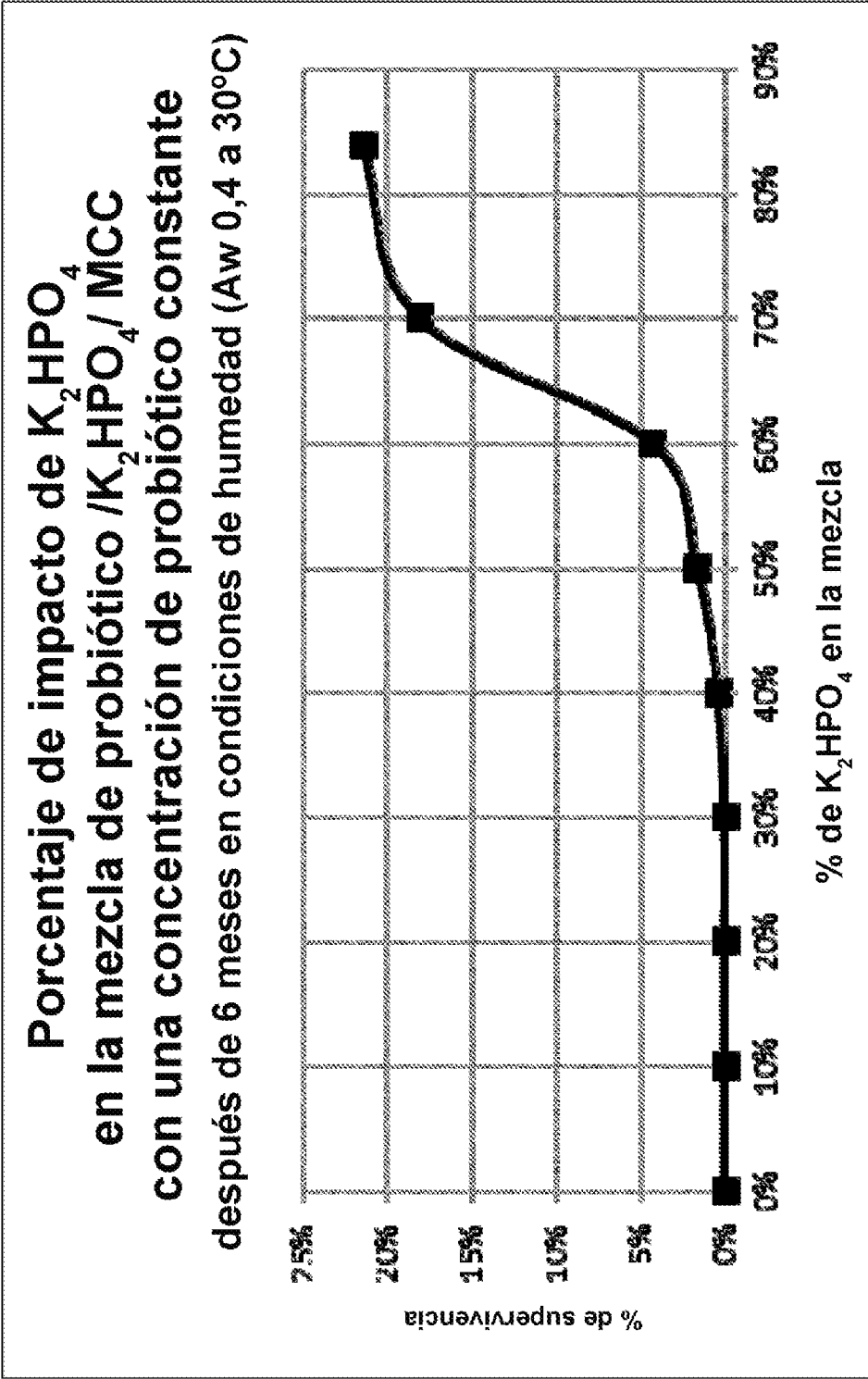


Fig. 4.

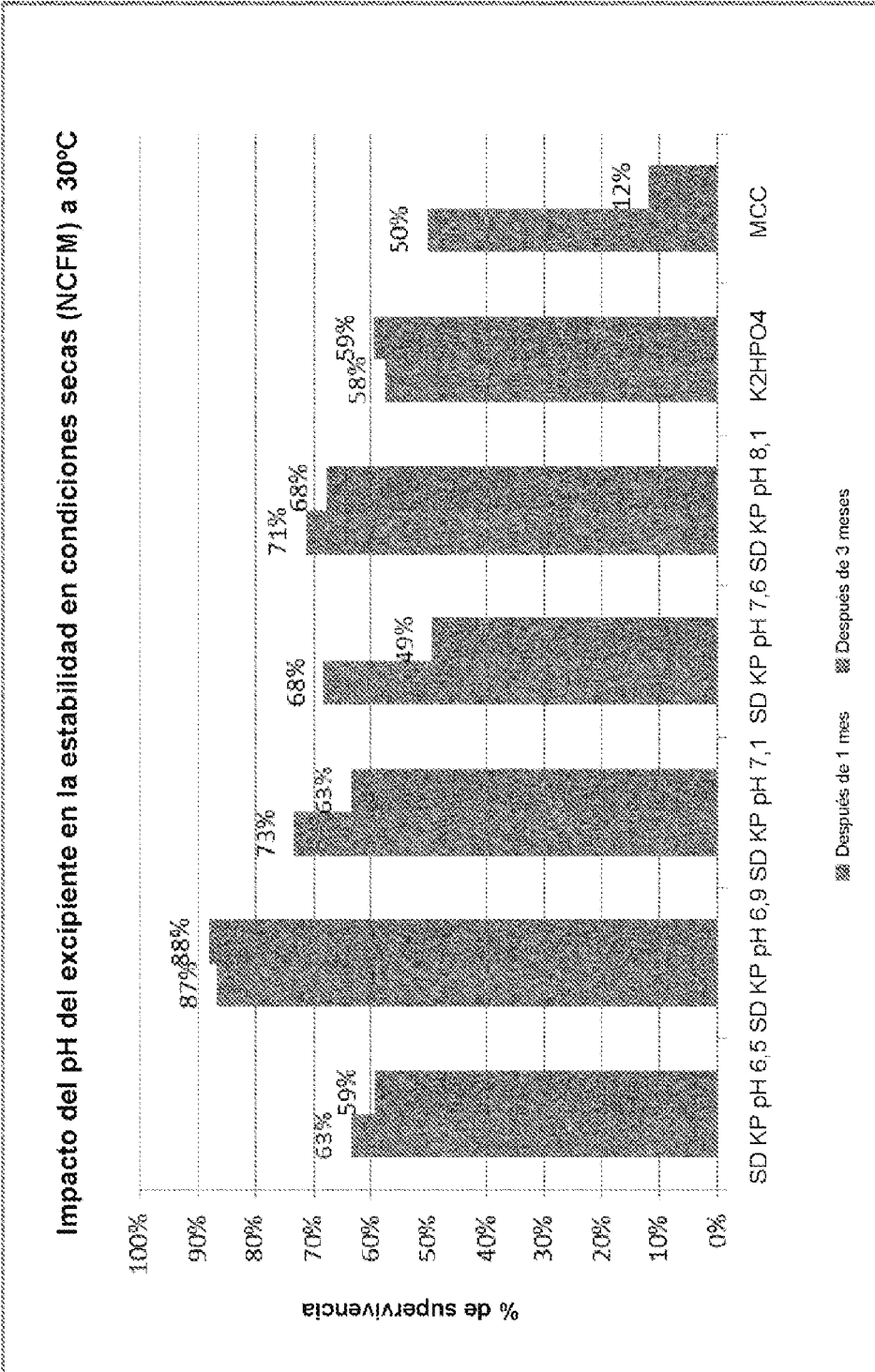


Fig. 5.

Impacto del pH del excipiente en la estabilidad de polvo de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado en condiciones de humedad (Aw 0.4) a 30°C después de 3 meses

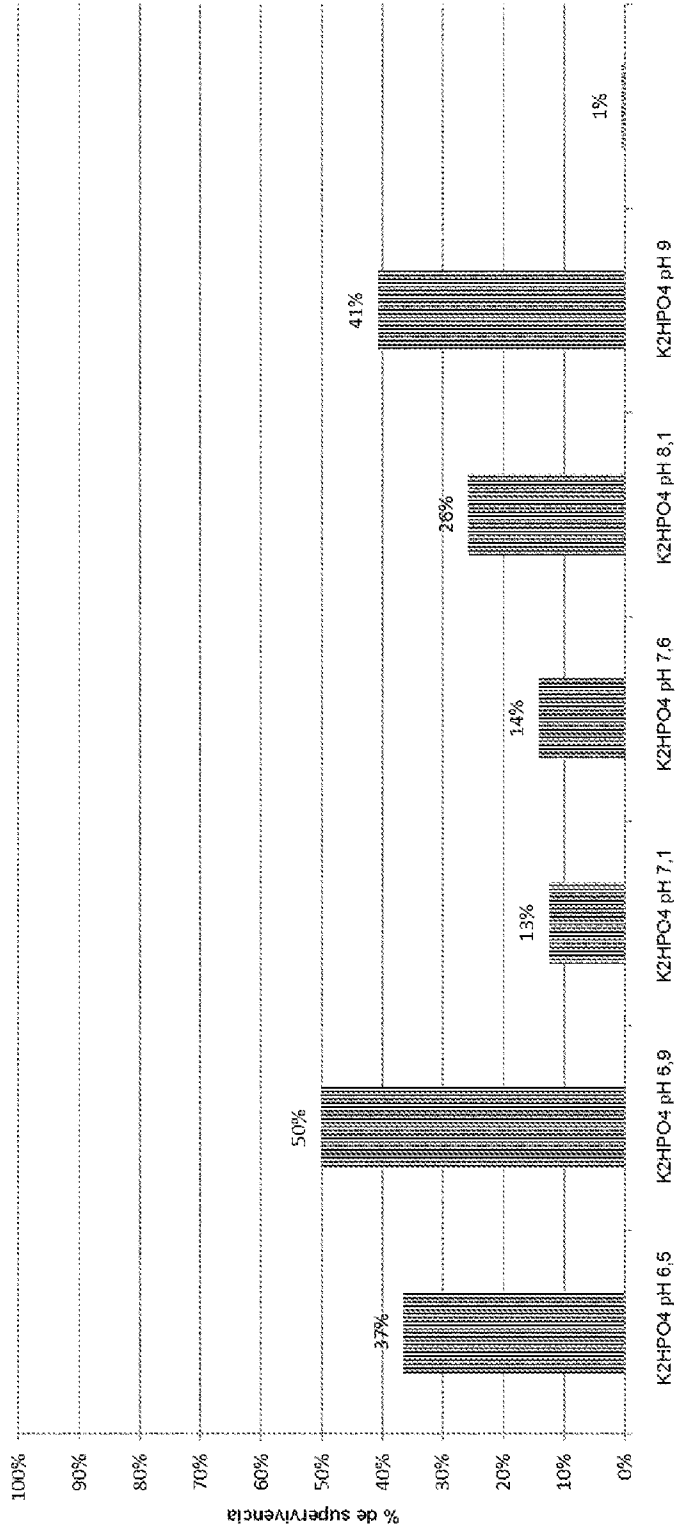


Fig. 6.