



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 016 483**

⑮ Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2013 PCT/US2013/033505**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13142792**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2013 E 13764138 (7)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025 EP 2827905**

④ Título: Composición estabilizadora para materiales bioactivos

⑩ Prioridad:

**23.03.2012 US 201261614994 P
03.05.2012 US 201261642094 P
13.05.2012 US 201261646337 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2025

⑦ Titular/es:

**ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION
(100.00%)
7155 Columbia Gateway Drive, Suite H
Columbia, MD 21046, US**

⑦ Inventor/es:

**HAREL, MOTI;
TANG, QIONG;
RICE, TRISHA;
JENNINGS, KIMBERLY;
CARPENTER, BRIAN;
DREWES, ROGER y
RADITSIS, ELIZABETH**

⑦ Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

ES 3 016 483 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

Composición estabilizadora para materiales bioactivos

5 Antecedentes de la invención

La conservación de la estructura y función de los materiales biológicos durante el almacenamiento a largo plazo a alta temperatura y humedad es de fundamental importancia para las industrias alimentaria, nutracéutica y farmacéutica. Los materiales biológicos sensibles, tales como proteínas, enzimas, células, bacterias y virus, a menudo deben preservarse para su almacenamiento a largo plazo para su uso posterior. Aunque se han probado muchos métodos para estabilizar materiales biológicos en almacenamiento, muchos no son adecuados para bioactivos sensibles, tales como bacterias y virus vivos o atenuados. Por ejemplo, el secado por liofilización tradicional combina las tensiones debidas tanto al congelamiento como al secado. La etapa de congelación de este proceso puede tener efectos no deseados, tales como la desnaturalización de proteínas y enzimas, y la ruptura de células.

10 Existe la necesidad de una composición estabilizadora que sea útil para una amplia gama de materiales biológicos y que proporcione una estabilización y conservación superiores de los materiales biológicos durante períodos prolongados de tiempo a temperaturas elevadas y grados variables de humedad, tales como pueden encontrarse durante el envío y almacenamiento de materiales, mientras que aún retiene una cantidad significativa de actividad tras la rehidratación. También existe la necesidad de composiciones estabilizadoras que puedan usarse en aplicaciones de compresión de tabletas sin pérdida excesiva de la actividad de los materiales biológicos, muchos de los cuales son sensibles a las altas presiones y temperaturas que se encuentran durante la compresión de tabletas.

15 El documento US 2012/0039956 A1 describe composiciones y métodos de secado para preservar materiales bioactivos sensibles, tales como péptidos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticuerpos, fármacos, vacunas, levaduras, bacterias (probióticas o de otro tipo), virus y/o suspensiones celulares, en almacenamiento. Las composiciones incluyen un componente carbohidratos y un componente de potenciador de vidrio, en donde el componente carbohidratos incluye una mezcla de di-, oligo- y polisacáridos y el potenciador de vidrio incluye iones de ácido orgánico e hidrolizados de proteínas. La composición se prepara mediante la dispersión de todos los componentes sólidos en una solución y después se congela instantáneamente para formar pequeñas perlas, cuerdas o gotas. El método de secado preferido de las perlas, cuerdas o gotas congeladas se inicia mediante una etapa corta de purga y estabilización de la estructura de las partículas congeladas a una presión de vacío de menos de 266,6 Pa (2000 ml o 2000 ml) seguido de una etapa de secado primario a una presión de vacío de más de 266,6 Pa (2000 mTorr) y a una temperatura deseada. Durante la etapa de secado secundaria y final del material se aplica una presión de vacío completa y una temperatura elevada para lograr una actividad del agua final conveniente del material seco.

35 Resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una composición estabilizadora seca para un material bioactivo, de acuerdo con la reivindicación 1. La composición puede combinarse con un material bioactivo.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un producto que comprende un material bioactivo estabilizado, de acuerdo con la reivindicación 9.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un producto que puede obtenerse mediante el método de la invención, de acuerdo con la reivindicación 14.

En otro aspecto, la invención proporciona un producto de acuerdo con la reivindicación 15.

50 En la presente descripción se describe un comprimido, pastilla o gránulo fabricado mediante la compactación de un material bioactivo sensible integrado en una composición seca vítreo y amorfa que incluye uno o más azúcares y una o más proteínas hidrolizadas, en donde los azúcares incluyen entre aproximadamente 10 % y 60 % y las proteínas hidrolizadas incluyen entre aproximadamente 1 % y 40 % en base al peso en seco total de la composición.

55 Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la estabilidad de la aceleración de las bacterias probióticas disponibles comercialmente y las bacterias probióticas en una composición seca.

60 La Figura 2 muestra el efecto de varias relaciones molares entre los potenciadores de vidrio y la mezcla de carbohidratos en la composición sobre la estabilidad probiótica (*L. paracasei*) bajo condiciones de almacenamiento acelerado (37 °C y 33 % de HR).

65 La Figura 3 muestra el efecto de la composición de la presente invención sobre la estabilidad en almacenamiento de las bacterias probióticas *L. acidophilus*. La estabilidad de las bacterias probióticas secas se probó en condiciones de almacenamiento acelerado de 24 °C y 33 % de HR durante 537 días.

La Figura 4 muestra el efecto de varios compuestos potenciadores de vidrio sobre la estabilidad en almacenamiento de las bacterias probióticas *L. acidophilus*. La estabilidad de las bacterias probióticas secas se probó en condiciones de almacenamiento acelerado de 24 °C y 43 % de HR durante 180 días.

5 La Figura 5 muestra el efecto de varias relaciones de hidrolizado de proteínas/azúcar sobre la estabilidad en almacenamiento (35 °C y 43 % de HR) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis*.

10 La Figura 6 muestra la optimización del pH para la estabilidad máxima del probiótico *L. rhamnosus* (condiciones de almacenamiento de aceleración a 40 °C y 33 % de HR durante 8 semanas).

15 Figuras 7 y 8. Observaciones visuales y microscópicas de diferentes composiciones secas que contienen varias matrices y agentes formadores de vidrio como perlas sólidas congeladas.

20 Figura 9. El efecto de *L. rhamnosus* como cultivos frescos, congelados o en polvo secos en sus recuentos iniciales de UFC en una composición seca.

25 Figura 10. El efecto de la temperatura de congelación de una composición que contiene *L. rhamnosus* como perlas sólidas congeladas en nitrógeno líquido o congelador profundo a -80 °C y como suspensión viscosa no congelada a +4 °C en el recuento inicial de UFC bacterianas en la composición seca. Los resultados muestran solo el efecto de la temperatura de congelación de la suspensión sin etapa adicional de purga antes del secado.

30 Figura 11. El efecto de la temperatura de congelación de una composición que contiene *Bifidobacterium animalis* como perlas sólidas congeladas en nitrógeno líquido y como suspensión viscosa no congelada a +4 °C en el recuento inicial de UFC bacterianas en la composición seca. Los resultados muestran solo el efecto de la temperatura de congelación de la suspensión sin etapa adicional de purga antes del secado.

35 Figura 12. El efecto de la duración del purgado al vacío de las perlas sólidas congeladas sobre los recuentos iniciales de UFC de *L. rhamnosus* en una composición seca.

40 Figura 13. Perfil de secado de una composición en un liofilizador.

45 Figura 14. Pérdidas por secado y proceso de *L. rhamnosus* en composiciones y métodos de secado.

50 Figura 15. Tendencias de estabilidad de las bacterias probióticas secas, *L. rhamnosus* composición en almacenamiento a 40 °C y 33 % de humedad relativa.

55 Figura 16. Estabilidad en almacenamiento en estante a 40 °C y 43 % de HR de *L. acidophilus* sp. o después de formular en una composición.

60 Figura 17. La estabilidad en almacenamiento en estantería a 40 °C y 43 % de HR y 30 °C y 60 % de HR se liofiliza comúnmente *L. rhamnosus* sp. o después de formular en una composición.

65 La Figura 18 demuestra el efecto de la compresión en la prensa de comprimidos sobre la viabilidad y la estabilidad en almacenamiento a 40 °C y 43 % de HR del probiótico *L. rhamnosus* estabilizado y protegido en una composición.

70 La Figura 19 muestra el efecto de la formación de comprimidos con una mezcla de multivitaminas y minerales y la exposición al almacenamiento a 40 °C y 43 % de HR sobre la viabilidad del probiótico *L. rhamnosus* estabilizado y protegido en una composición.

75 La Figura 20 ilustra el efecto de la compresión en la prensa de comprimidos sobre la actividad de las enzimas proteasa y lipasa en una forma libre o protegida en una composición. Las enzimas se comprimieron individualmente o se mezclaron en cantidades iguales y después se comprimieron.

55 Descripción detallada de la invención

55 Definiciones

Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una proteína" incluye la proteína singular o una combinación de dos o más proteínas; la referencia a "enzima", "bacteria", etc., incluye singular o mezclas de varios tipos, y similares.

En la descripción y reivindicación de la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se exponen a continuación.

"Ingrediente bioactivo", "material bioactivo" y "material biológico" se refieren a microorganismos o ingredientes que permiten la actividad biológica. Los materiales bioactivos adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a péptidos, proteínas, enzimas, hormonas, ácidos nucleicos, anticuerpos, fármacos, vacunas, levadura, hongos, bacterias (probióticas o de otro tipo), microbios del suelo, virus y/o suspensiones celulares.

5 "Composición biológica" se refiere a preparaciones, que tienen una forma tal que permite que la actividad biológica de los ingredientes o agentes bioactivos sea inequívocamente eficaz.

10 El "mejorador de vidrio", el "compuesto mejorador de vidrio" y el "agente formador de vidrio" se usan indistintamente en la presente descripción para denotar un compuesto químico con la capacidad de formar una estructura amorfa o vítreo por debajo de una temperatura crítica, la temperatura de transición vítreo (Tg). Durante la formación de la estructura vítreo, las sustancias biológicas pueden quedar incrustadas dentro de la estructura vítreo. Los potenciadores de vidrio adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glutámico y similares. Las sales pueden incluir cationes tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato y similares. Otros potenciadores de vidrio útiles incluyen proteínas, hidrolizados de proteínas, polipéptidos y aminoácidos. También se contempla una combinación de agentes formadores de vidrio dentro de una sola composición. El proceso usado para obtener una estructura vítreo con los propósitos de esta invención es generalmente una técnica de sublimación y/o evaporación de solvente. Idealmente, los compuestos que son compuestos GRAS se prefieren a los que no son GRAS.

20 Los "azúcares" se refieren a sacáridos compuestos predominantemente de carbono, hidrógeno y oxígeno. Los sacáridos útiles incluyen azúcares reductores y no reductores y alcoholes de azúcar y disacáridos. Dos monosacáridos unidos entre sí forman un disacárido. Los dos monosacáridos usados para formar un disacárido pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos de disacáridos que pueden usarse en la composición de la presente invención incluyen sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, isomaltosa. También pueden usarse disacáridos sulfatados.

25 "Carbohidratos" o "compuesto polihidroxilado" se refiere a azúcares compuestos predominantemente de carbono, hidrógeno y oxígeno. Un sacárido compuesto típicamente de una cadena principal de azúcar de unidades estructurales repetidas unidas de forma lineal o no lineal, algunas de las cuales contienen grupos químicos cargados positiva o negativamente. Las unidades repetitivas pueden variar de dos a varios millones. Los sacáridos útiles incluyen azúcares reductores y no reductores y alcoholes de azúcar, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos solubles en agua y derivados de estos. Dos monosacáridos unidos entre sí forman un disacárido. Los dos monosacáridos usados para formar un disacárido pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos de disacáridos que pueden usarse en la mezcla de carbohidratos de la presente invención incluyen sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, isomaltosa. También pueden usarse disacáridos sulfatados. Un pequeño número de monosacáridos unidos entre sí (típicamente de tres a veinte) forman un oligosacárido. Los monosacáridos usados para formar un oligosacárido pueden ser los mismos o diferentes azúcares componentes. Los ejemplos de oligosacáridos adecuados para su uso incluyen inulina, maltodextrinas, dextranos, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), mananoooligosacáridos (MOS) y sus combinaciones. Un gran número de monosacáridos unidos entre sí (típicamente más de veinte) forman un polisacárido. Los monosacáridos usados para formar un polisacárido pueden ser los mismos o diferentes azúcares de componentes. Los ejemplos de polisacáridos adecuados para su uso incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa y hipromelosa; almidones solubles o fracciones de almidón, goma xantana, goma guar, pectinas, carragenano, galactomanano, goma gellan, que incluyen cualquier derivado de estos, ftalato de acetato de celulosa (CAP), carboximetilcelulosa, alginato de sodio, sales de ácido algínico, hidroxipropilmétilecelulosa (HPMC), goma acacia, goma garrofín, quitosano ácido poliglicólico y almidones y almidones modificados. La composición de la invención comprende, como un oligosacárido, ciclodextrina.

30 50 "Proteína hidrolizada" se refiere a una proteína que se ha sometido a una hidrólisis ácida o enzimática parcial o completa para producir una proteína hidrolizada que tiene preferentemente un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa. En algunas modalidades, denominadas en la presente descripción "proteína extensamente hidrolizada", al menos el 20 % del sustrato proteico se convierte en péptidos que tienen masas moleculares de 200 a 2000 dalton. La proteína hidrolizada tiene aproximadamente la misma composición de aminoácidos que la proteína completa y puede obtenerse de cualquier número de fuentes comerciales. Al ser hipoalergénica, la proteína hidrolizada puede usarse ventajosamente en ciertos alimentos para consumidores hipersensibles, tales como lactantes y ancianos.

35 55 Una formulación o composición "estable" es aquella en la que el material biológicamente activo en la misma retiene esencialmente su estabilidad física, estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. La estabilidad puede medirse a una temperatura y condiciones de humedad seleccionadas durante un período de tiempo seleccionado. El análisis de tendencias puede usarse para estimar la vida útil esperada antes de que un material haya estado realmente en almacenamiento durante ese período de tiempo. Para las bacterias vivas, por ejemplo, la estabilidad se define como el tiempo que tarda en perder 1 log de UFC/g de formulación seca en condiciones predefinidas de temperatura, humedad y período de tiempo.

La "viabilidad" con respecto a las bacterias, se refiere a la capacidad de formar una colonia (UFC o unidad formadora de colonias) en un medio de nutrientes apropiado para el crecimiento de las bacterias. La viabilidad, con respecto a los virus, se refiere a la capacidad de infectar y reproducirse en una célula huésped adecuada, lo que da como resultado la formación de una placa en un césped de células huésped.

5 Las temperaturas o condiciones "ambientales" de la habitación son las que existen en cualquier momento en un entorno dado. Típicamente, la temperatura ambiente de la habitación es de 22-25 °C, la presión atmosférica ambiente y la humedad ambiente se miden fácilmente y variarán en dependencia de la época del año, el clima y las condiciones climáticas, la altitud, etc.

10 La "actividad del agua" o "Aw" en el contexto de las composiciones de formulación secas, se refiere a la disponibilidad de agua y representa el estado de energía del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor de agua por encima de una muestra dividida por la de agua pura a la misma temperatura. El agua destilada pura tiene una actividad del agua de exactamente uno, es decir, Aw=1,0.

15 La "Humedad Relativa" o "HR" en el contexto de la estabilidad en almacenamiento se refiere a la cantidad de vapor de agua en el aire a una temperatura dada. La humedad relativa es generalmente menor que la requerida para saturar el aire y se expresa en por ciento de humedad de saturación.

20 "Seco" y variaciones de este se refieren a un estado físico que está deshidratado o anhidro, es decir, que carece sustancialmente de líquido. El secado incluye, por ejemplo, secado por pulverización, secado en lecho fluidizado, liofilización y secado al vacío.

25 "Liofilizar" o secado por congelación se refiere a la preparación de una composición en forma seca mediante congelación rápida y deshidratación en estado congelado (a veces denominada sublimación). La liofilización tiene lugar a una temperatura que da como resultado la cristalización de los azúcares. Este proceso puede tener lugar al vacío suficiente para mantener el producto congelado, en algunas modalidades menor de aproximadamente 266,6 Pa (2000 mTorr).

30 La etapa de "eliminación primaria del agua" o "secado primario" o "secado líquido", con respecto a los procesos descritos en la presente descripción, se refiere al secado por deshidratación que tiene lugar desde el momento de descongelar las partículas congeladas hasta el punto en el que comienza el secado secundario. Típicamente, la mayor parte del secado primario se lleva a cabo mediante una evaporación extensa, mientras que la temperatura del producto permanece significativamente más baja que las temperaturas de la fuente de calor. Este proceso puede tener lugar bajo vacío suficiente para mantener el producto descongelado, en algunas modalidades mayor que aproximadamente 266,6 Pa (2000 mtorr).

35 "Secado secundario", con respecto a los procesos descritos en la presente descripción, se refiere a una etapa de secado que tiene lugar a temperaturas de la formulación cerca de la temperatura de la fuente de calor. Este proceso puede tener lugar al vacío suficiente para reducir la actividad del agua de una formulación, en algunas modalidades menos de aproximadamente 133,3 Pa (1000 mTorr). En un proceso de secado de formulación típico, una etapa de secado secundaria reduce la actividad del agua de la formulación a un Aw de 0,3 o menos.

40 La presente invención describe composiciones y métodos de secado para preservar materiales bioactivos sensibles, tales como péptidos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticuerpos, fármacos, vacunas, levaduras, bacterias (probióticas o de otro tipo), virus y/o suspensiones celulares, en almacenamiento.

45 Las composiciones y métodos de secado de la presente invención resuelven el problema de proporcionar una formulación seca rentable y escalable industrialmente que contiene materiales bioactivos sensibles, tales como péptidos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticuerpos, fármacos, vacunas, levaduras, bacterias, virus y/o suspensiones celulares, con una vida útil significativamente extendida en el estado seco. La invención proporciona una composición de conservación y un método de secado que comprende un material bioactivo rodeado por una estructura vítreo amorfa de compuestos altamente solubles. El proceso de secado comprende: mezclar el material biológico y la composición en una suspensión líquida, congelación instantánea dicha suspensión de composición en nitrógeno líquido para formar gotas, hebras o perlas, seguido del secado del material bioactivo en una formación de vidrio de azúcar mediante la evaporación de la humedad bajo un régimen de presión reducida mientras se suministra calor a la composición.

50 La presente invención se basa en el descubrimiento notable de que los materiales bioactivos pueden protegerse en una estructura vítreo mientras retienen una actividad sustancial. Cuando el material biológico se combina con la mezcla de composición y se seca de acuerdo con la presente invención, se logra una estabilidad superior durante la exposición prolongada a condiciones de temperatura y humedad severas. La presente invención describe composiciones que contienen un material bioactivo, una mezcla de carbohidratos solubles y sales de ácido carboxílico que mejoran el vidrio. Las composiciones de la invención son inherentemente diferentes en su estructura y función física de las composiciones azucaradas no viscosas o concentradas que simplemente se secaron bajo un proceso típico de liofilización. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6,919,172 describe una composición en polvo

55

aerosolizada para la administración pulmonar, que contiene una mezcla de varios carbohidratos y citrato de sodio. Sin embargo, la composición descrita en la patente carece del compuesto proteico adicional que es esencial para la estabilidad añadida y para la formación de una estructura física conveniente durante el secado de soluciones que tienen una alta concentración de azúcares. La composición descrita en esta patente también carece de viscosidad o estructura de hidrogel, lo que permite un secado eficiente de la solución descongelada o no congelada para mejorar la formación de vidrio. Por el contrario, la composición y el proceso de secado de la presente invención superan todos estos problemas mientras logran una estabilidad superior del material biológico. El estado de la técnica también carece del componente carboxílico adicional que actúa en sinergia con las proteínas hidrolizadas para proteger y estabilizar el material biológico.

La estructura vítreo mejorada generalmente se logró en el estado de la técnica mediante la formación de espuma o la ebullición de la solución al vacío para facilitar el secado eficaz. La etapa de formación de espuma generalmente dio como resultado una ebullición y erupción extensas de la solución que es una consecuencia inevitable del secado de la solución no congelada, y como resultado, solo puede lograrse una capacidad de carga muy baja de la solución en un vial o un recipiente (ver por ejemplo la patente de Estados Unidos núm. 6,534,087, en la que el grosor del producto espumado final es inferior a 2 mm). Las composiciones y métodos de secado de la presente invención evitan la ebullición y la formación de espuma de la formulación, lo que permite de esta manera una carga mucho mayor de material por área de secado y, como un resultado, puede escalarse fácilmente a la producción de grandes cantidades de material sin el uso de recipientes y bandejas o equipos diseñados específicamente.

Puede usarse una amplia gama de materiales bioactivos con la composición inventiva para formar un medio de conservación acuoso de acuerdo con la invención. Este medio de conservación puede someterse después a los procesos de secado de la presente invención para fabricar un polvo seco estable de material biológico. Estos materiales biológicos incluyen, entre otros: enzimas, tales como enzimas pancreáticas, lipasas, amilasas, proteasas, fitasas, lactato deshidrogenasa; proteínas, tales como insulina; vacunas; virus, tales como adenovirus; células, incluidas células procariotas (que incluyen bacterias y hongos) y células eucariotas, otros materiales biológicos, que incluyen fármacos, ácidos nucleicos, péptidos, hormonas, vitaminas, carotenoides, minerales, antibióticos, microbiocidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, espermicias, anticuerpos y vesículas lipídicas.

Se ha demostrado que las bacterias probióticas se benefician particularmente de las composiciones y métodos de secado de la presente invención. El polvo probiótico seco estable se prepara de acuerdo con las composiciones y métodos de la invención que incluyen mezclar cultivos frescos, congelados o secos de bacterias probióticas con una mezcla de carbohidratos y compuestos de mejora del vidrio, congelación instantánea la formulación viscosa en nitrógeno líquido para formar gotas, hebras o perlas sólidas congeladas, y secar aplicando inicialmente suficiente vacío para aumentar la temperatura de la formulación por encima de la temperatura de congelación y suministrar una fuente de calor de 20 °C y superior para facilitar la eliminación primaria del agua. Mantener la temperatura de la formulación por encima del punto de congelación se puede lograr mediante el ajuste del vacío y por conducción de calor a la formulación. Para completar el proceso de secado y reducir aún más la actividad del agua de la formulación más abajo Aw de 0,3 o menos, se aplica una etapa de secado secundaria a vacío máximo y a temperatura elevada hasta 70 °C. Tal composición puede permanecer estable en condiciones de almacenamiento de 40 °C y 33 % de HR durante 30 días o más, como se muestra en la Figura 15.

Se ha demostrado que los microorganismos vivos, tales como las bacterias probióticas en comprimidos por compresión, se benefician particularmente de las composiciones y métodos de secado de la presente invención. El polvo biológico seco estable se prepara de acuerdo con las composiciones y métodos de la invención, que incluyen mezclar cultivos frescos, congelados o secos de organismos unicelulares con una mezcla de azúcares, proteínas hidrolizadas y un antioxidante y que incluye potencialmente cantidades adicionales de polisacáridos y oligosacáridos y compuestos potenciadores del vidrio, congelación instantánea la formulación viscosa en nitrógeno líquido para formar gotas, hebras o perlas congeladas, evaporar el agua aplicando inicialmente un vacío suficiente para aumentar la temperatura de la formulación por encima de su temperatura de congelación y suministrar una fuente de calor de 20 °C y superior para facilitar la eliminación primaria del agua. Mantener la temperatura de la formulación por encima del punto de congelación puede lograrse mediante el ajuste del vacío y mediante la conducción o radiación de calor a la formulación. Para completar el proceso de secado y reducir aún más la actividad del agua de la formulación más abajo Aw de 0,3 o inferior, se aplica una etapa de secado secundaria a vacío máximo y a temperatura elevada hasta 70 °C.

Composiciones de la invención

De acuerdo con la invención, la formulación comprende una mezcla de carbohidratos de di-, oligo- y poli-sacáridos, en la que se incrusta el material bioactivo. Los ejemplos de un polisacárido adecuado incluyen, pero no se limitan a, ftalato de acetato de celulosa (CAP), carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio, sales de ácido algínico, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa, carragenano, goma gellan, goma guar, goma acacia, goma xantana, goma garrofín, quitosano, ácido poliglicólico, almidones y almidones modificados. Los ejemplos de un oligosacárido adecuado, además del ciclodextrina oligosacárido requerida, incluyen, pero no se limitan a, fructanos, inulina, FOS, maltodextrinas, dextranos, etc.; y sus combinaciones. Los ejemplos de un disacárido adecuado incluyen, pero no se limitan a, lactosa, trehalosa, sacarosa, etc. En una modalidad particular, un polisacárido ilustrativo adecuado es

alginato de sodio o goma gellan. En otras modalidades, la formulación comprende, en por ciento en peso de materia seca total, de 0,1 % de alginato de sodio.

5 En algunas modalidades, la mezcla de carbohidratos comprende di-, oligo- y poli-sacáridos en una relación en peso de 10:0,1-4:0,1-2, o en donde la relación en peso de disacáridos/oligosacáridos/polisacáridos es de aproximadamente 10:0,2:0,1 a aproximadamente 10:2: 1.

10 En algunas modalidades, la fracción de disacáridos en la mezcla de carbohidratos incluye varios azúcares y alcoholes de azúcar. Los disacáridos adecuados son aquellos que no cristalizan y/o dañan o desestabilizan el material biológicamente activo en la formulación a temperaturas de congelación (por ejemplo, inferiores a -20 °C) y durante la eliminación del agua. Por ejemplo, el material bioactivo puede secarse en presencia de azúcares formadores de vidrio tales como sacarosa, lactosa o trehalosa para promover la retención de la estructura molecular durante todo el proceso de secado e impartir rigidez estructural a la matriz amorfa en el estado seco. Un disacárido adecuado reemplazaría eficazmente el agua de hidratación perdida durante el secado, para evitar daños a las membranas celulares y la desnaturalización de las enzimas (ver la reseña de Crowe y otros, 1998). Otras funciones del disacárido en la composición pueden incluir proteger el material bioactivo de la exposición a la luz dañina, oxígeno, agentes oxidantes y humedad. Un disacárido adecuado debe disolverse fácilmente en una solución. La trehalosa es un protector particularmente atractivo porque es un disacárido no reductor que se encuentra en plantas y organismos vivos (por ejemplo, bacterias, hongos e invertebrados tales como insectos y nematodos) que permanecen en estado de letargo durante períodos de sequía. En algunos casos, puede ser beneficioso incluir dos o más disacáridos diferentes, tales como una mezcla de trehalosa y sacarosa, para inhibir la formación de cristales, para mejorar la estabilidad de la formulación de material bioactivo seco en condiciones de almacenamiento durante períodos de tiempo prolongados y para reducir costos.

15 20 25 30 35 En algunas modalidades, la fracción de oligosacáridos en la mezcla de carbohidratos, además de ciclodextrina, incluye además inulina, maltodextrinas, dextranos, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), mananoooligosacáridos (MOS) y sus combinaciones. Los oligosacáridos mitigan varios problemas asociados con el uso de trehalosa sola como protector para una variedad de materiales biológicos conservados. Aunque es muy eficaz para proteger el material biológico durante la deshidratación y la rehidratación, la trehalosa sola como estabilizador no proporciona una estabilidad en almacenamiento conveniente durante períodos prolongados de tiempo, especialmente a altas temperaturas y/o ambientes húmedos. Este problema se resolvió en la presente invención con la adición de oligosacáridos, por ejemplo, inulina, a la mezcla de carbohidratos. De acuerdo con la invención, el oligosacárido comprende ciclodextrina.

40 45 50 55 60 Una relación en masa ilustrativa adecuada de los sacáridos en la mezcla de carbohidratos es 10:0,1-10:0,1-2 disacáridos/oligosacáridos/polisacáridos y en algunas modalidades, en donde la relación en peso de disacáridos/oligosacáridos/polisacáridos es de aproximadamente 10:0,2:0,1 a aproximadamente 5:10:1. De acuerdo con la invención, la mezcla de carbohidratos comprende en por ciento en peso de materia seca total, 10-50 % de disacáridos, 10-80 % de oligosacáridos y 0,1-10 % de polisacáridos.

65 En una modalidad particular, la formulación comprende una mezcla de oligosacáridos. La mezcla de oligosacáridos mitiga varios problemas asociados con el uso de un solo oligosacárido solo como un material de mejora del vidrio en la composición. Aunque son muy eficaces para elevar la temperatura de transición vítreo, los oligosacáridos tienden a cristalizarse y precipitarse rápidamente y de esta manera fragmentar la estructura amorfa vítreo, especialmente a altas temperaturas y/o ambientes húmedos. Este problema se resolvió en la presente invención con la adición de una mezcla de oligosacáridos en lugar de un solo tipo de oligosacárido, en algunas modalidades una mezcla de fructanos y dextrinas de DE bajo. En algunas modalidades, la mezcla de carbohidratos comprende, en por ciento en peso de materia seca total, 5-40 % de fructanos y 5-40 % de dextrinas de DE bajo.

70 Una composición adecuada comprende aproximadamente 90 % de un componente carbohidrato que incluye al menos un di-, oligo- y poli-sacárido y un componente proteico que comprende aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 40 % de una proteína hidrolizada. En algunas modalidades, la composición comprende aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 % de componente carbohidrato y aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % de un componente potenciador de vidrio tal como una proteína hidrolizada y ácido carboxílico, en donde el componente carbohidrato comprende entre 10 y 50 % o de 40 % a 50 % de un disacárido; 10 % de un oligosacárido; y de 0,1 a 10 % o de 5 % a 10 % de un polisacárido. La composición comprende además una sal de un ácido orgánico que se considera otro componente potenciador del vidrio y preferentemente comprende entre aproximadamente 0,5 % y 20 % de ácido carboxílico, en base al peso total de la composición.

75 En una modalidad adicional, la composición comprende una mezcla de alginato de sodio y oligosacáridos en una relación en peso de 1:1-10, o 1:1-5, de alginato de sodio/oligosacáridos.

80 En otra modalidad más de la presente invención, la composición se reticuló con iones metálicos divalentes para formar un hidrogel firme. En algunas modalidades, la formulación de hidrogel reticulado se forma atomizando o extruyendo la suspensión en un baño que contiene solución de iones metálicos divalentes o añadiendo iones metálicos divalentes

directamente a la suspensión y permitiendo que la formulación se endurezca y forme un hidrogel. Después, la formulación de hidrogel se congela instantáneamente y se seca de acuerdo con los métodos de secado de la invención.

5 En otras modalidades, la composición comprende cantidades significativas de compuestos de mejora del vidrio que incluyen sales de ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido mágico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glutámico y similares. Las sales pueden incluir cationes tales como sodio, potasio, calcio, magnesio y similares. Los ejemplos incluyen citrato de sodio, lactato de sodio, maleato de sodio, gluconato de magnesio, ascorbato de sodio y similares. Se prefieren las sales que tienen una alta temperatura de transición vítreo (Tg) y una alta solubilidad. Los ácidos orgánicos ilustrativos incluyen ácido cítrico y sus sales (por ejemplo, citrato de sodio o potasio, citrato de trisodio dihidratado) y ácido ascórbico y sus sales (por ejemplo, ascorbato de sodio, ascorbato de potasio, ascorbato de magnesio). La composición de la invención incluye una mezcla de carbohidratos de di-, oligo- y polisacáridos e iones de ácido orgánico tal como ácido cítrico y/o ácido ascórbico.

10 15 La cantidad de potenciadores de vidrio usados en la composición variará en dependencia de la composición general y sus condiciones de almacenamiento en secado previstas. Generalmente, la cantidad del compuesto mejorador de vidrio en la composición es superior a dos (2) por ciento en peso de materia seca total mientras que el pH de la solución o dispersión se mantiene ligeramente alcalino (pH 7-7,5). Sin estar ligado a la teoría, se cree que la función del compuesto de mejora de vidrio a un contenido relativamente alto como se describe en la presente descripción no solo es contribuir a la estructura vítreo amorfía y rígida conveniente de la composición seca resultante, sino también proteger el material bioactivo de la exposición a la luz, oxígeno, agentes oxidantes y humedad dañinos. Una composición ilustrativa adecuada comprende, en por ciento en peso de materia seca total, 1-20 % o aproximadamente 2-10 % de compuesto de mejora del vidrio en peso de materia seca total.

20 25 30 Otros potenciadores de vidrio adecuados que se incluyen en la composición para aumentar aún más su estabilidad incluyen proteínas, hidrolizados de proteínas, polipéptidos y aminoácidos. Estos incluyen gelatina, albúmina, proteína de suero, proteína de soja, caseína, caseinato, inmunoglobulinas, proteína de soja, proteína de guisante, proteína de semilla de algodón u otras proteínas alimentarias y lácteas o vegetales y/o sus hidrolizados, o cualquier otra proteína hidrolizada. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen polialanina, poliarginina, poliglicina, ácido poliglutámico y similares. Los aminoácidos útiles incluyen lisina, glicina, alanina, arginina o histidina, así como también aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc.) y una metilamina tal como betaína.

35 40 45 En algunas modalidades, se usan caseína o proteína de guisante o caseína hidrolizada o proteínas de guisante hidrolizadas. En algunas modalidades, la fracción de proteínas hidrolizadas en la mezcla de composición incluye proteínas parcialmente hidrolizadas o extensamente hidrolizadas, polipéptidos y aminoácidos. Como se usa en la presente, las proteínas extensamente hidrolizadas son aquellas obtenidas por hidrólisis enzimática extensa mediante el uso de proteasas para la modificación (descomposición) de proteínas. En algunas modalidades, proteínas animales o vegetales hidrolizadas tales como caseína, suero, soja o proteínas de guisante, o caseína o proteínas de guisante extensamente hidrolizadas. Algunas modalidades emplean proteínas extensamente hidrolizadas que tienen más del 80 % de péptidos de cadena corta con un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa y al menos el 20 % del sustrato proteico se convierte en péptidos que tienen masas moleculares de 200 a 2000 dalton. Sin estar ligado a la teoría, se cree que una mezcla resultante de un azúcar y proteína extensamente hidrolizada como se describe en la presente descripción permite un secado más rápido y contribuye a la estructura vítreo amorfía y rígida conveniente de la composición seca resultante. Una proteína hidrolizada con enzimas puede prepararse mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica o puede obtenerse de una fuente comercial. Una composición ilustrativa adecuada comprende, en por ciento en peso de materia seca total, 5-40 % de proteínas extensamente hidrolizadas.

50 Una cantidad total ilustrativa adecuada de proteínas, proteínas hidrolizadas o proteínas ampliamente hidrolizadas y aminoácidos en la composición seca es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 %, o de aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 %, o de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de la masa total de la mezcla seca.

55 60 65 Se debe señalar que la cantidad adecuada de los potenciadores de vidrio en la composición puede depender de las características deseadas de la composición seca. Por ejemplo, una composición que contiene una mezcla de carbohidratos y proteína o hidrolizados de proteína puede usarse para mejorar la estabilidad química de un material biológico mientras se almacena a temperatura y humedad relativa suaves, tal como 25 °C y 25 % de HR. La determinación de la cantidad adecuada de potenciadores de vidrio, y particularmente la relación relativa entre los disacáridos y oligosacáridos, debe hacerse de acuerdo con las condiciones de almacenamiento deseadas. Por ejemplo, una composición que contiene una alta relación de disacárido/oligosacáridos puede usarse para mejorar la estabilidad química de un material biológico mientras se almacena a temperatura y humedad relativa suaves, tal como 25 °C y 25 % de HR. Una composición que contiene una relación baja de disacárido/oligosacáridos puede usarse para mejorar la estabilidad química de un material biológico mientras se almacena a alta temperatura y humedad relativa, tal como 30 °C y 40 % de HR o más.

Los iones de ácido ascórbico pueden preferirse en algunas modalidades como potenciadores de vidrio para obtener el beneficio adicional de estabilizar a mayor temperatura y exposición a la humedad. Alternativamente, en algunas modalidades, una combinación de iones citrato y/o ascorbato con otro potenciador de vidrio, tal como proteína o hidrolizado de proteína, es más preferida.

5 En algunas modalidades, la formulación comprende una mezcla de azúcares y proteínas hidrolizadas, en las que se incrusta el material bioactivo. Los ejemplos de azúcares adecuados incluyen, pero no se limitan a, disacáridos tales como lactosa, trehalosa, sacarosa y una mezcla de estos. Los ejemplos de proteínas hidrolizadas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, gelatina, albúmina, proteína de suero, proteína de soja, caseína, caseinato, inmunoglobulinas, proteína de soja, proteína de guisante, proteína de semilla de algodón o cualquier otra proteína hidrolizada extensamente de origen lácteo, animal o vegetal y una mezcla de estas. Una cantidad total de azúcares ilustrativa adecuada en la composición seca es de 10 % de la masa total de la mezcla seca.

10 15 En una modalidad ilustrativa, el agente formador de vidrio comprende una mezcla de un disacárido y una proteína hidrolizada. En una modalidad particular, un agente formador de vidrio ilustrativo adecuado es una mezcla de trehalosa y proteína hidrolizada.

20 25 Idealmente, los compuestos que se reconocen generalmente como seguros (GRAS) son preferidos sobre aquellos que no son GRAS. Otros incluyen una sal de excipiente tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, (por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol); propilenglicol; polietilenglicol; plurónicos; surfactantes; y sus combinaciones.

30 35 40 En algunas modalidades, el material bioactivo comprende bacterias vivas (por ejemplo, bacterias probióticas). Los ejemplos de microorganismos adecuados incluyen, pero no se limitan a, levaduras tales como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*, mohos tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Torulopsis* y bacterias tales como los géneros *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*. Los ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados estarían representados por las siguientes especies e incluirían todos los biotipos de cultivo dentro de esas especies: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lenthus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bacteroides amylophilus*, *Bac. capillosus*, *Bac. ruminocola*, *Bac. suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesis*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacetylactis*, *Efaecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. muntdi*, *E. thermophilus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces fragilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. case 4 L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. delbrueckii ss. bulgaricus*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. cereviseae* (damnosus), *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. shermanii*, *Saccharomyces cereviseae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph. xylosus*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius* ss. *thermophilus*, *Strep. Thermophilus* y *Strep. lactis*.

45 Métodos para fabricar las composiciones

50 55 60 El método para fabricar las composiciones de acuerdo con la invención se describe en la reivindicación 9. La masa en peso del material bioactivo en los medios de cultivo está típicamente entre aproximadamente 5 % y 30 % p/v, o entre aproximadamente 10 % y 20 % p/v. La masa en peso añadida de la mezcla de composición en los medios de cultivo está típicamente entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 60 %, o entre aproximadamente 20 % y 40 %. El contenido sólido final en la suspensión mezclada es de aproximadamente 20 % a aproximadamente 60 % y más específicamente de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 %. En algunas modalidades, la solución se mezcla a temperatura ambiente o ligeramente se calienta para ayudar a solubilizar los materiales en la solución viscosa (por ejemplo, de 20 °C a 40 °C). En una variación de la presente invención, la cantidad total de la mezcla de carbohidratos en la formulación se ajusta para lograr una viscosidad y densidad de formulación deseadas que permiten un secado eficiente mientras se evita la formación gomosa o la formación excesiva de espuma que puede ocurrir durante la etapa de secado. Una viscosidad de suspensión ilustrativa adecuada es de aproximadamente 1000 mPas (1000 cP) a aproximadamente 500 000 mPas (500 000 cP), o de aproximadamente 5000 mPas (5000 cP) a aproximadamente 300 000 mPas (300 000 cP). Una viscosidad y densidad deseadas de la suspensión final pueden lograrse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, ajustando ligeramente la cantidad de los polisacáridos en la mezcla de carbohidratos o desgasificando o inyectando gas tal como aire, nitrógeno, dióxido de carbono, argón, etc.

65 La suspensión de material biológico de la presente invención se congela típicamente de forma instantánea a entre -30 °C y -180 °C, o la formulación se congela de forma instantánea en nitrógeno líquido mediante atomización, goteo o inyección en un baño de nitrógeno líquido. Recoger las partículas, perlas, hebras o gotas del baño de nitrógeno líquido y secar en un liofilizador o secador al vacío, o alternativamente almacenarlas en un congelador profundo (entre -30 °C y -80 °C) para su uso posterior en forma congelada o para su posterior secado, por ejemplo, mediante secado por pulverización.

En general, las técnicas del proceso de secado que son útiles incluyen el secado por pulverización; o el secado por evaporación de una solución no congelada en un horno de vacío o evaporador centrífugo a temperaturas superiores a la temperatura de congelación de la suspensión (-20 a 50 °C), seguido de molienda hasta el tamaño de partícula conveniente. Las partículas de polvo resultantes son vítreas con la mayoría de los materiales vítreos que recubren el material biológico. La ventaja de recubrir el material biológico con materiales vítreos es aumentar la estabilidad física del producto y reducir las reacciones intermoleculares nocivas dentro de la partícula. En una modalidad ilustrativa adecuada, las partículas congeladas se cargan en bandejas y se transfieren inmediatamente a una cámara de secado al vacío donde el proceso de secado avanza en tres etapas principales que incluyen: (1) Una etapa de purga y estabilización de la estructura cortas opcional de las partículas congeladas bajo una presión al vacío de menos de 266,6 Pa (2000 mTorr), (2) etapa de secado primario al vacío de más de 266,6 Pa (2000 mTorr) y a una temperatura por encima del punto de congelación de la suspensión, y (3) etapa de secado secundaria y final del material amorfó vítreo bajo presión al vacío completo y temperatura elevada durante un tiempo suficiente para reducir la actividad del agua de la formulación seca a 0,3 Aw o menos.

En una modalidad particular de la presente invención, la formulación seca se granula con una mezcla de grasas fundidas para obtener una conservación mejorada en cortos períodos de exposición a condiciones extremas de temperatura y humedad.

La composición biológica seca y estable puede usarse directamente como escama, o molerse en un polvo y tamizarse a un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 1000 µm. La formulación puede administrarse directamente a un animal, que incluye al hombre, como un polvo concentrado, como un líquido reconstituido, (por ejemplo, una bebida), o puede incorporarse en forma de escamas o polvo en un alimento o pienso o producto agrícola existente.

En algunas modalidades, las composiciones para la preparación de un polvo seco o congelado estable de materiales biológicos de acuerdo con la invención incluyen una mezcla de carbohidratos y un potenciador de vidrio. Tales materiales, cuando se mezclan con el material bioactivo, forman perlas hebras o gotas en nitrógeno líquido y pueden secarse eficientemente en una estructura vítreo amorfá de acuerdo con los métodos de la invención y para proporcionar grandes cantidades de composiciones secas estables para el almacenamiento y la administración de dicho material bioactivo. (Ver Figuras 7 y 8 para observaciones visuales y microscópicas y actividad del agua (Aw) de diferentes formulaciones después del secado). La mezcla de carbohidratos proporciona estabilidad estructural a la formulación a alta temperatura y humedad, tal como por encima de 30 °C y 40 % de HR, y/o beneficios protectores físicos y químicos a los materiales bioactivos y previene o reduce los efectos adversos tras la reconstitución o rehidratación.

La fracción de polisacárido en la mezcla de carbohidratos puede proporcionar viscosidad espesante a la formulación y mejor control sobre las propiedades de densidad de la formulación bajo vacío y mayor resistencia estructural a las composiciones de formulación secas de la invención. (Ver Figura 8 - Imágenes 4, 4b, 4c para la estructura vítreo y sequedad de esa formulación particular). Los polisacáridos adecuados, particularmente para organismos vivos, son gomas solubles en agua, debido a su característica distintiva de formar gel viscoso a temperaturas suaves. También se encontró que las gomas a cierta concentración estabilizan eficazmente la estructura de la formulación al vacío, al proporcionar la viscosidad y densidad apropiadas a la formulación y permitir un secado eficaz de la formulación durante la etapa primaria de eliminación de agua a una viscosidad particular. Ciertas gomas también pueden formar hidrogeles mediante reticulación con cationes divalentes o multivalentes (por ejemplo, alginatos, pectinas, quitosano) o mediante cambios de temperatura o pH (por ejemplo, gelatinas, CMC, CAP, goma gellan). Las soluciones de hidrogeles evitarán problemas asociados con el secado al vacío de soluciones no congeladas. También se encontró que las gomas a cierta concentración estabilizan eficazmente la formulación y facilitan la formación de una estructura vítreo amorfá y mejoran el perfil de secado al vacío (ver Figura 7 - imágenes 3a, 3b, 3c, 4, y Figura 8 - 4c y Figura 13).

En particular, al ver las imágenes de la Figura 7 en combinación con los resultados establecidos más abajo en la Tabla 1, es evidente que las muestras 3b, 3c, 4, 5 y 6 se secaron lo suficiente para proporcionar cierta porosidad en las estructuras vítreas amorfás.

Tabla 1

		Inspección visual de las diversas composiciones secas							
		1	2	3a	3b	3c	4	5	6
Sequedad		No seco	No seco	No seco	Seco	Seco	Seco	Seco	Seco
Porosidad		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Presente	Presente	Presente	Ninguno	Parcial
Aw		0,847	0,923	0,916	0,216	0,183	0,376	0,171	0,112
Estructura de vidrio		Ninguno	Ninguno	Ninguno	Parcial	Parcial	Presente	Parcial	Parcial

Por ejemplo, una forma seca de material bioactivo puede formularse en una solución o suspensión que contiene la mezcla de polvo de la composición. La mezcla de composición puede disolverse en una solución acuosa tibia con

agitación de bajo cizallamiento antes de enfriar y mezclar con el material bioactivo. El material bioactivo, tal como un virus o una bacteria cultivada, puede concentrarse y separarse del medio de cultivo mediante centrifugación o filtración antes de la resuspensión en la formulación. Alternativamente, la totalidad o una porción del agua en la formulación se proporciona en el líquido del material biológico concentrado. La suspensión se mantiene a una temperatura ligeramente superior a la temperatura ambiente y la mezcla de polvo de la composición seca se añade lentamente a la suspensión tibia (25 °C a 40 °C) que contiene el material biológico. La suspensión se agita suavemente en un mezclador planetario hasta que todos los componentes se dispersan o disuelven completamente y se obtiene una suspensión uniforme.

La suspensión viscosa puede reticularse después para formar un hidrogel (en dependencia de las propiedades del polisacárido) mediante la adición de iones metálicos o el cambio de temperatura o pH de la suspensión y después secarse de acuerdo con los métodos de secado de la invención. Alternativamente, la suspensión puede congelarse instantáneamente mediante atomización a través de una tobera, goteo o inyección en baño de hielo seco o nitrógeno líquido para formar partículas pequeñas o cadenas o perlas de gotas sólidas. Las partículas sólidas congeladas pueden almacenarse en un congelador profundo entre -30 °C y -80 °C para su uso posterior como un producto congelado estable o hasta su secado. Un método de secado ilustrativo adecuado es el secado al vacío donde la temperatura del producto se mantiene ligeramente por encima de su temperatura de congelación. Las gotas o perlas congeladas se colocan en bandejas con una capacidad de carga de aproximadamente 1 kg/m² (0,1 kg/pie cuadrado) a aproximadamente 16 kg/m² (1,5 kg/pie cuadrado) y se secan de acuerdo con el método de la invención. En algunas modalidades, el proceso de secado se inicia mediante una etapa de purga corta, que permite que el producto se aclimate a la temperatura inicial y la estructura de las partículas congeladas se relajen y estabilicen y el exceso de aire se desgasifique. Típicamente, la etapa de purga toma entre 1 y 60 minutos en dependencia de la viscosidad del producto y la carga de la bandeja. Las perlas o partículas deben permanecer en una forma sólida congelada durante toda la etapa de purga. Después, la temperatura del producto se lleva por encima de su temperatura de congelación y la etapa de eliminación de agua primaria seguida hasta que toda el agua libre se evapora del producto. Una vez que la temperatura de formulación alcanzó la temperatura deseada, se ajusta el calor para mantener esa temperatura y se avanza la etapa de secado líquido primario por evaporación. En esta etapa, la formulación ya se descongela y se produce la evaporación acelerada del agua sin hervir ni espumar. El proceso de secado se completa con una fase de secado secundaria adicional a vacío máximo y temperatura elevada.

Los métodos típicos en el estado de la técnica implican una formación de espuma y/o salpicaduras extensas y una ebullición violenta que pueden ser dañinas para los biológicos sensibles y causar dificultades para la escala industrial a alta capacidad de carga (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos núm. 6,534,087, donde la presión de vacío aplicada da como resultado una ebullición y formación de espuma violentas). Sin embargo, las composiciones y métodos actuales evitan hervir o espumar la formulación mientras logran una velocidad de secado significativamente más rápida y permiten una alta capacidad de carga de la formulación. Adicionalmente, un desgasificado completo y eficiente de las suspensiones líquidas viscosas es difícil y puede requerir un período de tiempo prolongado. Todos estos obstáculos se resolvieron en la presente invención mediante el uso de una composición adecuada que permite una eliminación primaria eficaz del agua mientras se forma una estructura vítreo sin hervir y sin excesiva formación de espuma. La carga de partículas sólidas congeladas en una bandeja en lugar de una suspensión o jarabe viscoso permite una capacidad de carga mucho mayor por área de secado en bandejas de la que se proporcionó de acuerdo con el estado de la técnica.

En un ejemplo adecuado de la presente invención, el material bioactivo es una cultura de bacterias probióticas en concentrado vivo. La cultura probiótica puede ser fresca, congelada o ya seca, en forma de polvo seco.

La mezcla de composición puede añadirse al medio de cultivo probiótico concentrado para llevar el contenido sólido de la mezcla de solución al 40-60 % (p/p) y el pH se ajusta a 6,5-7,5 con iones de fosfato o citrato. La solución se mezcla a una temperatura ligeramente superior a la temperatura ambiente (típicamente entre 25 °C -37 °C) hasta que todos los componentes se disuelven completamente. La suspensión viscosa se gotea en nitrógeno líquido para formar pequeñas gotas o perlas que después se retiran del nitrógeno líquido, se empaquetan en bolsas y se almacenan en un congelador profundo a -80 °C hasta el secado.

Un método de secado típico de las bacterias probióticas vivas incluye la dispersión de las perlas congeladas sólidas en bandejas en una capa uniforme con una capacidad de carga entre 1-16 kg/m² (100-1500 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocan inmediatamente en un secador por congelación. Después se aplica vacío a aproximadamente 133,3 Pa (1000 mTorr) o menos y, en dependencia del tamaño y tipo de fuente de calor del liofilizador, la temperatura en estante se ajusta para mantener las partículas a aproximadamente -20 a aproximadamente -30 °C. Las perlas congeladas sólidas se dejan purgar durante aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos y el vacío se ajusta entre 266,6 y 1333 Pa (2000 y 10 000 mTorr) y la transferencia de calor se aumenta para elevar la temperatura de la formulación entre -20 °C y 0 °C, o entre -10 °C y 0 °C, típicamente aproximadamente -10 °C. Estas condiciones de temperatura y presión de vacío se mantienen durante la etapa primaria de eliminación de agua, que puede durar de unas pocas horas y hasta 24 horas en dependencia de la carga de la bandeja. En algún momento durante el proceso de secado primario, la velocidad de evaporación del solvente disminuye y la temperatura de la formulación comienza a aumentar debido al exceso de suministro de calor en la cámara de secado. Este punto indica el final de la etapa de secado primario en esta invención. A medida que el solvente se expulsa de la formulación, los compuestos formadores

de vidrio en la solución se concentran y se espesan hasta que dejan de fluir como un líquido y forman una estructura vítreo amorfía y/o estable.

5 Despues se sigue una etapa de secado secundario a vacío máximo y temperatura de formulación entre 30 °C y 50 °C. El propósito de la etapa de secado secundario es eliminar la humedad atrapada o unida restante y proporcionar una composición que sea estable en el almacenamiento durante un período de tiempo prolongado a temperaturas ambientales. La etapa de secado secundario puede durar varias horas y su punto final es cuando la formulación está completamente seca y su actividad del agua es inferior a 0,3 Aw.

10 Los métodos de secado de la invención dan como resultado un material biológicamente activo que se encierra dentro de una estructura vítreo amorfía, lo que evita de esta manera el despliegue o la desnaturalización de las proteínas y ralentiza significativamente las interacciones moleculares o la reactividad cruzada, debido a la movilidad muy reducida del compuesto y otras moléculas dentro de la composición vítreo amorfía. Mientras la estructura sólida amorfía se mantenga a una temperatura por debajo de su temperatura de transición vítreo y la humedad residual permanezca relativamente baja, las bacterias probióticas pueden permanecer relativamente estables. Ver la Figura 15. Se debe señalar que lograr una estructura vítreo no es un requisito previo para la estabilidad a largo plazo, ya que algunos materiales biológicos pueden tener un mejor resultado en un estado más cristalino.

15 La estructura vítreo seca puede usarse en bloque, cortada en formas y tamaños deseados, o triturada y molida en un polvo de flujo libre que proporciona un procesamiento aguas abajo fácil como aglomeración húmeda o seca, granulación, formación de tabletas, compactación, peletización o cualquier otro tipo de proceso de suministro. Los procesos para triturar, moler, triturar o pulverizar se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un molino de martillos, un molino de aire, un molino de impacto, un molino de chorro, un molino de pasadores, un molino Wiley o un dispositivo de molienda similar. Un tamaño de partícula ilustrativo adecuado es de menos de aproximadamente 25 1000 µm y, en algunas modalidades, menos de 500 µm.

20 En otro ejemplo de la presente invención, el polvo seco estable que contiene material bioactivo se aglomera con grasas fundidas. El polvo seco se coloca en un mezclador planetario a 40 °C y se añaden lentamente grasas fundidas tales como manteca de cacao, ceras naturales o aceite hidrogenado o una mezcla de estos al polvo tibio bajo agitación y la mezcla se enfriá hasta debajo de la temperatura de fusión de las grasas mientras se mezcla hasta que se logra un tamaño visualmente uniforme de polvo aglomerado. La masa en peso de la mezcla de grasas fundidas en la composición está entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 70 %, en algunas modalidades aproximadamente 30-50 %. El producto final puede consumirse en forma aglomerada o comprimida en una máquina de prensado de comprimidos y consumirse en forma de comprimido.

25 35 En un ejemplo particular, el polvo seco se comprime en una máquina de prensado de comprimidos para formar un comprimido en una forma y tamaño convenientes. La composición bioactiva estable y seca se mezcla opcionalmente con un relleno para ajustar la potencia del comprimido a una dosis conveniente. El relleno puede incluir, pero no se limita a, maltodextrina, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, dióxido de silicio coloidal y sus combinaciones. Opcionalmente, también se incluye un agente promotor de la desintegración en la mezcla de formulación. Los ejemplos de un agente promotor de la desintegración pueden incluir, pero no se limitan a, croscarmelosa de sodio, crospovidona (poli-vinilpirrolidona insoluble), glicolato de almidón de sodio, gliconato de almidón de sodio, almidón pregelatinizado y similares. Como se usa en la presente, la mezcla de comprimidos puede incluir opcionalmente agentes de flujo. Los agentes de flujo pueden incluir, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, estado de zinc, ácido esteárico y sílice ahumada tal como sílice ahumada hidrófila o hidrófoba.

30 40 Los métodos adecuados para producir comprimidos a partir de la composición bioactiva estable y otros ingredientes de comprimidos incluyen métodos de compresión estándar, incluidos los usados convencionalmente para producir comprimidos multicapa. Es preferible una presión de compresión de tableteo de hasta 50 kN/cm², correspondiente a una resistencia a la tracción por debajo de 100 N (equipo Erweka), sin embargo, la exposición a la temperatura debe limitarse a menos de 60 °C en aquellos casos donde el material bioactivo es un microorganismo vivo.

45 55 Los comprimidos pueden diseñarse para tragarse enteros, masticarse o consumirse como comprimidos efervescentes para bebidas. Cuando los comprimidos se desintegran al consumirlos, ya sea en la boca, en la bebida o en el estómago, el material bioactivo se expone a otros materiales activos de los que se separaron por la estructura del comprimido. Esto puede potencialmente dañar el material biológico si la concentración local de los materiales dañinos es demasiado alta. Por lo tanto, se prefiere en algunas modalidades que la desintegración del material activo bioactivo se retrase para permitir que el contenido de otros componentes activos en el comprimido se diluya y disperse. Este problema se resolvió en la presente invención mediante la formación de una composición estructurada endurecida o reticulada como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el material bioactivo permanece intacto dentro de la matriz de composición tras mezclar en agua. En algunas modalidades, el material bioactivo se libera sin dañar de la matriz de composición en un sitio de acción deseado a lo largo del tubo digestivo del animal.

60 65 Los comprimidos de acuerdo con la invención pueden empacarse de tal manera que se conserven su estado inicial de sequedad dentro de límites aceptables. Esto puede implicar empaquetar los comprimidos en un compartimiento impermeable a la humedad tal como un tubo o un empaque tipo burbuja o un contenedor que contiene un agente

5 deshidratante tal como gel de sílice para absorber el agua con el fin de reducir la actividad del agua dentro del contenedor. Para la protección contra el oxígeno, tal empaque también puede contener un material atrapador de oxígeno tal como FreshPax®, Ageless™, palmitato de ascorbilo u otros ascorbatos, galatos de propilo u otros galatos, alfa-tocoferol, sulfito de magnesio o sodio, hidroxianisol butilado o hidroxitolueno butilado y similares.

10 Las composiciones y métodos descritos en la presente descripción estabilizan el material bioactivo y preservan su actividad durante un período de almacenamiento prolongado a temperatura y humedad relativa superiores a las ambientales. Por ejemplo, las composiciones se prueban para determinar la estabilidad sometiéndolas a temperatura elevada (por ejemplo, 40 °C) y alta humedad (por ejemplo, 33 % de HR o 43 % de HR) y medir la actividad biológica de las formulaciones. Como ejemplo de bacterias probióticas vivas, los resultados de estos estudios demuestran que las bacterias formuladas en estas composiciones son estables durante al menos 60 días. La estabilidad se define como el tiempo para una pérdida de potencia de 1 log UFC/g. Tales formulaciones son estables incluso cuando se usan altas concentraciones del material biológicamente activo. Por lo tanto, estas formulaciones son ventajosas porque pueden enviarse y almacenarse a temperaturas iguales o superiores a la temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo. Los siguientes ejemplos 1-20 y 22-47 no están de acuerdo con la invención, es decir, son solo de referencia. Los Ejemplos 21, 48 y 49 son de acuerdo con la invención.

15 Ejemplo de referencia 1

20 Preparación de la composición seca y estable

Mezcla de carbohidratos básicos

25 Aproximadamente 70 g de trehalosa (Cargill Mineápolis, MN), aproximadamente 5 g de inulina instantánea (Cargill Mineápolis, MN) y aproximadamente 3 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) se mezclaron uniformemente en forma seca.

30 Mezcla de potenciadores de vidrio básicos

35 Aproximadamente 17 g de hidrolizado de caseína o hidrolizado de guisante (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ) y 5 g de citrato de sodio o ascorbato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) se mezclaron uniformemente en forma seca.

35 Estabilización de bacterias probióticas

40 Concentrado fresco de *Lactobacillus rhamnosus*. (100 ml a 10 % de sólidos, directo de la cosecha de fermentación) se añadió en una licuadora y se mantuvo a 35 °C. Aproximadamente 78 g de mezcla de carbohidratos básicos y aproximadamente 22 g de la mezcla de potenciadores de vidrio básicos se añadieron lentamente al cultivo probiótico y se llevó a cabo la mezcla a 35 °C durante 10 minutos. Después, la suspensión viscosa se transfirió a un recipiente que tenía un fondo perforado y se dejó gotear en un baño que contenía nitrógeno líquido. Después, las perlas se retiraron del nitrógeno líquido y se transfirieron inmediatamente al secado.

45 Secado de las perlas congeladas que contienen bacterias probióticas

50 Las perlas congeladas se extendieron en una bandeja con una capacidad de carga de 2 kg/m² (200 g/pie cuadrado) y se colocaron inmediatamente en un estante en un liofilizador (modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Después, se ajustó el vacío entre 266,6-360,0 Pa (2000-2700 mTorr) y la temperatura en estante se elevó a +30 °C. Estos ajustes de temperatura y presión de vacío se mantuvieron durante 5 horas. Opcionalmente, la temperatura de las perlas congeladas se aclimató a aproximadamente -20 °C antes de iniciar el secado líquido primario mediante la aplicación de una presión de vacío a aproximadamente 133,3 Pa (1000 mTorr) y permitir que las perlas congeladas sólidas se purguen durante aproximadamente 10 minutos. La etapa de secado primario se siguió después de ajustar la presión de vacío entre 266,6 - 360,0 Pa (2000-2700 mTorr) y la temperatura en estante se elevó a +30 °C. Estos ajustes de temperatura y presión de vacío se mantuvieron durante 5 horas. Después se siguió una etapa de secado secundario a vacío completo (20,0-26,6 Pa, es decir, 150-200 mTorr) y la temperatura en estante se mantuvo entre 30 °C y 50 °C durante 3 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió mediante un instrumento Hygropalm Aw1 (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY) a Aw = 0,23.

55 Ejemplo de referencia 2

60 Estabilidad en almacenamiento de las bacterias probióticas secas

65 La Figura 1 muestra la estabilidad en almacenamiento bajo dos condiciones de almacenamiento acelerado diferentes de 40 °C y 33 % de HR y 30 °C y 43 % de HR de bacterias probióticas estables secas del Ejemplo de referencia 1 y bacterias probióticas secas disponibles comercialmente (Culturelle, Amerifit, Inc., Cromwell, CT). La bacteria probiótica comercial perdió completamente su viabilidad dentro de las primeras semanas bajo las condiciones de

almacenamiento acelerado, mientras que la composición seca de la bacteria probiótica de la presente descripción perdió solo 1,18 logaritmos después de 60 días a 30 °C y 43 % de HR y solo 1.09 logaritmos a 40 °C y 33 % de HR.

5 Ejemplo de referencia 3

Escalado de la producción de la composición seca estable que contiene bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus*

10 *Lactobacillus rhamnosus* (400 g de concentrado congelado de una fuente comercial) se descongeló a 37 °C en un mezclador planetario doble con camisa (DPM, 1 qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA) y el contenido de sólidos se ajustó al 10 % de peso de sólidos con agua destilada). Aproximadamente 212 g de trehalosa (Cargill Mineápolis, MN), aproximadamente 20 g de inulina instantánea (Cargill Mineápolis, MN), aproximadamente 12 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ), aproximadamente 136 g de hidrolizado de caseína (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ) y aproximadamente 20 g de ascorbato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) se mezclaron uniformemente en forma seca. La mezcla de polvos se añadió lentamente al cultivo probiótico y se llevó a cabo la mezcla a 40 RPM y 37 °C durante 10 minutos. Después, la suspensión se transfirió a un recipiente que tenía un fondo perforado y se dejó gotear en un baño que contenía nitrógeno líquido. Después, las perlas se retiraron del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C durante varias semanas.

20 Para el secado, las perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga que varía de 5 hasta 16 kg/m² (de 500 hasta 1500 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un secador por congelación (modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Se inició una etapa de secado líquido primaria mediante el ajuste de la presión de vacío entre 266,6-360,0 Pa (2000-2700 mTorr) y la temperatura del producto se elevó y estabilizó entre -10 y -5 °C. Con el tiempo (aproximadamente 10-16 h) la temperatura del producto aumentó a aproximadamente 20 a 25 °C, momento en el que se inició una etapa de secado secundaria al vacío máximo (20,0-26,6 Pa, es decir, 150-200 mTorr) y la temperatura del producto se mantuvo entre 30 a 40 °C durante 14 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió en 0,23 Aw.

30 Ejemplo de referencia 4

Escalado de la producción de la composición seca estable que contiene bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis*

35 *Bifidobacterium lactis* (400 g de concentrado congelado de una fuente comercial) se descongeló a 37 °C en un mezclador planetario doble con camisa (DPM, 1 qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). Aproximadamente 212 g de trehalosa (Cargill Mineápolis, MN), aproximadamente 20 g de inulina instantánea (Cargill Mineápolis, MN), aproximadamente 12 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) y aproximadamente 20 g de ascorbato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) se mezclaron uniformemente en forma seca. La mezcla de polvos se añadió lentamente al cultivo probiótico. Se disolvieron aproximadamente 136 g de hidrolizado de guisante (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ) en 80 g de agua destilada y la mezcla se calentó brevemente en un microondas o en un baño de agua a 60 °C hasta la disolución completa y después se enfrió hasta aproximadamente 35 °C. El polvo de mezcla seca y la solución que contenía hidrolizado de proteína de guisante se añadieron al concentrado probiótico y la mezcla se llevó a cabo a 40 RPM y 37 °C durante 20 minutos. Después, la suspensión se transfirió a un recipiente que tenía un fondo perforado y se dejó gotear en un baño que contenía nitrógeno líquido. Después, las perlas se retiraron del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C durante varias semanas.

40 Para el secado, las perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga de 9 kg/m² (800 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Se inició una etapa de secado líquido primaria mediante el ajuste de la presión de vacío entre 266,6 - 360,0 Pa (2000 - 2700 mTorr) y la temperatura del producto se elevó y estabilizó entre -10 y -5 °C. Con el tiempo (aproximadamente 10-16 h) la temperatura del producto aumentó a aproximadamente 20 a 25 °C, momento en el que se inició una etapa de secado secundaria a vacío máximo (20,0-26,6 Pa, es decir, 150-200 mTorr) y la temperatura del producto se mantuvo entre 30 a 40 °C durante 14 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió en 0,23 Aw.

45 Ejemplo de referencia 5

Preparación de una formulación de hidrogel que contiene bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis*

50 60 Se prepara una suspensión probiótica concentrada de *Bifidobacterium lactis* de acuerdo con la referencia

65 Ejemplo 1. A la formulación básica, se añade 0,5 g de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0,5 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante las siguientes 2 horas para formar un hidrogel sólido. El gel firme se corta en hilos delgados y largos, mediante el uso de un cortador/desmenuzador disponible comercialmente. Los hilos finos se cargan directamente en bandejas en forma húmeda o se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se cargan en una bandeja con una capacidad de carga de 5 kg/m² (500 g/pie

cuadrado) y se colocan en un secador por congelación para secarse como se describe en el Ejemplo de referencia 3. La actividad del agua (Aw) de la formulación es de 0.05 (medida por HygroPalm Aw1, Rotonic Huntington, NY). La formulación seca se tritura adicionalmente hasta obtener un polvo fino mediante el uso de equipos de molienda de martillo estándar y se tamiza a través de cribas de 50-250 micras.

5 Ejemplo de referencia 6

Optimización de la relación molar entre los potenciadores de vidrio y la mezcla de carbohidratos

10 Se prepararon varias composiciones que contenían varias proporciones molares de mezclas de potenciadores de vidrio y carbohidratos de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1. Una cultura concentrada de la bacteria probiótica *L. paracasei* se obtuvo de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en el Ejemplo de referencia 1 excepto que la suspensión se cargó inmediatamente en bandejas en forma húmeda sin etapas de congelación instantánea y purga. La suspensión se secó en las etapas primaria y secundaria como se describe en los Ejemplos de referencia 1 y 3 excepto que la temperatura en estante se elevó a 40 °C durante las etapas de secado primario y secundario. El polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento acelerado a 37 °C y 33 % de HR durante 84 días. La Figura 2 muestra el efecto de varias relaciones molares sobre la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugirieron que la relación molar óptima entre los potenciadores de vidrio y la mezcla de carbohidratos es de aproximadamente 0,12-0,15.

15 Ejemplo de referencia 7

Efecto de la composición de la presente invención sobre la estabilidad en almacenamiento de las bacterias probióticas *L. acidophilus*

20 Se preparó una composición que contenía una mezcla de carbohidratos y una mezcla de potenciadores de vidrio como se describe en el Ejemplo de referencia 1. Una cultura concentrada de la bacteria probiótica *L. acidophilus* se obtuvo de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en los Ejemplos de referencia 1 y 3 y el polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento acelerado a 24 °C y 33 % de HR durante 537 días. La Figura 3 demuestra la estabilidad superior del probiótico formulado como tal. Los resultados muestran que la viabilidad del probiótico se redujo en solo 0,18 log durante 537 días de almacenamiento en estante en las condiciones especificadas.

25 Ejemplo de referencia 8

30 Efecto de varios compuestos potenciadores de vidrio sobre la estabilidad en almacenamiento de las bacterias probióticas *L. acidophilus*

35 Se prepararon varias composiciones que contenían una mezcla de carbohidratos como se describe en el Ejemplo de referencia 1 y una mezcla de potenciadores de vidrio que contenía hidrolizado de caseína y citrato de sodio o ascorbato de sodio o una combinación de ambos. Una cultura concentrada de la bacteria probiótica *L. acidophilus* se obtuvo de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en el Ejemplo de referencia 1 excepto que la suspensión se cargó inmediatamente en bandejas en forma húmeda sin etapas de congelación instantánea y purga. La suspensión se secó en las etapas primaria y secundaria como se describe en los Ejemplos de referencia 1 y 3 y el polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento acelerado a 24 °C y 43 % de HR durante 180 días. La Figura 4 muestra el efecto de varios compuestos de mejora del vidrio sobre la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugirieron que se obtuvo una estabilidad significativamente mejor mediante la inclusión de un potenciador de vidrio adicional en la parte superior del hidrolizado de proteínas. En particular, la inclusión de cantidades iguales de acetato de sodio y ascorbato de sodio proporcionó la composición más estable. Los resultados de los Ejemplos de referencia 5 y 6 también sugirieron que varios potenciadores de vidrio pueden ser más eficaces o incluso pueden actuar como un desestabilizador en dependencia de la cepa bacteriana.

40 Ejemplo de referencia 9

45 Efecto de varias relaciones de hidrolizado de proteínas/azúcar sobre la estabilidad en almacenamiento de las bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis*

50 Se prepararon varias composiciones que contenían una mezcla de carbohidratos y potenciadores de vidrio como se describe en el Ejemplo de referencia 1 y composiciones que contenían cantidades iguales, pero en varias relaciones de hidrolizado de guisante/trehalosa con o sin ascorbato de sodio. Una cultura concentrada de la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis* se obtuvo de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en los Ejemplos de referencia 1 y 3 y el polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento acelerado a 35 °C y 43 % de HR durante 7 semanas. La Figura 5 muestra el efecto de las relaciones 1:4, 1:2,5 y 1:1,5 de hidrolizado de guisante/trehalosa con o sin ascorbato de sodio sobre la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugirieron que se obtuvo una estabilidad significativamente mejor a relaciones crecientes de hidrolizado de guisante/trehalosa. En particular, una relación de 1:1,5 de hidrolizado de guisante/trehalosa proporcionó una composición más estable.

La inclusión de ascorbato de sodio en una relación más alta de hidrolizado de guisante/trehalosa dio como resultado una estabilidad superior en comparación con las formulaciones excluidas de ascorbato de sodio.

5 Ejemplo de referencia 10

Optimización del pH para la máxima estabilidad del probiótico *L. rhamnosus*

10 Se prepararon varias composiciones que contenían una mezcla de carbohidratos y potenciadores de vidrio como se describe en el Ejemplo de referencia 1 a diferentes pH. Una cultura concentrada de la bacteria probiótica *L. rhamnosus* se obtuvo de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en los Ejemplos de referencia 1 y 3. El polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento acelerado a 40 °C y 33 % de HR durante 8 semanas. La Figura 6 muestra el efecto del pH de la suspensión sobre la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugirieron que se logró una estabilidad óptima a pH neutro (~7).

15 Ejemplo de referencia 11

Polvo seco estable que contiene una enzima

20 Una fórmula de hidrogel que contiene 40 por ciento en peso de fitasa (BASF, GmBH) se prepara mediante la mezcla de 400 g de la mezcla de carbohidratos y 200 g de la mezcla de potenciadores de vidrio como se describe en los Ejemplos de referencia 1 y 4 y 400 g de fitasa en 1.000 ml de agua. La formulación de hidrogeles triturados se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se seca en un horno de vacío a una temperatura de secado primario y secundario de 50 °C. Para determinar la carga y la estabilidad en almacenamiento de la fórmula seca: una muestra seca se pesa con precisión (<100 mg) en un tubo de microcentrífuga. Se añade una porción de 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). La formulación se disuelve en el tampón de DMSO mediante agitación. A esta muestra se le añade 0,8 ml de una solución que contiene NaOH 0,05 N, SDS al 0,5 % y ácido cítrico (sal de trisodio) 0,075 M. Los tubos se someten a ultrasonidos durante 10 min a 45 °C, seguido de una breve centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. Se toman alícuotas de la solución de DMSO/NaOH/SDS/citrato transparente en pocillos de una microplaca y se analizan para determinar el contenido de proteínas mediante el uso del método de ensayo de Bradford. La estabilidad de la composición seca enzimática estable después de la exposición a 95 °C durante 20 min es significativamente mayor que la de una enzima seca sin la composición de la presente descripción.

25 Ejemplo de referencia 12

30 Vacuna estable en polvo seco que contiene un virus de la anemia infecciosa de salmón (ISAV)

35 La suspensión concentrada de la vacuna de ISAV (Novozyme, Dinamarca) se prepara de acuerdo con el Ejemplo de referencia 4 excepto que se añadió 20 ml de solución de quitosano al 4 % en ácido acético al 0,5 % a la suspensión que contenía el concentrado de la vacuna de ISAV, la mezcla de carbohidratos y los potenciadores de vidrio. Se añadió 40 0,5 g de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0,5 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante las siguientes 2 horas para formar un hidrogel sólido. El gel firme se corta en hilos delgados y largos, mediante el uso de un cortador/desmenuzador disponible comercialmente. Los hilos finos se cargan directamente en bandejas en forma húmeda o se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se cargan en una bandeja con una capacidad de carga de 16 kg/m² (1500 g/pie cuadrado) y se colocan en un secador por congelación para secarse como se describe en el Ejemplo de referencia 3. La actividad del agua (Aw) de la formulación es 0,25. La formulación seca se tritura adicionalmente hasta obtener un polvo fino mediante el uso de equipos de molienda de martillo estándar y se tamiza a través de cribas de 50-150 micras. La composición de ISAV seca estable se usa para la vacunación oral mediante el recubrimiento superior de un alimento comercial con la composición seca y la alimentación a los peces de salmón del Atlántico.

45 50 Ejemplo de referencia 13

Preparación de cebos para especies invasoras

55 El cebo en gránulos para especies invasoras dirigidas específicamente de acuerdo con la presente descripción se prepara que contiene un pesticida. Se prepara 200 g de una formulación como se describe en el Ejemplo de referencia 9 y se añade a 200 g de agua. A esta solución se le añaden 90 gm de rotenona y 0,5 gm de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0,5 gm de gluconolactona. La suspensión se seca inmediatamente por pulverización en un secador por pulverización industrial estándar, y la formulación seca se usa para dirigirse a especies invasoras específicas sin el efecto perjudicial de la toxina en el medio ambiente o ecosistemas cercanos.

60 Ejemplo de referencia 14

Preparación de una formulación probiótica de plantas protegidas

65

Un agente de control biológico tal como *Rhizobacteria* se prepara en composición seca de acuerdo con el Ejemplo de referencia 4. La eficacia de la composición seca de *Rhizobacteria* se evalúa en el crecimiento de lechuga en condiciones gnotobióticas. Se inoculan dosis de 100 mg de composición seca de *Rhizobacteria* por planta en frascos con arena y se siembran plántulas de lechuga pregerminadas (24 h). Se aplica una dosis de nutrientes de 5 ml de solución de Hoagland esterilizada a las plantas en el frasco. Los frascos se disponen aleatoriamente en la cámara de crecimiento mantenida a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h. Durante cada intervalo de 7 días después de la inoculación, las plantas y la arena adherida se retiran cuidadosamente de los frascos. Las raíces se lavan en tampón de fosfato estéril (pH 7,0) y se registra la medición de la longitud de la raíz.

5 10 Ejemplo de referencia 15

Preparación de sustancia probiótica seca y estable

15 15 Formulación básica

Una porción de 75 g de trehalosa (Cargill Mineápolis, MN) y 22 g de caseína extensamente hidrolizada (Marcor, Carlstadt, NJ) se mezclaron uniformemente con 3 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) en forma seca. Concentrado fresco de *Lactobacillus acidophilus* (100 ml que contenía al menos 10 % de sólidos, directamente de la cosecha de fermentación) se añadió en una licuadora y se mantuvo a 35 °C. La mezcla seca de goma, azúcar y proteína hidrolizada se añadió lentamente al cultivo probiótico y se llevó a cabo la mezcla a 35 °C durante 10 minutos. Despues, la suspensión viscosa se transfirió a un recipiente que tenía un fondo perforado y se dejó gotear en un baño que contenía nitrógeno. Despues, las perlas se retiraron del nitrógeno líquido y se transfirieron inmediatamente al secado.

20 25 Secado de las perlas congeladas de la formulación básica

25 30 Las perlas congeladas se extendieron uniformemente en una bandeja con una capacidad de carga de 1 kg/m² (100 g/pie cuadrado) y se colocaron inmediatamente en un estante en un liofilizador (modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Despues, se aplicó presión de vacío a 133,3 Pa (1000 mTorr) y las perlas sólidas congeladas se dejaron purgar durante 10 minutos. Despues, se ajustó el vacío a 360,0 Pa (2700 mTorr) y la temperatura en estante se elevó a +30 °C. Estas temperaturas y presión de vacío se mantuvieron durante 3 horas. Despues se siguió una etapa de secado secundario a vacío completo (20,0-26,6 Pa, es decir, 150-200 mTorr) y la temperatura en estante se elevó a 30 °C durante 2 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió mediante un instrumento Hygropalm Aw1 (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY) a Aw = 0,23.

35 35 Ejemplo de referencia 16

Composición seca estable que contiene bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* LGG

40 45 *Lactobacillus rhamnosus* LGG (500 g de concentrado congelado de una fuente comercial) se descongeló a 37 °C en un mezclador planetario doble con camisa (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). Dos agentes formadores de vidrio; trehalosa (387 g, Cargill Mineápolis, MN) y caseína extensamente hidrolizada (83 g, Marcor, Carlstadt, NJ) se mezclaron homogéneamente en forma seca con dos agentes formadores de matriz; alginato de sodio (15 g, ISP Corp., Wayne, NJ) e inulina instantánea (25 g, Cargill Mineápolis, MN). La mezcla seca se añadió lentamente a las bacterias probióticas descongeladas y se llevó a cabo la mezcla a 40 RPM y 37 °C durante 10 minutos. La viscosidad de la suspensión se ajustó a 12 000 mPas (12 000 cP) mediante la adición de 50-200 ml de agua. Despues, la suspensión se transfirió a un recipiente que tenía un fondo perforado y se dejó gotear en un recipiente que contenía nitrógeno líquido. Despues, las perlas se retiraron del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C durante varias semanas.

50 55 Para el secado, las perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga que varía de 1 hasta 5 kg/m² (de 100 hasta 500 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un secador por congelación (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Se aplicó presión de vacío a 133,3 Pa (1000 mTorr) y la temperatura en estante se ajustó a +20 °C. Las perlas congeladas sólidas se dejaron purgar durante un período de tiempo que varía de 1 a 30 minutos. La etapa de purgado se siguió de una etapa de secado primario después de ajustar la presión de vacío a 360,0 Pa (2700 mTorr) y la temperatura en estante se elevó a +30 °C. Estas temperaturas y presión de vacío se mantuvieron durante 12 horas. Despues se siguió una etapa de secado secundario a vacío completo (20,0-26,6 Pa, es decir, 150-200 mTorr) y la temperatura en estante se mantuvo a 30 °C durante 4 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió en 0,23 Aw. La Figura 13 muestra el perfil de secado de la formulación probiótica.

60 65 Las pérdidas de viabilidad después de congelar la suspensión a diferentes temperaturas (+4 °C, -80 °C y -180 °C) y después del proceso de secado que incluye la preparación de perlas congeladas y el secado en un liofilizador se presentan en las Figuras 10, 11 y 14. Las pérdidas de viabilidad para todo el proceso fueron generalmente menores de <1 log en dependencia del tipo de cultivo bacteriano (cultivos congelados o secos) y de la temperatura de

congelación de la suspensión viscosa. Los resultados muestran que la congelación instantánea de las bacterias probióticas en nitrógeno líquido (-180 °C) fue un proceso menos dañino que la congelación a -80 °C.

5 Las Figuras 12 y 15 muestran el efecto de varios períodos de tiempo de purga que varían de 0 min (sin purga) a 30 min en los recuentos iniciales de bacterias probióticas en la composición seca y en la estabilidad en almacenamiento en condiciones de almacenamiento acelerado de 40 °C y 33 % de HR. Los resultados sugieren que un tiempo de purga más largo generalmente mejora el recuento inicial bacteriano en la formulación seca pero no tuvo efecto sobre la estabilidad en almacenamiento de la formulación probiótica.

10 Ejemplo de referencia 17

La trehalosa (752 g, Cargill Mineápolis, MN), proteína de guisante extensamente hidrolizada (167 g, Marcor, Carlstadt, NJ), alginato de sodio (30 g, ISP Corp., Wayne, NJ) e inulina instantánea 50 g, Cargill Mineápolis, MN) se mezclaron homogéneamente en forma seca. La mezcla seca se añadió lentamente a 1000 ml de agua desionizada caliente a 80 °C en un mezclador planetario doble con camisa (DPM, 1 qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA) y se realizó la mezcla a 40 RPM durante 10 minutos. La temperatura de la mezcla se redujo a 37 °C y 100 g de polvo seco de *Lactobacillus rhamnosus* Se añadió lentamente LGG obtenido de una fuente comercial y se continuó la mezcla durante 20 minutos. Después, la suspensión se extruyó a través de una aguja de orificio de 2 mm en un baño que contenía nitrógeno líquido. Después, las /hebras/bolas se retiraron del nitrógeno líquido colocado en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C durante varias semanas. Para el secado, las cuerdas/perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga que varía de 1 a 5 kg/m² (de 100 a 500 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) y se secaron como se describe en el Ejemplo de referencia 16. Todas las formulaciones se retuvieron con satisfacción dentro de la bandeja y no se observó salpicaduras ni formación de espuma en todos los niveles de carga. La formulación se secó completamente incluso en la mayor capacidad de carga y la actividad del agua medida en 0,26 Aw y menor para todas las muestras.

Ejemplo de referencia 18

30 Preparación de una formulación de hidrogel que contiene bacterias probióticas *Bifidobacterium* sp.

Se prepara una suspensión probiótica concentrada de *Bifidobacterium* sp. de acuerdo con el Ejemplo de referencia 15. A la formulación básica, se añade 0,5 g de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0,5 g de gluconolactona. La suspensión se dejó endurecer a temperatura ambiente durante las siguientes 2 horas para formar un hidrogel sólido. 35 El gel firme se cortó en hilos delgados y largos, mediante el uso de un cortador/desmenuzador disponible comercialmente. Los hilos finos se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se cargan en una bandeja con una capacidad de carga de 7 kg/m² (700 g/pie cuadrado) y se colocan en un secador por congelación para secarlos como se describe en el Ejemplo de referencia 16. La actividad del agua (Aw) de la formulación fue de 0,05 (medida por HygroPalm Aw1, Rotonic Huntington, NY). La formulación seca se trituró además hasta convertirla en un polvo fino mediante el uso de un equipo de molienda de martillo estándar y se tamizó a través de cribas de 50-250 micras.

40 Ejemplo de referencia 19

45 Composición libre de alérgenos que contiene bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus*

La trehalosa (752 g, Cargill Mineápolis, MN), proteína de guisante extensamente hidrolizada (167 g, Marcor, Carlstadt, NJ), alginato de sodio (30 g, ISP Corp., Wayne, NJ) e inulina instantánea 50 g, Cargill Mineápolis, MN) se mezclaron homogéneamente en forma seca. La mezcla seca se esterilizó mediante la adición lenta a 1000 ml de agua desionizada caliente a 80 °C en un mezclador planetario doble con camisa (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA) y la mezcla se llevó a cabo a 40 RPM durante 10 minutos hasta que se formó una suspensión suave y transparente. La temperatura de la mezcla se redujo a 37 °C y 1000 g de perlas congeladas que contenían *Lactobacillus acidophilus* se obtuvo de una fuente comercial se añadió lentamente y se continuó la mezcla durante 10 minutos. Después, la suspensión se extruyó a través de una aguja de orificio de 2 mm en un baño que contenía nitrógeno líquido. Después, las /hebras/bolas se retiraron del nitrógeno líquido colocado en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C durante varias semanas. Para el secado, las hebras/perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga de 11 kg/m² (1000 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) y se secaron como se describe en el Ejemplo de referencia 16. El recuento inicial de UFC de las bacterias probióticas en la composición seca fue de 10,53 log/g, y la pérdida de viabilidad después de 42 días de almacenamiento en condiciones de almacenamiento acelerado de 40 °C y 33 % de HR fue de 0,69 log UFC/g.

60 Ejemplo de referencia 20

65 Fórmula infantil que contiene la formulación seca de la presente invención

Una formulación seca estable que contiene *Lactobacillus rhamnosus* se preparó de acuerdo con el Ejemplo de referencia 16 seguido de tamizado en dos grupos de tamaño de partículas (por encima de 50 µm y por debajo de 150 µm). Se preparó una fórmula infantil mediante la mezcla de 99,9 g de Nutramigen (Mead Johnson; Evansville, IL) con 0,1 g de las partículas de la formulación seca en el intervalo de tamaño entre 50 µm y 150 µm). El producto final contiene aproximadamente 10⁸ ufc de *Lactobacillus rhamnosus* por 100 g de fórmula infantil.

5 Ejemplo 21

10 Suplemento probiótico que contiene la formulación seca estable de la descripción

15 Una composición seca estable que contiene *Lactobacillus acidophilus* se formula en formas de dosificación orales, tales como tabletas, comprimidos o cápsulas. Se preparan comprimidos sabor naranja que contienen 99,9 g de un agente de compresión (dextrosa) y 0,1 g de las partículas de formulación seca en el intervalo de tamaño entre 50 µm y 150 µm mediante compresión directa en una máquina giratoria mediante el uso de una herramienta cóncava estándar redonda de 12,7 mm (1/2"). El producto final contiene aproximadamente 10⁸ ufc/unidad de dosis. La dureza de los comprimidos está en el intervalo de 8-10 kp y el tiempo de desintegración es de aproximadamente 20 segundos. Los comprimidos por compresión se empaquetan en botellas de HDPE de 180 cc de 100 comprimidos cada una y se exponen a temperatura/humedad controlada de 40 °C/33 % de HR. El producto se somete a pruebas mensuales de estabilidad microbiológica durante un período de 12 meses o hasta que se observa una reducción en el recuento del ensayo por debajo de 1 x 10⁶/ unidad de dosis.

20 Ejemplo de referencia 22

25 Una bebida funcional que contiene una formulación seca estable.

30 Una mezcla seca que contiene (% en peso) 71 % de sacarosa, 14 % de maltodextrina, 10 % de inulina, 2 % de dextrosa, 1 % de ácido cítrico anhídrico, 0,3 % de goma acacia, 0,3 % de sabores, 0,3 % de fosfato de tricalcico y 0,1 % de partículas de formulación probiótica seca (*L. acidophilus*) en el intervalo de tamaño entre 50 µm y 250 µm se prepara. El producto final contiene aproximadamente 10⁹ ufc/dosis unitaria (30 g de mezcla seca). El producto se empaqueta en pequeñas bolsas de papel de aluminio (unidad de 30 g/dosis/saco) para beber al agitar en 340 ml de agua. La estabilidad de las bacterias probióticas en la mezcla seca de la bebida se somete a pruebas de estabilidad microbiológica mensuales durante un período de 12 meses o hasta que se produzca una reducción en el recuento del ensayo por debajo de 1 x 10⁷/ unidad de dosis se observa.

35 Ejemplo de referencia 23

Preparación de alimentos probióticos para mascotas

40 Un alimento para mascotas en forma de gránulos disponible comercialmente para perros se seca en un horno de convección hasta una actividad del agua de 0,1, y después se recubre con la formulación seca probiótica estable preparada como se describe en el Ejemplo de referencia 17. Los gránulos secos se rocían con aproximadamente 5 % de barrera de humedad a base de grasa (una mezcla de 40 % de grasa de pollo, 40 % de manteca de cacao y 20 % de cera de abejas), mezclados en un tambor giratorio con la formulación de polvo seco (generalmente 0,1-0,5 % del total de alimentos para mascotas que proporciona una dosis de 10⁸ UFC/g), y finalmente se rocían con una capa adicional de la barrera de humedad a base de grasa. La cantidad total de recubrimiento es de aproximadamente 15 % (de la comida para mascotas). El tiempo de recubrimiento es de aproximadamente 30 min.

45 Ejemplo de referencia 24

50 Preparación de pienso para peces con varios microorganismos probióticos

55 El pienso en forma de gránulos para peces se prepara con una mezcla de varios probióticos. Una formulación probiótica seca estable que contiene una mezcla de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* se prepara como se describe en el Ejemplo de referencia 15. Un pienso iniciador disponible comercialmente para salmón (Zeigler Bros., Gardners, PA) se seca primero en un horno de convección hasta una actividad del agua de 0,1 y después se recubre con la formulación de probióticos en un tambor giratorio. Los gránulos (1000 g) se rocían primero con aproximadamente 5 % en peso de barrera de humedad a base de grasa (una mezcla de 40 % de aceite de pescado, 40 % de manteca de cacao y 20 % de cera de abejas), después se mezclan con 1 g de la formulación probiótica seca estable (para alcanzar una dosis de 10⁷ ufc/g de pienso), y finalmente se rocío con una capa adicional de la barrera de humedad a base de grasa. La cantidad total de recubrimiento es de aproximadamente 10 % (del pienso para peces).

60 Ejemplo de referencia 25

65 Polvo seco estable que contiene una enzima

Una fórmula de hidrogel que contiene 40 por ciento en peso de Savinase (Novozymes, Dinamarca) se prepara mediante la mezcla de 600 g de la formulación descrita en el Ejemplo de referencia 18 y 400 g de savinase en 1000 g de solución de agua. La formulación de hidrogeles triturados se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se seca en un horno de vacío a una temperatura de secado de formulación de 50 °C. Para determinar la estabilidad de carga y en almacenamiento de la fórmula seca: una muestra seca se pesa con precisión (<100 mg) en un tubo de microcentrífuga. Se añaden 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). La formulación se disuelve en el tampón de DMSO mediante agitación. A esta muestra se le añade 0,8 ml de una solución que contiene NaOH 0,05 N, SDS al 0,5 % y ácido cítrico (sal de trisodio) 0,075 M. Los tubos se someten a ultrasonidos durante 10 min a 45 °C, seguido de una breve centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. Se toman alícuotas de la solución de DMSO/NaOH/SDS/citrato transparente en pocillos de una microplaca y se analizan para determinar el contenido de proteínas mediante el uso del método de ensayo de Bradford. La estabilidad en almacenamiento de la formulación enzimática estable es significativamente mayor que la de una enzima seca sin esta formulación.

5 Ejemplo de referencia 26

10 Polvo seco estable que contiene vitamina A

Una formulación que contiene 30 por ciento en peso de vitamina A se prepara mediante la mezcla de 320 g de inulina instantánea, 320 g de maltodextrina DE-1 (Tate&Lyle, Londres, Reino Unido), 50 g de carboximetilcelulosa de sodio (Ashland Aqualon Functional Ingredients, Wilmington, DE), 10 g de ascorbato de sodio y 300 g de vitamina A cristalina (BASF Corp., Florham Park, NJ) en 1000 g de agua. La formulación húmeda se seca por pulverización en un secador por pulverización Mobile-Minor (GEA Process Engineering Inc., Columbia MD) a una temperatura de entrada y salida de 180 °C y 80 °C, respectivamente o se congela instantáneamente en nitrógeno líquido, después se extiende en bandejas a una capacidad de carga de 11 kg/m² (1000 g/pie cuadrado) y se seca como se describe en el Ejemplo de referencia 16. La composición de vitamina A es estable (>80 %) a 40 °C y 75 % de HR durante 3 meses.

15 Ejemplo de referencia 27

20 Preparación de carotenoides en una formulación protegida que tiene una biodisponibilidad mejorada

25 Se prepara una formulación que protege y mejora la biodisponibilidad de los carotenos que de otro modo estarían sujetos a la oxidación por otros ingredientes en un alimento durante el almacenamiento o después de alimentar a un organismo. Una formulación que contiene 6 g de quitosano soluble en agua (LSK BioPartners, Inc. Salt Lake City, Utah) se disuelve en 200 g de agua. A esta solución se le añaden 90 g de astaxantina natural (Naturose™, Cyanotech Corp., Kailua-Kona, HI) y la suspensión se atomiza o se extruye en un baño que contiene 5 % de tripolifosfato de sodio. Las micropartículas o hebras de hidrogeles se dejan endurecer a temperatura ambiente durante 4 horas. Las partículas se retiran del baño de reticulación, se lavan con agua y se mezclan con una mezcla seca de 90 g de sacarosa y 10 g de caseína extensamente hidrolizada. Las partículas cargadas de azúcar/proteína se congelan instantáneamente y se colocan inmediatamente en bandejas a 5 kg/m² (500 g/pie cuadrado) y se liofilizan en un secador por congelación hasta que la actividad del agua se reduce a menos de 0,3. La formulación seca se muele además al tamaño de distribución deseado y se empaqueta.

30 Ejemplo de referencia 28

35 40 45 Preparación de cebos para especies invasoras

50 Se prepara cebo en gránulos para especies invasoras dirigidas específicamente. Se prepara 200 g de una formulación que contiene un pesticida como se describe en el Ejemplo de referencia 1 y se añade a 200 g de agua. A esta solución se le añaden 90 gm de rotenona y 0,5 gm de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0,5 gm de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante 2 horas. El gel firme se corta en hilos delgados y largos a través de un cortador/desmenuzador. Los hilos finos se cargan en una bandeja y se colocan en un secador por congelación. La temperatura en estante se establece a -30 °C y la formulación se deja congelar antes de aplicar el vacío completo y la temperatura en estante se eleva a +60 °C para el secado durante la noche. La formulación seca se tritura hasta la distribución de tamaño apropiada para la especificación de tamaño de cebo para la especie específica que se busca.

55 Ejemplo de referencia 29

60 65 Preparación de un pesticida protegido en una formulación insoluble en agua

60 Se prepara una formulación granular protegida de un pesticida que de otro modo estaría sujeta a la descomposición por otros ingredientes en una formulación durante el almacenamiento o después de la aplicación en el medio ambiente. Se añade una formulación que contiene 6 g de pectina y 102 g de sacarosa a 200 g de agua. A esta solución se le añade 90 g de una formulación seca de un pesticida sensible y una mezcla que contiene 1,5 g de fosfato de calcio dibásico y 0,5 g de cloruro de calcio, seguido de 0,85 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante 4 horas y después se corta en hilos finos y largos a través de una

5 cortadora/desmenuzadora. Los hilos finos se cargan en bandejas y se secan en un secador por congelación para alcanzar una actividad del agua de 0,1. La formulación seca se muele además al tamaño de distribución deseado y se empaqueta.

5 Ejemplo de referencia 30

Preparación de una formulación probiótica de plantas protegidas

10 Un agente de control biológico tal como *Rhizobacteria* se prepara en composición seca de acuerdo con el Ejemplo de referencia 18. La eficacia de la composición seca de *Rhizobacteria* se evalúa en el crecimiento de lechuga en condiciones gnotobióticas. Se inoculan dosis de 100 mg de composición seca de *Rhizobacteria* por planta en frascos con arena y se siembran plántulas de lechuga pregerminadas (24 h). Se aplica una dosis de nutrientes de 5 ml de solución de Hoagland esterilizada a las plantas en el frasco. Los frascos se disponen aleatoriamente en la cámara de crecimiento mantenida a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h. Durante cada intervalo de 7 días después de la inoculación, 15 las plantas y la arena adherida se retiran cuidadosamente de los frascos. Las raíces se lavan en tampón de fosfato estéril (pH 7,0) y se registra la medición de la longitud de la raíz.

Ejemplo de referencia 31

20 Producción de composición seca estable que contiene bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (DSM-20356)

25 El concentrado bacteriano congelado (10 g obtenidos de un proceso de fermentación local) se descongeló a 37 °C en un baño de agua y el contenido de sólidos se ajustó al 10 % de sólidos en peso húmedo con agua destilada. Aproximadamente 5 g de proteína de guisante hidrolizada (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ) se disuelven completamente en 50 g de agua tibia y se añaden a la cultura bacteriana descongelada. Aproximadamente 2,5 g de trehalosa (Cargill Mineápolis, MN), aproximadamente 5 g de inulina instantánea, aproximadamente 5 g de maltodextrina DE-1 (Cargill Mineápolis, MN) y aproximadamente 1,5 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) se mezclaron uniformemente en forma seca. La mezcla de polvos se añadió lentamente al cultivo bacteriano y se llevó a cabo la mezcla mediante el uso de una espátula pequeña a 37 °C durante 20 minutos. Después, la suspensión se dejó gotear en un baño que contenía nitrógeno líquido. Después, las perlas se retiraron del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C hasta que se secaron.

30 Para el secado, las perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga que varía de 5 hasta 16 kg/m² (de 500 hasta 1500 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un secador por congelación (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Se inició una etapa de secado líquido primaria mediante el ajuste de la presión de vacío entre 266,6-360,0 Pa (2000-2700 mTorr) y la temperatura del producto se elevó y estabilizó entre -10 -5 °C. Con el tiempo (aproximadamente 10-16 h) la temperatura del producto aumentó a aproximadamente 20-25 °C, momento en el que se inició una etapa de secado secundaria al vacío máximo (20,0-26,6 Pa, es decir, 150-200 mTorr) y la temperatura del producto se mantuvo entre 30-40 °C durante 14 horas adicionales. 40 La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió por debajo de 0,3 Aw. La formulación se trituró mediante el uso de un molino de martillos disponible comercialmente y las partículas se tamizaron por debajo de 100 micras.

45 La viabilidad de las bacterias probióticas estables junto con un polvo liofilizado comúnmente de la bacteria se monitoreó semanalmente siguiendo los procedimientos estándar de dilución y siembra en placas de agar LMRS. La Figura 16 muestra que después de 14 días a 40° RH, la estabilidad de las bacterias probióticas como se formuló fue de dos (2) logaritmos mayores que la estabilidad de las bacterias secas al aire comúnmente. Estos resultados demuestran que la estabilidad de las bacterias probióticas mejora drásticamente en condiciones de almacenamiento de alta humedad y no refrigeradas cuando se usan las composiciones y métodos como tales.

50 Ejemplo de referencia 32

55 Producción de composición aglomerada de grasas fundidas secas estables que contienen bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (DSM-20356)

60 Se produjeron diez (10) g de composición en polvo seco como se describe en el Ejemplo de referencia 31. El polvo seco se colocó en un vaso de precipitados en un baño de agua a 40 °C. Se añadieron lentamente 10 g de mezcla de grasas fundidas que contenía ocho (8) porciones de manteca de cacao y dos (2) porciones de estearato (27-estearina, Loders Croklaan, Channahon, IL) al polvo tibio bajo agitación. La mezcla se enfrió hasta 10 °C mientras se continuaba la mezcla hasta que se logró un tamaño visualmente uniforme de polvo aglomerado.

Ejemplo de referencia 33

65 Estabilidad en almacenamiento en estante a 40 °C y 43 % de HR o 30 °C y 60 % de HR de una composición seca que contiene bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* sp.

Diez (10) g de una composición en polvo seco que contiene la *Lactobacillus rhamnosus* sp. (obtenida de una fuente de fermentación local) se produjo como se describe en el Ejemplo de referencia 31. La composición estable en seco se colocó en un desecador y se expuso a 40 °C y 43 % de HR o 30 °C y 60 % de HR. La viabilidad del probiótico estable junto con un polvo liofilizado comúnmente de la bacteria se monitoreó semanalmente siguiendo los procedimientos estándar de dilución y siembra en placas de agar LMRS. La Figura 17 muestra que después de 14 días a 40 °C y 43 % de HR, la estabilidad de las bacterias probióticas que se formularon en la composición de la presente invención fue tres (3) logaritmos mayores que la estabilidad de las bacterias secas al aire. Después de 7 días a 30 °C y 60 % de HR, la estabilidad de las bacterias probióticas que se formularon también fue tres (3) logaritmos mayores que la estabilidad de las bacterias secadas por congelación comúnmente. Estos resultados demuestran que la estabilidad de las bacterias probióticas mejora drásticamente en condiciones de almacenamiento no refrigerado de alta humedad cuando se usan las composiciones y métodos como tales.

Ejemplo de referencia 34

Producción de pienso para animales que contiene una composición seca estable que contiene bacterias probióticas contra microorganismos patógenos

Aproximadamente 10 kg de pienso para animales disponible comercialmente para novillos o pollos se recubren en la parte superior en un tambor giratorio con una mezcla de aceite al 3 % que contiene una porción del material biológico molido como se describe en el Ejemplo de referencia 31 o 32 y dos (2) porciones de aceite de plantas tal como aceite de maíz. El recuento de UFC de las bacterias probióticas es de 1E9/g de pienso. El pienso recubierto se coloca en una cámara de humedad relativa del 43 % a 40 °C y después de 14 días de almacenamiento en estas condiciones extremas; la pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas es menor que una (1) unidad logarítmica de las UFC iniciales. Otro pienso recubierto se coloca en una cámara de humedad relativa del 33 % a 30 °C y después de seis (6) meses de almacenamiento en estas condiciones; la pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas es menor que una (1) unidad logarítmica de las UFC iniciales. Estos ejemplos demuestran que los microorganismos, tales como *Lactobacillus* sp., se usa para tratar varios animales, incluidos los animales de compañía, puede conservarse en la composición y los métodos de secado como tal y luego recubrirse en los piensos para el almacenamiento a largo plazo en estantería o durante al menos dos (2) semanas en un comedero de alimentación en condiciones típicas de humedad y temperatura en las que se almacena el pienso no recubierto.

Ejemplo de referencia 35

Producción de una composición seca estable que contiene hongos unicelulares *S. cerevisiae*

La pasta de levadura fresca de panadería (100 g obtenida de un distribuidor local) se coloca en un baño de agua a 10 °C. Aproximadamente 50 g de proteína de guisante hidrolizada (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ) se disuelven completamente en 500 g de agua tibia. La solución se enfria a 10 °C y se añade a la pasta de levadura mientras se mezcla. Aproximadamente 25 g de sacarosa (obtenida de una tienda de comestibles local), aproximadamente 50 g de inulina instantánea, aproximadamente 50 g de maltodextrina DE-1 (Cargill Mineápolis, MN), aproximadamente 12 g de ascorbato de sodio (Sigma) y aproximadamente 15 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) se mezclan uniformemente en forma seca. La mezcla de polvos se añade lentamente al cultivo de levadura y la mezcla se lleva a cabo a 40 RPM y 10 °C durante 20 minutos. Después, la suspensión se transfiere a un recipiente que tiene un fondo perforado y se deja gotear en un baño que contiene nitrógeno líquido. Las perlas se retiran después del nitrógeno líquido, se colocan en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenan en un congelador profundo a -80 °C durante varias semanas. El secado y la molienda se llevan a cabo como se describe en el Ejemplo de referencia 31.

Ejemplo de referencia 36

Secado por pulverización de la composición seca estable que contiene hongos unicelulares *S. cerevisiae*

La suspensión de levadura se prepara como se describe en el Ejemplo de referencia 34. La suspensión se diluye además con agua destilada fría (10 °C) para obtener una viscosidad de aproximadamente 1000 - 2000 mPas (1000-2000 cP). La suspensión diluida se seca por pulverización (secador por pulverización móvil Minor, GEA Niro Inc., Columbia, MD), mediante el uso de una configuración de temperatura de entrada/salida de 180 °C/60 °C.

Ejemplo de referencia 37

Recubrimiento de semillas de maíz con composición seca estable que contiene hongos unicelulares

Aproximadamente 10 kg de semillas de maíz disponibles comercialmente se recubren en la parte superior a 40 °C en un tambor giratorio con una mezcla de aceite fundido al 3 % que contiene una porción del material biológico molido como se describe en los Ejemplos de referencia 34 o 35 y dos (2) porciones de aceite de plantas tal como aceite de palma o de coco. El recuento de UFC de levadura es de 1E8/g de semilla. Las semillas recubiertas se colocan en una cámara de humedad relativa del 60 % a 30 °C y después de tres (3) meses de almacenamiento en estas condiciones

extremas, la pérdida de viabilidad de la levadura es menor que una (1) unidad logarítmica de las UFC iniciales. Este ejemplo demuestra que los microorganismos usados como inoculantes agrícolas tales como varias cepas de *Penicillium* sp. puede preservarse en la composición y los métodos de secado como tal y después recubrirse en granos para el almacenamiento a largo plazo en condiciones típicas de humedad y temperatura en las que se almacenan las semillas no recubiertas.

5 Ejemplo de referencia 38

10 Preparación de una composición de hidrogel que contiene bacterias probióticas *Bifidobacterium* sp.

15 Se prepara una suspensión probiótica concentrada de *Bifidobacterium* sp. de acuerdo con el Ejemplo de referencia 31. A la mezcla de polvos, se añaden 5 g de fosfato de calcio dibásico. La mezcla de polvos se añade al cultivo probiótico bajo agitación seguido de 5 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante las siguientes dos (2) horas para formar un hidrogel sólido. El gel firme se corta en hilos delgados y largos, mediante el uso de un cortador/desmenuzador disponible comercialmente. Los hilos finos se cargan directamente en bandejas en forma húmeda o se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se cargan en una bandeja con una capacidad de carga de 500 g/pie cuadrado y se colocan en un secador por congelación para secarlos como se describe en el Ejemplo de referencia 31. La formulación seca se tritura hasta obtener un polvo fino mediante el uso de un equipo de molienda de martillo estándar y se tamiza a través de una criba de 50 micras.

20 Ejemplo de referencia 39

25 Producción de leche cultivada estable que contiene bacterias probióticas

30 Se añadió leche pasteurizada de cultivo natural de cien (100) gramos (Dannon, obtenida de una tienda de comestibles local) con medio (0,5) gramo de polvo reticulado que contiene probiótico estable como se describe en el Ejemplo de referencia 37. El recuento inicial de UFC en la leche de cultivo es de 1E9/g de leche de cultivo. La leche cultivada se almacena en un refrigerador a 4 °C durante seis (6) semanas. La pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas en la leche de cultivo refrigerada es menor que un (1) log de las UFC iniciales. Este ejemplo demuestra que las bacterias probióticas tales como varias cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* puede conservarse en la composición y los métodos de secado como tal. Después, las bacterias probióticas en las composiciones pueden hidratarse completamente y permanecer activas en productos lácteos durante un período de tiempo prolongado en condiciones típicas en las que las bacterias probióticas no conservadas no sobrevivirán.

35 Ejemplo de referencia 40

40 Composición seca estable que contiene una enzima

45 Una fórmula de hidrogel que contiene 40 por ciento en peso de fitasa (Marcor, Carlstadt, NJ) se prepara mediante la mezcla de 250 g de la mezcla en polvo como se describe en el Ejemplo de referencia 34 y 200 g de fitasa en 500 ml de solución de agua que contiene aproximadamente 50 g de proteína de guisante hidrolizada. La formulación de hidrogeles triturados se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se seca en un horno de vacío a una temperatura de secado primario y secundario de 50 °C. Para determinar la carga y la estabilidad en almacenamiento de la composición seca: una muestra seca se pesa con precisión (<100 mg) en un tubo de microcentrifuga. Se añaden 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). La formulación se disuelve en el tampón de DMSO mediante agitación. A esta muestra se le añade 0,8 ml de una solución que contiene NaOH 0,05 N, SDS al 0,5 % y ácido cítrico (sal de trisodio) 0,075 M. Los tubos se someten a ultrasonidos durante 10 min a 45 °C, seguido de una breve centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. Se toman alícuotas de la solución de DMSO/NaOH/SDS/citrato transparente en pocillos de una microplaca y se analizan para determinar el contenido de proteínas mediante el uso del método de ensayo de Bradford. 50 La estabilidad de la composición seca de enzima estable después de la exposición a 95 °C durante 20 min es significativamente mayor que la de una enzima seca sin la composición descrita.

Ejemplo de referencia 41 1

55 Composición seca estable que contiene un agente de control biológico de plantas

60 Un agente de control biológico tal como rizobacterias se prepara en composición seca de acuerdo con el Ejemplo de referencia 34. La eficacia de la composición seca de rizobacterias se evalúa en el crecimiento de lechuga en condiciones gnotobióticas. Se inoculan dosis de 100 mg de composición seca de rizobacterias por planta en frascos con arena y se siembran plántulas de lechuga pregerminadas (24 h). Se aplica una dosis de nutrientes de 5 ml de solución de Hoagland esterilizada a las plantas en el frasco. Los frascos se disponen aleatoriamente en la cámara de crecimiento mantenida a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h. Durante cada intervalo de 7 días después de la inoculación, las plantas y la arena adherida se retiran cuidadosamente de los frascos. Las raíces se lavan en tampón de fosfato estéril (pH 7,0) y se registra la medición de la longitud de la raíz. Las plántulas de lechuga tratadas con la composición de rizobacterias muestran un crecimiento mejorado que las plántulas no tratadas.

Ejemplo de referencia 42

Producción de comprimidos que contienen una composición seca estable de las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* sp.

5 El concentrado bacteriano congelado (10 g obtenidos de un proceso de fermentación local) se descongeló a 37 °C en baño de agua y el contenido de sólidos se ajustó al 10 % de sólidos en peso húmedo con agua destilada. Aproximadamente 5 g de proteína de guisante hidrolizada (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ) se disolvieron completamente en 50 g de agua tibia y se añadieron a la cultura bacteriana descongelada.

10 Aproximadamente 5 g de trehalosa (Cargill Mineápolis, MN) y aproximadamente 2,5 g de ascorbato de sodio se mezclaron uniformemente en forma seca. Opcionalmente, también se añadieron aproximadamente 5 g de inulina instantánea, aproximadamente 5 g de maltodextrina DE-1 (Cargill Mineápolis, MN) y aproximadamente 1,5 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) para formar una suspensión viscosa a una viscosidad conveniente de aproximadamente 50 000 mPas (50 000 cP) y para mejorar aún más la estructura vítreo del material seco. La mezcla de polvos se añadió lentamente al cultivo bacteriano y se llevó a cabo la mezcla a 37 °C durante 20 minutos. Después, la suspensión bacteriana viscosa se goteó lentamente en un baño de nitrógeno líquido. Las perlas congeladas se retiraron después del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C hasta su secado.

15 20 Para el secado, las perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga que varía de 5 hasta 16 kg/m² (de 500 hasta 1500 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un secador por congelación (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Se inició una etapa primaria de eliminación de humedad mediante el ajuste de la presión de vacío entre 266,6-360,0 Pa (2000-2700 mTorr) y permitir que la temperatura del producto aumente y se estabilice entre -10 -5 °C. Con el tiempo (aproximadamente 10-16 h) la temperatura del producto aumentó a aproximadamente 20-25 °C, momento en el que se inició una etapa de secado secundaria al vacío máximo (6,7-26,6 Pa, es decir, 50-200 mTorr) y la temperatura del producto se mantuvo entre 30-45 °C durante 14 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió por debajo de 0,3 Aw. La formulación se moló mediante el uso de un molinillo de café y las partículas se tamizaron por debajo de 250 micras.

25 30 Para la formación de comprimidos, la composición probiótica seca y estable (100 mg) se mezcló con 400 mg de maltodextrina DE-1 que contenía estearato de magnesio al 2 % p/p y sílice hidrófila en polvo (AEROSIL® 200, Evonik Industries) y se comprimió en un equipo de prensa de píldoras portátil (mediante el uso de una carcasa de 12,7 mm, es decir, 1/2" de diámetro de comprimido). También se prepararon tabletas similares que contenían un polvo liofilizado común de las bacterias probióticas (probiótico libre) y se usaron para la comparación con los comprimidos que contenían bacterias probióticas protegidas.

35 40 La viabilidad antes y después de la formación de comprimidos y durante el almacenamiento a 40 °C y 43 % de HR de las bacterias probióticas estables junto con el probiótico libre se monitoreó semanalmente, siguiendo los procedimientos estándar de dilución y siembra en placas de agar LMRS. La Figura 18 muestra que las bacterias probióticas libres perdieron más de un orden de magnitud de viabilidad en el proceso de formación de comprimidos, mientras que la viabilidad de las bacterias protegidas permaneció esencialmente igual después del proceso de formación de comprimidos. Después de 14 días de almacenamiento a 40 °C y 43 % de HR, la viabilidad de las bacterias probióticas como se formuló se redujo ligeramente en aproximadamente 0,3 logaritmos, mientras que la viabilidad de las bacterias comúnmente liofilizadas se redujo aún más en aproximadamente 0,6 logaritmos. Estos resultados demuestran que la composición y los métodos como tales proporcionan una protección significativa contra la presión de compresión y el calor asociado durante la formación de comprimidos de bacterias probióticas y durante el almacenamiento en condiciones de almacenamiento no refrigerado y de alta humedad.

45 50

Ejemplo de referencia 43

Preparación de comprimidos de multivitaminas/probióticos que contienen una composición seca estable de las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* sp.

55 La protección de las composiciones y métodos como se describió en la presente descripción se exploró además en comprimidos que contenían ingredientes multivitamínicos. Se produjeron diez (10) g de composición en polvo seco como se describe en el Ejemplo de referencia 42. Para la formación de comprimidos, la composición probiótica seca y estable (100 mg) se mezcló con 400 mg de polvo de multivitaminas disponible comercialmente (Centrum®, Pfizer) que contiene estearato de magnesio al 2 % p/p y sílice hidrófila ahumada al 2 % p/p (AEROSIL® 200, Evonik Industries) y se comprimió en un equipo de prensa de píldoras portátil (mediante el uso de una carcasa de 12,7 mm, es decir, 1/2" de diámetro de comprimido). También se prepararon tabletas similares que contenían un polvo liofilizado común de las bacterias probióticas (probiótico libre) y se usaron para la comparación con los comprimidos que contenían bacterias probióticas protegidas. Después, se probó el recuento total de probióticos de los comprimidos resultantes. Los resultados se muestran en la Figura 19.

60 65 Como se muestra en la Figura 19, las bacterias probióticas libres perdieron más de dos (2) registros de viabilidad en el proceso de formación de comprimidos con ingredientes multivitamínicos, mientras que la viabilidad de las bacterias

5 protegidas se redujo en menos de un registro. Después de 14 días de almacenamiento a 40 °C y 43 % de HR, la viabilidad de las bacterias probióticas que se formularon permaneció esencialmente igual mientras que la viabilidad de las bacterias secadas por congelación común se desplomó en tres (3) logaritmos adicionales. Estos resultados demuestran que la composición y los métodos como tales proporcionan una protección significativa a los materiales biológicos sensibles de otros compuestos dañinos en la mezcla de comprimidos, lo que permite de esta manera mezclar en un comprimido una variedad de materiales biológicos sin afectar su potencia general.

Ejemplo de referencia 44

10 Tableteado de una composición seca estable que contiene enzimas protegidas

15 Se prepararon composiciones secas y estables que contenían una proteasa o una lipasa (ambas de Sigma) como se describe en el Ejemplo de referencia 42. Las composiciones secas finales contenían 10 % de proteasa o lipasa, 40 % de trehalosa, 20 % de proteína de guisante extensamente hidrolizada, 10 % de ascorbato de sodio. Además, el alginato de sodio al 6 % y la inulina al 14 % también se incluyeron en la composición.

20 Para la formación de comprimidos, las composiciones enzimáticas secas (50 mg cada una) se mezclaron con 450 mg de maltodextrina DE-1 que contenía estearato de magnesio al 2 % p/p y sílice fume hidrófila al 2 % p/p y se comprimieron en un equipo de prensa de píldoras portátil (mediante el uso de una carcasa de 12,7 mm, es decir, 1/2" de diámetro de comprimido). También se prepararon comprimidos que contenían cantidades iguales de ambas enzimas protegidas mediante la mezcla de 25 mg de proteasa y 25 mg de lipasa con 450 mg de maltodextrina DE1. También se prepararon y usaron comprimidos similares que contenían polvo seco de la enzima en forma libre (enzima libre o una mezcla de ambas) para su comparación con comprimidos que contenían las enzimas protegidas.

25 25 La actividad restante de proteasa y lipasa después de la formación de comprimidos con relación a su actividad en la mezcla de polvo antes de la formación de comprimidos se determinó de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica mediante el uso de azocaseína y pNP-palmitato como sustratos, respectivamente.

30 30 Como se muestra en la Figura 20, la proteasa libre en forma de comprimidos ya sea sola o en combinación con lipasa libre dio como resultado una pérdida de actividad de aproximadamente 40 %, mientras que la proteasa protegida no perdió ninguna actividad cuando se comprimió sola y solo aproximadamente 17 % cuando se comprimió en una mezcla con lipasa protegida. La formación de comprimidos de lipasa libre o protegida no dio como resultado ninguna pérdida significativa de actividad, sin embargo, la formación de comprimidos de lipasa libre en presencia de proteasa libre dio como resultado una pérdida del 64 % de actividad, mientras que la formación de comprimidos de lipasa protegida en presencia de proteasa protegida dio como resultado una pérdida del 33 % de actividad. Estos resultados demuestran que la composición y los métodos como tales proporcionan una protección significativa contra la presión de compresión y el calor asociado durante la formación de comprimidos de enzimas. Los resultados también muestran que la composición y los métodos como tales proporcionan protección de otras enzimas digestivas en la mezcla de comprimidos, lo que permite de esta manera la mezcla en un comprimido de una variedad de enzimas deseadas sin afectar su actividad general.

40 Ejemplo de referencia 45

45 45 Tableteo de piensos para animales que contienen una composición seca estable que contiene bacterias probióticas contra microorganismos patógenos

50 50 La protección de las composiciones y métodos como se describen en la presente descripción se explora además en comprimidos que contienen ingredientes de pienso para animales. Aproximadamente 100 g de composiciones secas y estables que contienen la bacteria probiótica *L. acidophilus* se prepara y se seca como se describe en el Ejemplo de referencia 42. Las composiciones secas finales contenían 10 % de biomasa de células bacterianas secas, 54 % de trehalosa, 20 % de proteína de guisante extensamente hidrolizada, 10 % de ascorbato de sodio. Además, el alginato de sodio al 6 % también se incluye en la composición.

55 55 Aproximadamente 10 kg de alimento para perros disponible comercialmente o gránulos de pienso terminado para pollos se secan al aire durante la noche a 40 °C y después se muelen finamente hasta obtener un polvo de flujo libre. La composición probiótica seca estable se mezcla con el polvo de pienso y se comprime en un equipo de prensa de píldoras portátil (mediante el uso de alojamientos de píldoras de 3,2-22,2 mm, es decir, 1/8-7/8" de diámetro) para formar píldoras de aproximadamente 200-2000 mg que contienen aproximadamente diez (10) mil millones de células vivas por gramo de pienso. Para el tratamiento de pollos, las píldoras de pienso probiótico se vierten lentamente en 100 kg de alimento comercial estándar mientras se mezclan. El pienso terminado tratado está listo para alimentar a las aves y aumentar la resistencia a patógenos tales como *salmonella*. Para las pruebas de estabilidad, las píldoras probióticas se colocan en una cámara de humedad relativa del 43 % a 40 °C y después de 14 días de almacenamiento en estas condiciones extremas, la pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas es inferior a un (1) log de las UFC iniciales. Este ejemplo demuestra que los microorganismos usados para tratar varios animales, que incluyen animales de compañía, tales como varios *Lactobacillus* sp. pueden protegerse en la composición y los métodos de secado como

tal y luego comprimirse en una prensa de comprimidos y proporcionarse con alimentaciones estándar en un alimentador de alimentación típico en condiciones típicas de humedad y temperatura.

Ejemplo de referencia 46

5 Preparación de tabletas efervescentes de bebida efervescente que contienen una composición seca estable de bacterias probióticas

10 Aproximadamente 10 g de polvo de composiciones secas y estables que contienen la bacteria probiótica *L. acidophilus* sp. o *Bifidobacterium* sp. se prepara y se seca como se describe en los Ejemplos de referencia 42 y 45.

15 Tabletas efervescentes tales como Alka Seltzer®, Fizzies® o bebidas deportivas se muelen finamente hasta convertirlas en un polvo de flujo libre. La composición probiótica seca estable se mezcla con el polvo efervescente y se comprime en un equipo de prensa de píldora portátil (mediante el uso de una carcasa de 22,2 mm, es decir, 7/8" de diámetro de comprimido) para formar comprimidos de aproximadamente 2000 mg que contienen aproximadamente diez (10) mil millones de células vivas por comprimido. Para la prueba de estabilidad, los comprimidos efervescentes probióticos se colocan en una cámara con 43 % de humedad relativa a 33 °C y después de 90 días de almacenamiento en estas condiciones extremas, la pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas es menor que una (1) unidad logarítmica de las UFC iniciales. Este ejemplo demuestra que los materiales biológicos sensibles tales como las bacterias probióticas vivas pueden protegerse y estabilizarse en la composición y los métodos de secado como tales y después comprimirse en una prensa de comprimidos y almacenarse en condiciones de consumo severas de humedad y temperatura.

Ejemplo de referencia 47

25 Preparación de comprimidos que contienen una composición seca estable de bacterias probióticas para tratar infecciones vaginales tales como levadura o vaginosis bacteriana

30 Se prepara y se seca aproximadamente 15 g de polvo de composiciones secas y estables que contienen la bacteria probiótica *L. acidophilus* sp. como se describe en los Ejemplos de referencia 1 y 4.

35 La composición probiótica se mezcla con 74 g de lactosa, 10 g de almidón de maíz, 0,5 g de estearato de magnesio, 0,01 g de carboximetilcelulosa de sodio, 0,01 g de polivinilpirrolidina y 0,01 g de sílice hidrófoba en polvo y se mezcla durante 15 minutos. La mezcla en polvo se comprime en un equipo de prensa de comprimidos portátil. El peso del comprimido resultante es de aproximadamente 1,5 g. La dureza máxima de los comprimidos es de 6 a 8 kg. El comprimido se desintegró en agua en aproximadamente 30 segundos.

Ejemplo 48 (de acuerdo con la invención)

40 Producción de suspensión de aceite que contiene una composición seca estable de bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (DSM-20356)

45 Concentrado congelado de *L. acidophilus* (200 g obtenidos de un proceso de fermentación local) se descongeló a 37 °C en un baño de agua y se añadió con 200 g de solución de proteína de guisante hidrolizada al 3 % (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ). La suspensión de bacterias se centrifugó a 4000 g durante 15 min (Sorvall RC-5B, Du-Pont Company, Wilmington, DE) y se decantó el sobrenadante. El precipitado de las bacterias se llevó hasta el peso original (200 g) con una solución de proteína de guisante hidrolizada al 3 %. Se disolvieron completamente 50 g adicionales de proteína de guisante hidrolizada en 80 g de agua tibia, el pH se ajustó a 9 con solución de NaOH al 20 % y se añadió a la cultura bacteriana. Se mezclaron uniformemente ochenta y cinco coma seis (85,6) g de sacarosa (obtenida de un mercado local), 30 g de ciclodextrina-7 (Cargill Mineápolis, MN), 20 g de ascorbato de sodio (Sigma) y 15 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) en forma seca. La mezcla de polvos se añadió lentamente al cultivo bacteriano y se llevó a cabo la mezcla en un mezclador planetario de 1 qt (Charles Ross & Son Company, Hauppauge, Nueva York) a 37 °C durante 20 minutos. Después, la suspensión se goteó lentamente en un baño que contenía nitrógeno líquido. Las perlas congeladas se retiraron después del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenaron en un congelador profundo a -80 °C hasta su secado.

50 Para el secado, las perlas congeladas se extendieron uniformemente en bandejas con una capacidad de carga que varía de 5 hasta 16 kg/m² (de 500 hasta 1500 g/pie cuadrado) y las bandejas se colocaron en estantes en un secador por congelación (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Se inició una etapa de secado primario mediante el ajuste de la presión de vacío entre 266.6 - 360.0 Pa (2000-2700 mTorr) y la temperatura del producto se elevó y estabilizó entre -12 °C y -5 °C. Con el tiempo (aproximadamente 10-16 h) la temperatura del producto aumentó a aproximadamente 20-25 °C, momento en el que se inició una etapa de secado secundaria al vacío máximo (13,3 - 20,0 Pa, es decir, 100 -150 mTorr) y la temperatura del producto se mantuvo entre 30-40 °C durante 14 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad del agua se midió por debajo de 0,3 Aw. La formulación se molvió mediante el uso de un molino de martillo disponible comercialmente y las partículas se tamizaron por debajo de 250 micras.

La viabilidad de la composición estable de las bacterias probióticas se probó a 40 °C y 43 % de HR durante 14 días en forma de polvo seco o en suspensión de aceite de maíz (1 g de polvo seco mezclado en 100 g de aceite) o después de recubrir 10 g de suspensión de aceite en 45 g de gránulos de pienso para aves (los gránulos de pienso se acclimataron primero en una cámara de humedad de 33 % de HR durante dos semanas). Después de 14 días de 5 incubación a 40 °C y 43 % de HR, las bacterias probióticas perdieron solo 0,5 log de UFC/g cuando se mantuvieron en forma seca, 0,34 log cuando se mezclaron en suspensión de aceite y 0,65 log cuando se recubrieron en pienso para pollos. Estos resultados demuestran que la viabilidad de las bacterias probióticas se conserva en varias 10 aplicaciones de pienso después de 14 días de exposición en condiciones de almacenamiento de alta humedad y no refrigeradas cuando se usan las composiciones y métodos de la presente invención.

10 Ejemplo 49 (de acuerdo con la invención)

Producción de una composición seca estable que contiene fagos vivos contra *Vibrio anguillarum*

15 El cultivo de fagos vivos concentrados (se obtienen 100 g de un fabricante) se coloca en un mezclador planetario con camisa a 10 °C. Aproximadamente 50 g de proteína de guisante hidrolizada (hidrolizados ultrafiltrados, Marcor, Carlstadt, NJ) se disuelven completamente en 300 g de agua tibia. La solución se enfria a 10 °C y se añade al cultivo de fagos mientras se mezcla. Cien setenta y cuatro (174) g de sacarosa (obtenida de un mercado local), 60 g de 20 ciclodextrina-7 (Cargill Mineápolis, MN), 40 g de ascorbato de sodio (Sigma) y 30 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) se mezclan uniformemente en forma seca. La mezcla de polvos se añade lentamente al cultivo de fagos y la mezcla se lleva a cabo en un mezclador planetario de 1 qt a 10 °C durante 20 minutos. Después, la suspensión se gotea lentamente en un baño que contiene nitrógeno líquido. Las perlas congeladas se retiran después del 25 nitrógeno líquido, se colocan en una bolsa sellada de papel de aluminio y se almacenan en un congelador profundo a -80 °C hasta su secado. El secado y la molienda se llevan a cabo como se describe en el Ejemplo 48. Se mezclan diez (10) gramos de polvo de composición seca con 100 g de aceite de pescado y la suspensión se recubre en 10 kg de gránulos de pienso para salmón del Atlántico. Después, el pienso recubierto se almacena en condiciones de 30 almacenamiento en almacén típicas. La viabilidad de las páginas en el pienso para peces se conserva después de 14 días de exposición en condiciones de almacenamiento de alta humedad y no refrigeradas cuando se usan las composiciones y métodos de la presente invención.

30 Aunque la invención se ilustra y describe en la presente descripción con referencia a modalidades específicas, el alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición estabilizadora seca para un material bioactivo, que comprende un componente carbohidrato que comprende entre 10 % y 80 % de oligosacárido, entre 10 % y 50 % de disacárido y entre 0,1 % y 10 % de polisacárido; y un componente proteico que comprende entre 0,5 % y 40 % de proteínas animales o vegetales hidrolizadas; en base al peso total de la composición, que comprende además una sal de ácido orgánico, en donde el oligosacárido comprende ciclodextrina.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el componente proteico hidrolizado comprende caseína hidrolizada, proteína de suero hidrolizada, proteína de guisante hidrolizada, proteína de soja hidrolizada o una mezcla de estas, en particular en donde la caseína hidrolizada, proteína de suero hidrolizada, proteína de guisante hidrolizada y proteína de soja hidrolizada son proteínas en donde al menos 20 % del sustrato proteico se convierte en péptidos que tienen masas moleculares de 200 a 2000 dalton.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el polisacárido comprende ftalato de acetato de celulosa (CAP), carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio, sales de ácido algínico, hidroxipropilmethylcelulosa (HPMC), metilcelulosa, carragenano, goma gellan, goma guar, goma acacia, goma xantana, goma garrofín, quitosano ácido poliglicólico, almidones, almidones modificados o una mezcla de estos.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el oligosacárido comprende inulina, maltodextrinas, dextranos, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), mananooligosacáridos (MOS) o una mezcla de estos.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el disacárido comprende trehalosa, sacarosa, lactosa o una mezcla de estos.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal de ácido orgánico comprende una sal de ácido carboxílico de ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glutámico, sus sales o mezclas de estos.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición se seca en un estado vítreo amorfo.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la composición se seca mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en secado al aire, secado al vacío, secado en lecho fluido y secado por pulverización.
9. Un método para producir un producto que comprende un material bioactivo estabilizado, el método comprende:
 - (a) combinar el material bioactivo y la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un solvente acuoso para formar una suspensión viscosa;
 - (b) realizar la congelación instantánea de la suspensión en nitrógeno líquido para formar partículas, perlas, gotas o hebras congeladas sólidas;
 - (c) realizar el secado primario de las partículas, perlas, gotas o hebras congeladas obtenidas en la etapa (b) mediante la eliminación de agua al vacío mientras se mantiene a una temperatura por encima de su temperatura de congelación; y
 - (d) realizar el secado secundario del producto de la etapa (c) a vacío máximo y una temperatura de 20 °C o más alta durante un tiempo suficiente para reducir la actividad del agua por debajo de 0,3 Aw, de manera que se produce el producto que comprende el material bioactivo estabilizado.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la suspensión se solidifica a un hidrogel firme mediante cambio de pH o temperatura o mediante reticulación de cadenas de polímero con iones metálicos antes de la congelación instantánea.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la suspensión se moldea a una forma deseada.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el producto que comprende el material bioactivo estabilizado se corta, tritura, muele o pulveriza respectivamente en un polvo de flujo libre que tiene un tamaño de partícula menor que aproximadamente 1000 µm.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el material bioactivo comprende una célula viva, muerta o atenuada, microbio, virus, bacterias, bacterias probioticas, bacterias de plantas y suelo, hongos o una levadura, un cultivo celular, una proteína, una proteína recombinante, una enzima, un péptido, una hormona, una vacuna, un antibiótico, un fármaco o una mezcla de estos.
14. Un producto que puede obtenerse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13.

15. Un producto que es uno seleccionado de un líquido reconstituido, un polvo molido, un comprimido, un gránulo, una cápsula, un alimento o pienso, en particular pienso para animales, aditivo alimentario o aditivo de pienso para animales, o producto de semillas recubiertas y un producto nutracéutico, farmacéutico, agrícola o vacuna, en particular en forma de una barra, fórmula líquida, suspensión coloidal, polvo, el producto comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un material bioactivo, o el producto de acuerdo con la reivindicación 14.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

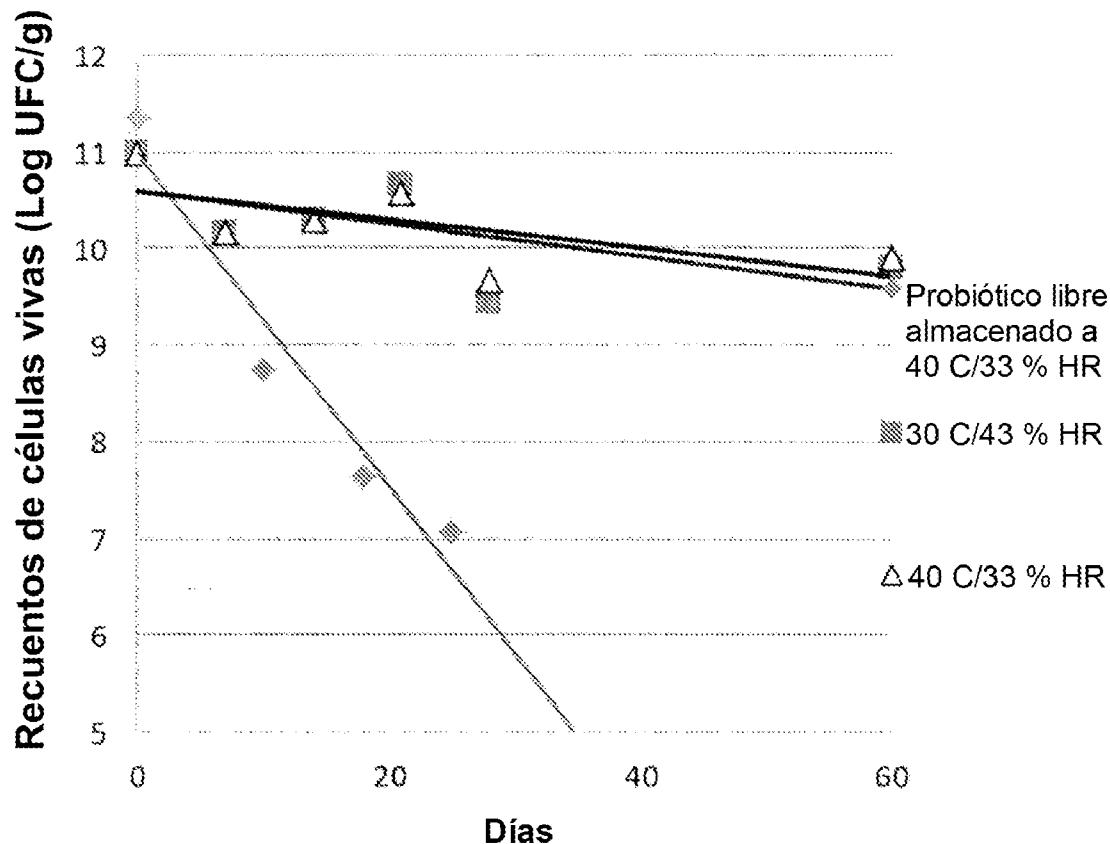


Figura 1

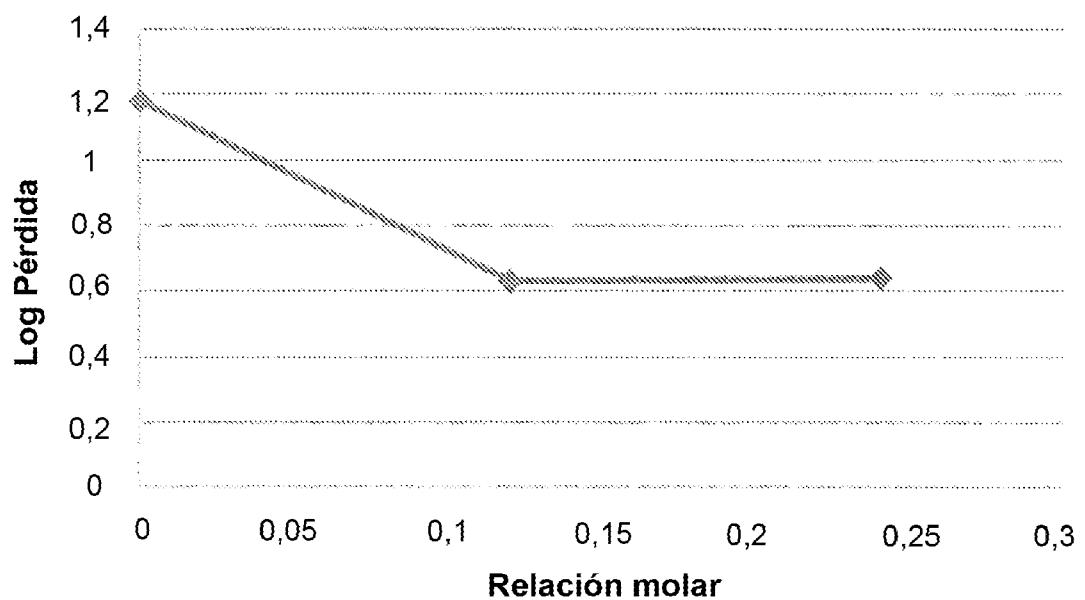


Figura 2

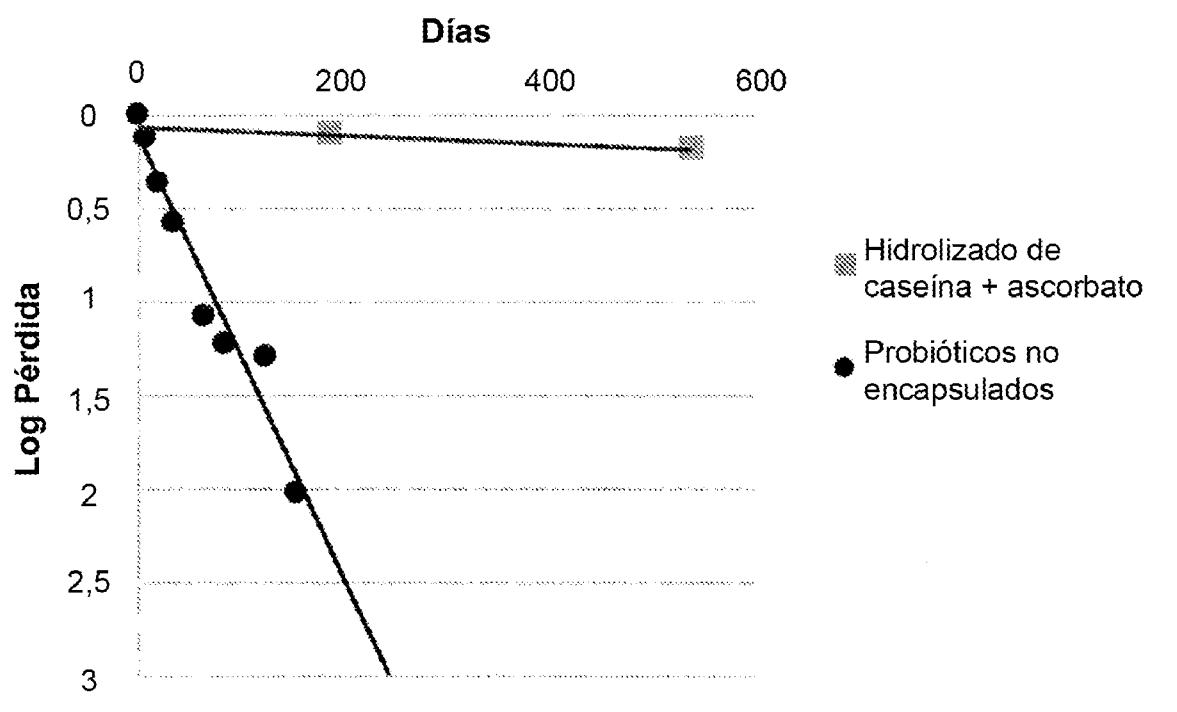


Figura 3

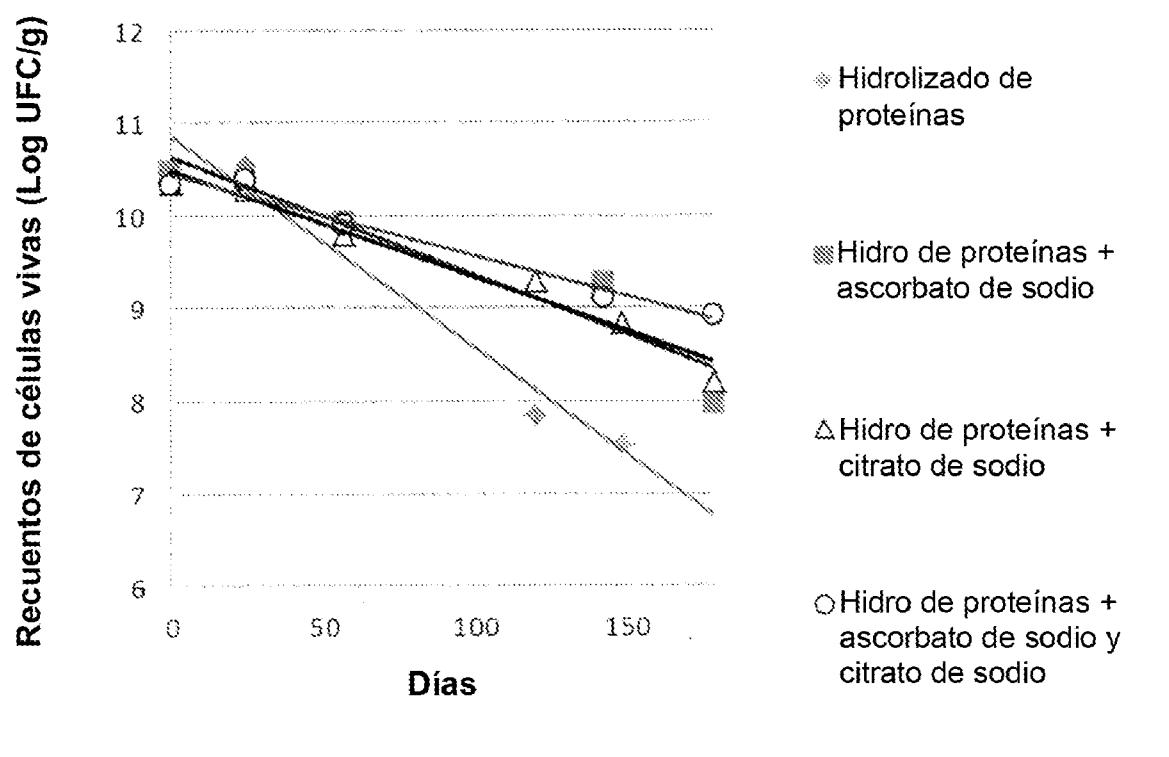


Figura 4

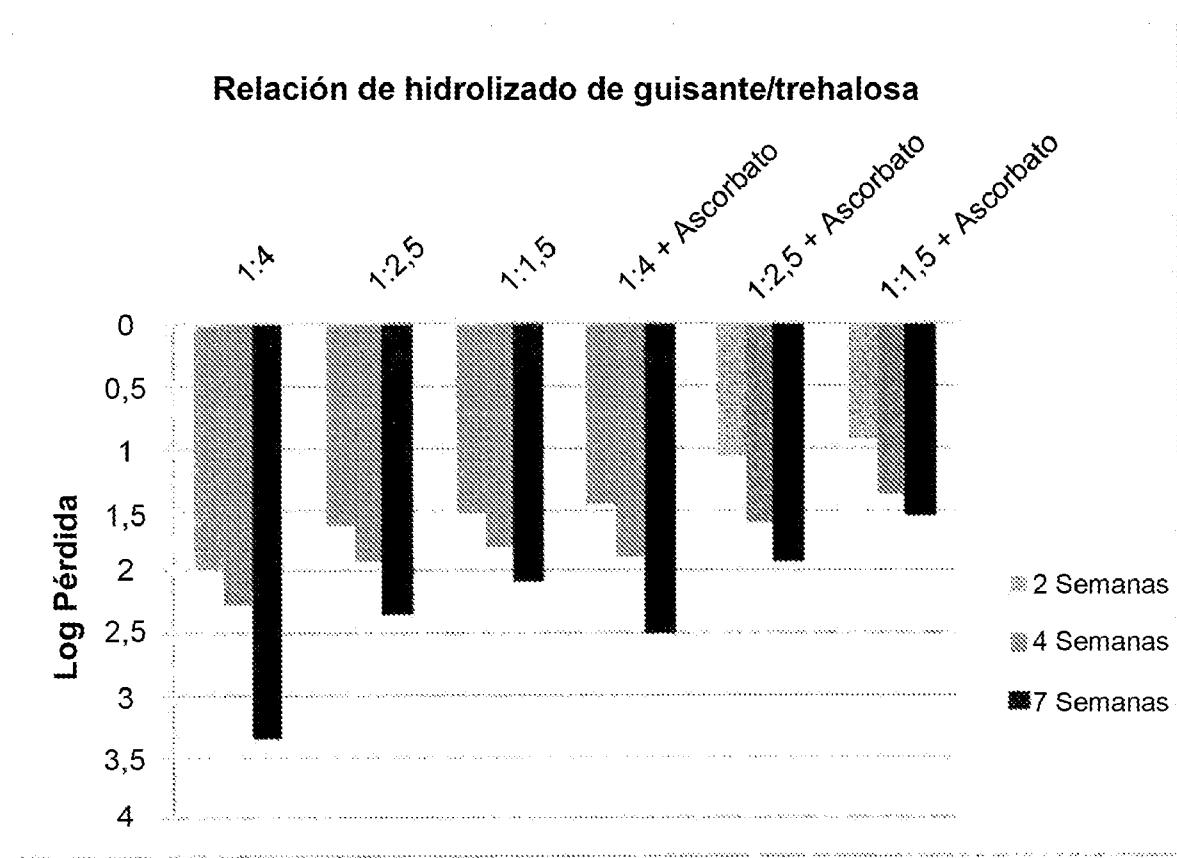


Figura 5

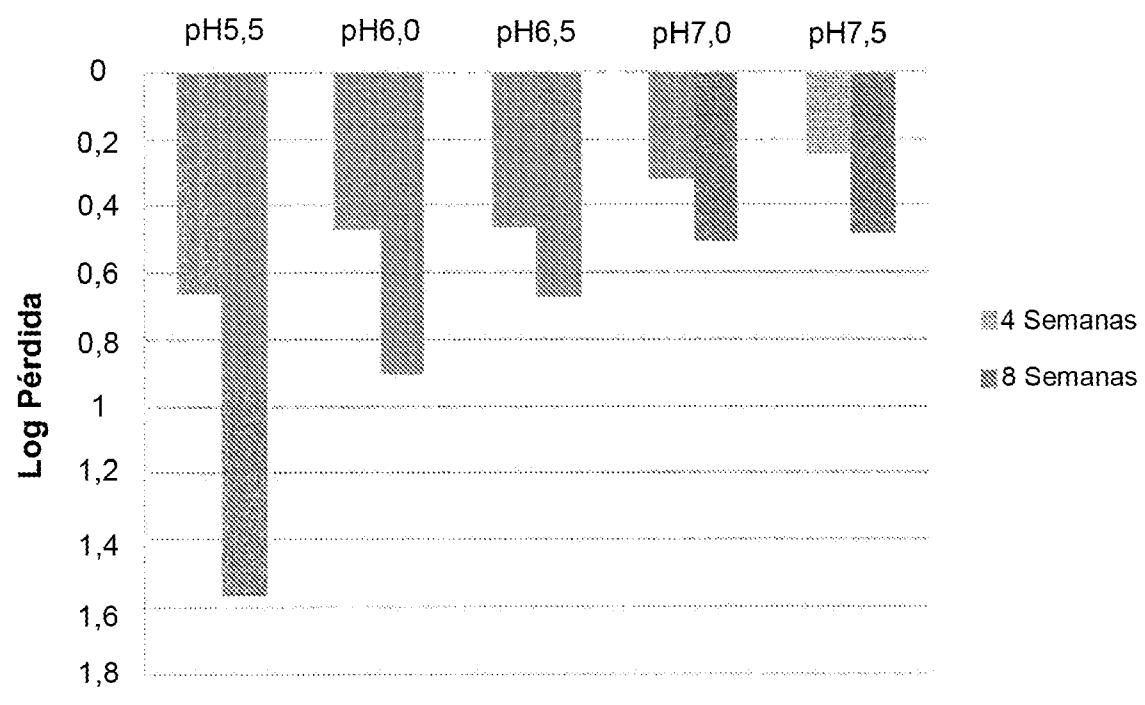


Figura 6

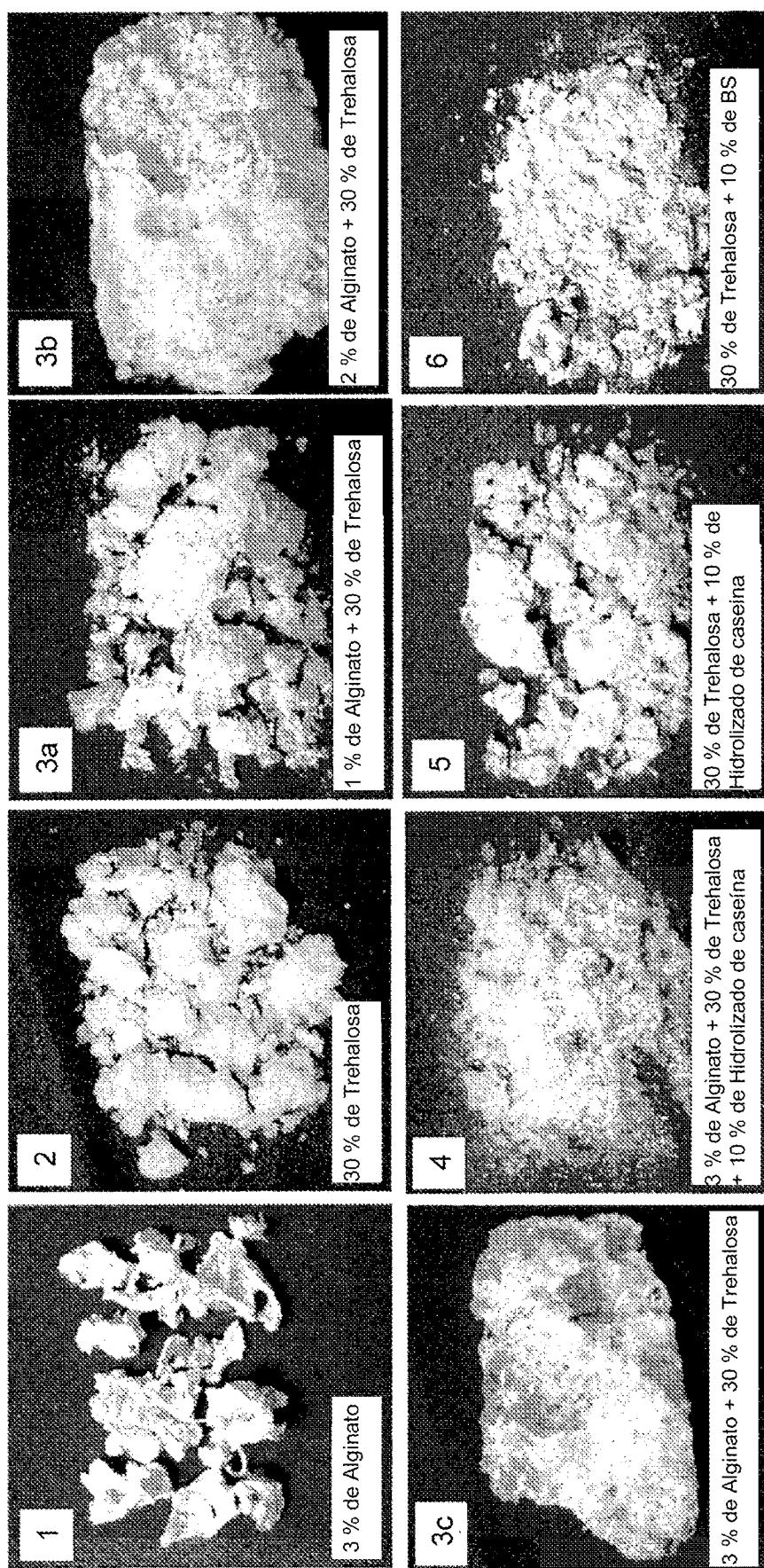


Figura 7

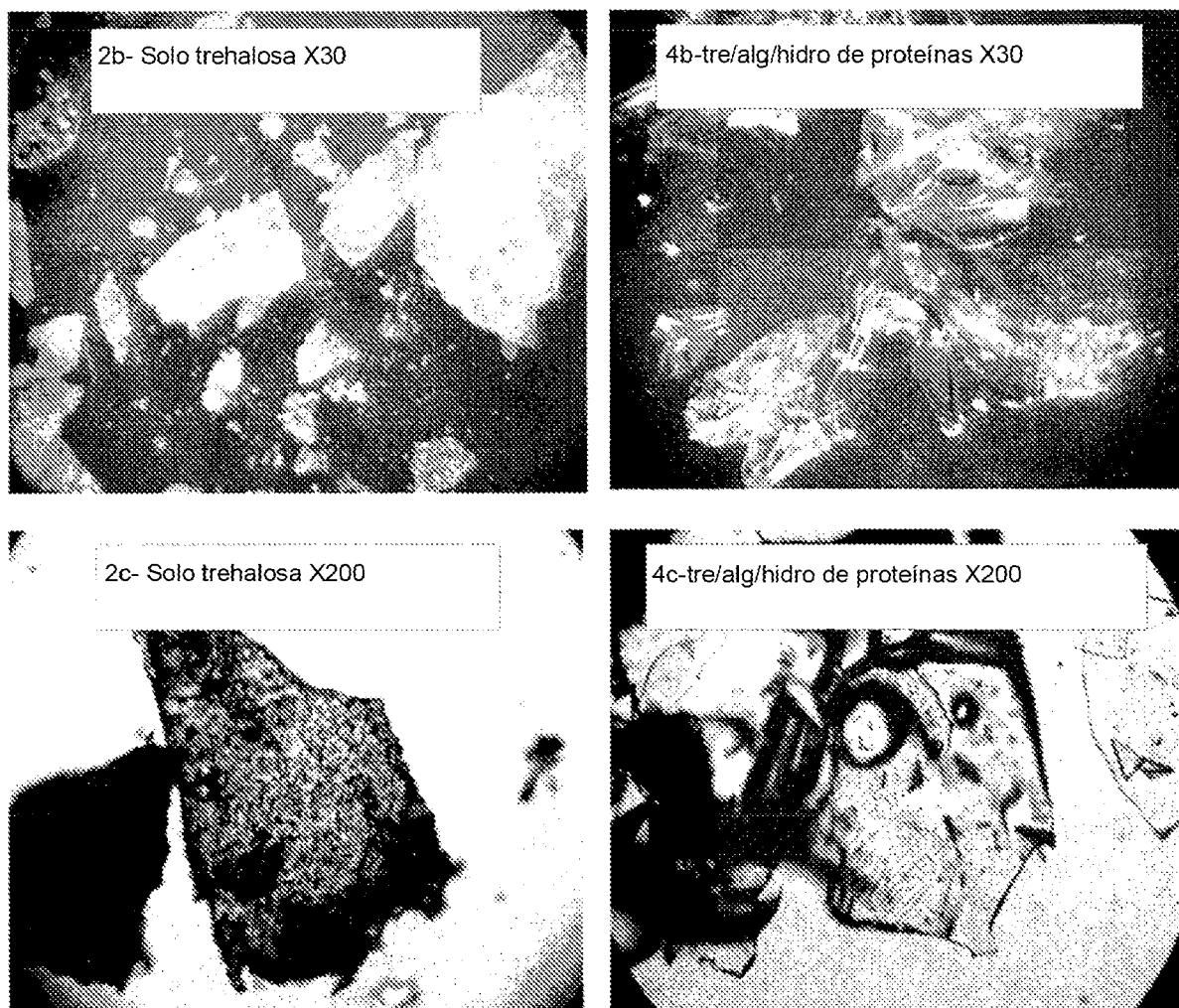


Figura 8

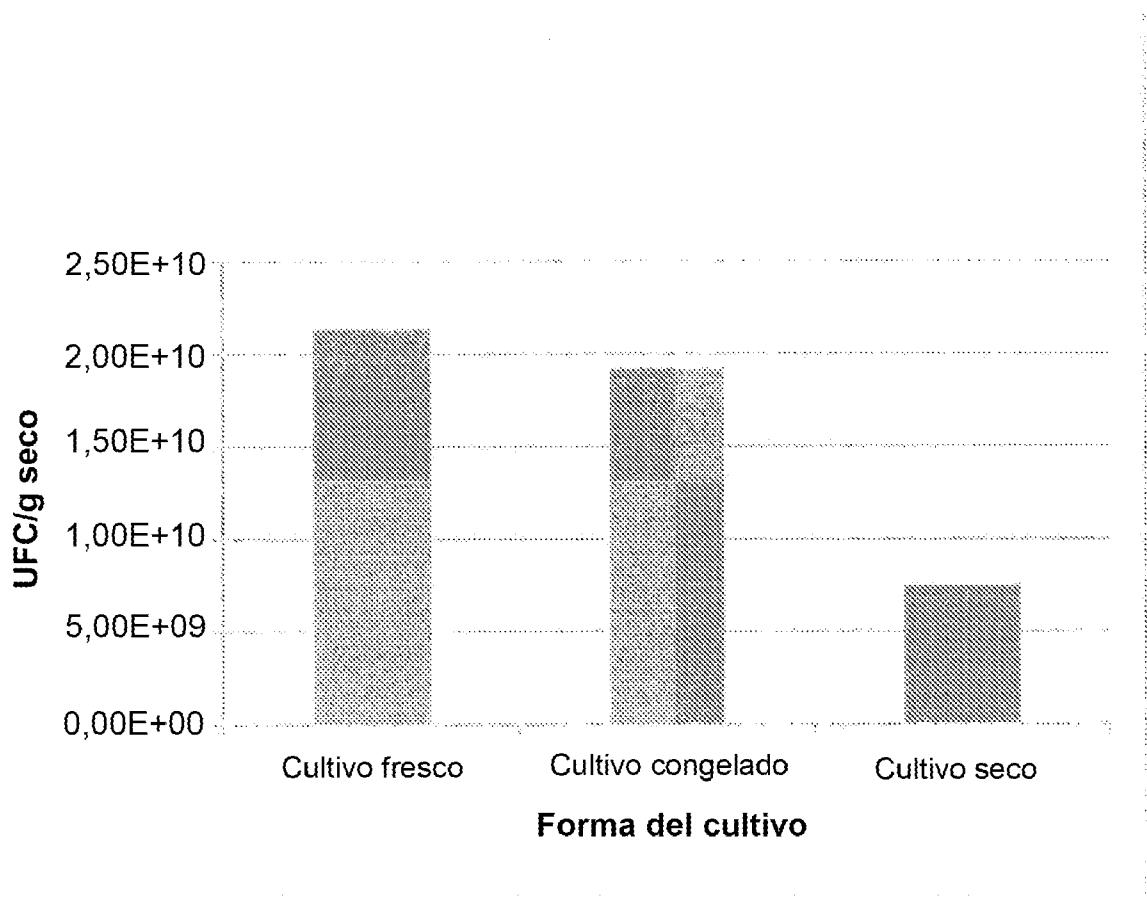


Figura 9

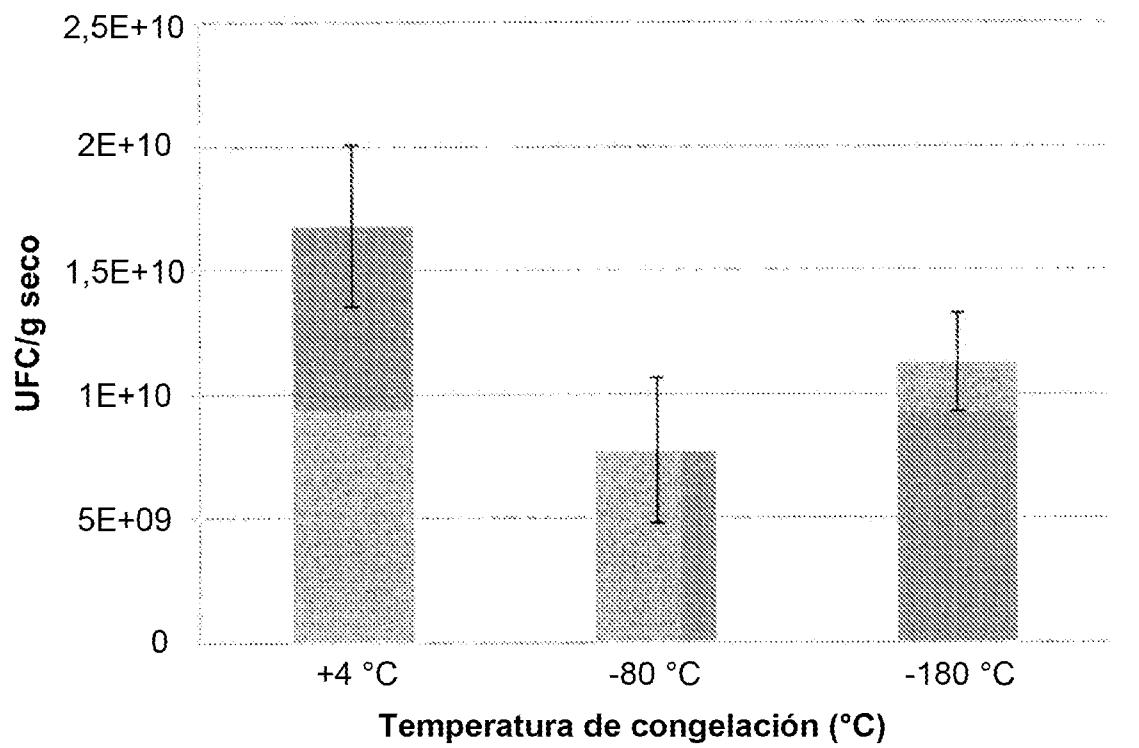


Figura 10

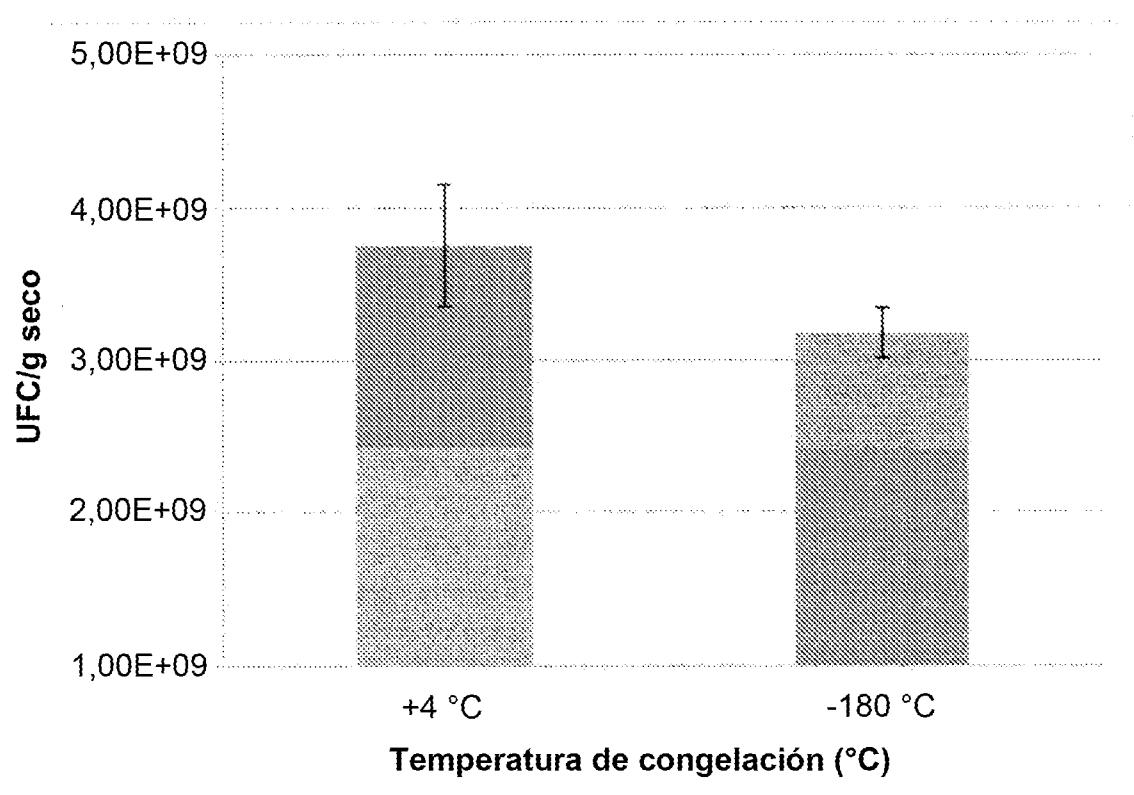


Figura 11

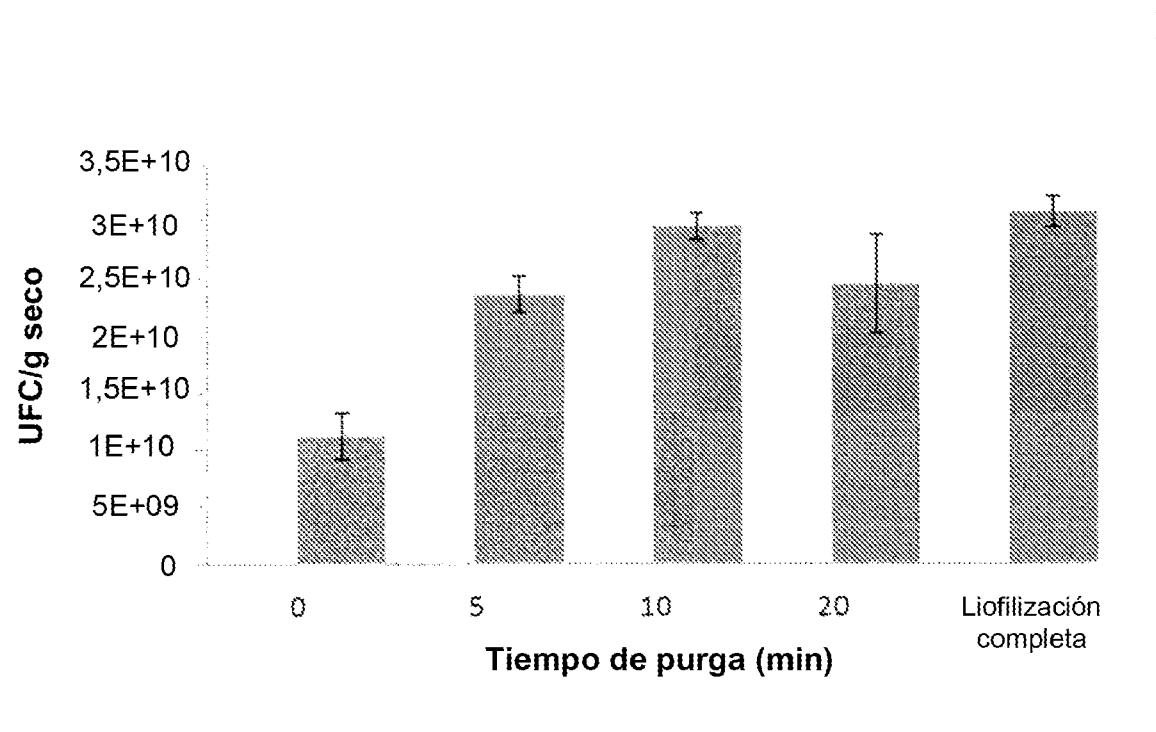


Figura 12

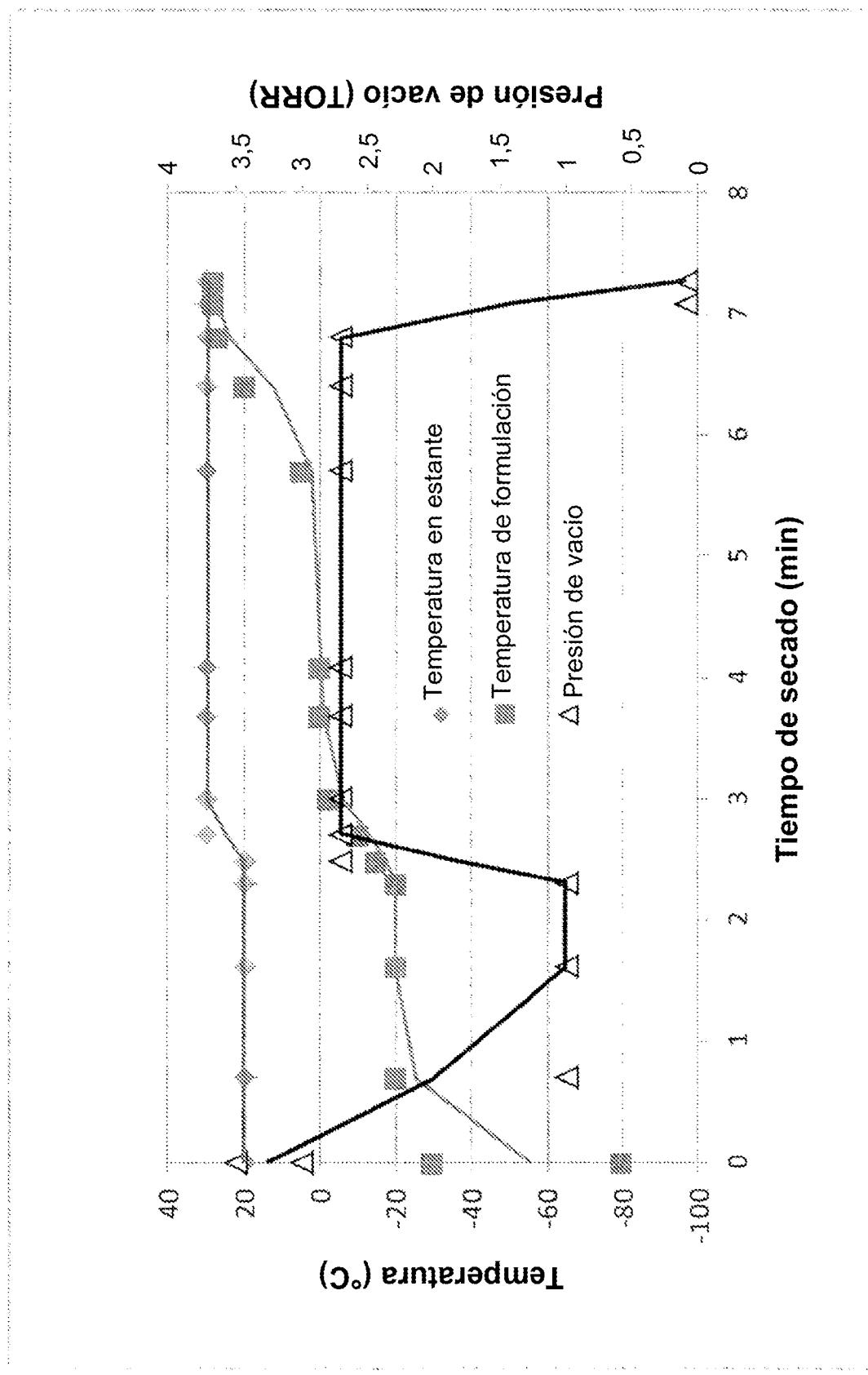


Figura 13

Pérdida del proceso de *L. rhamnosus* durante el secado de diferentes tipos de cultivos y a diferentes temperaturas de congelación

Tipo de cultivo	Log Pérdida
Cultivo congelado	0,91
Cultivo seco	0,44
Temperatura de congelación	
+4 °C	0,73
-80 °C	0,96
-180 °C	0,9

* las pérdidas por temperaturas de congelación se evaluaron en cultivos bacterianos congelados

** Las pérdidas del proceso se obtuvieron después del secado sin etapa de purga adicional.

Figura 14

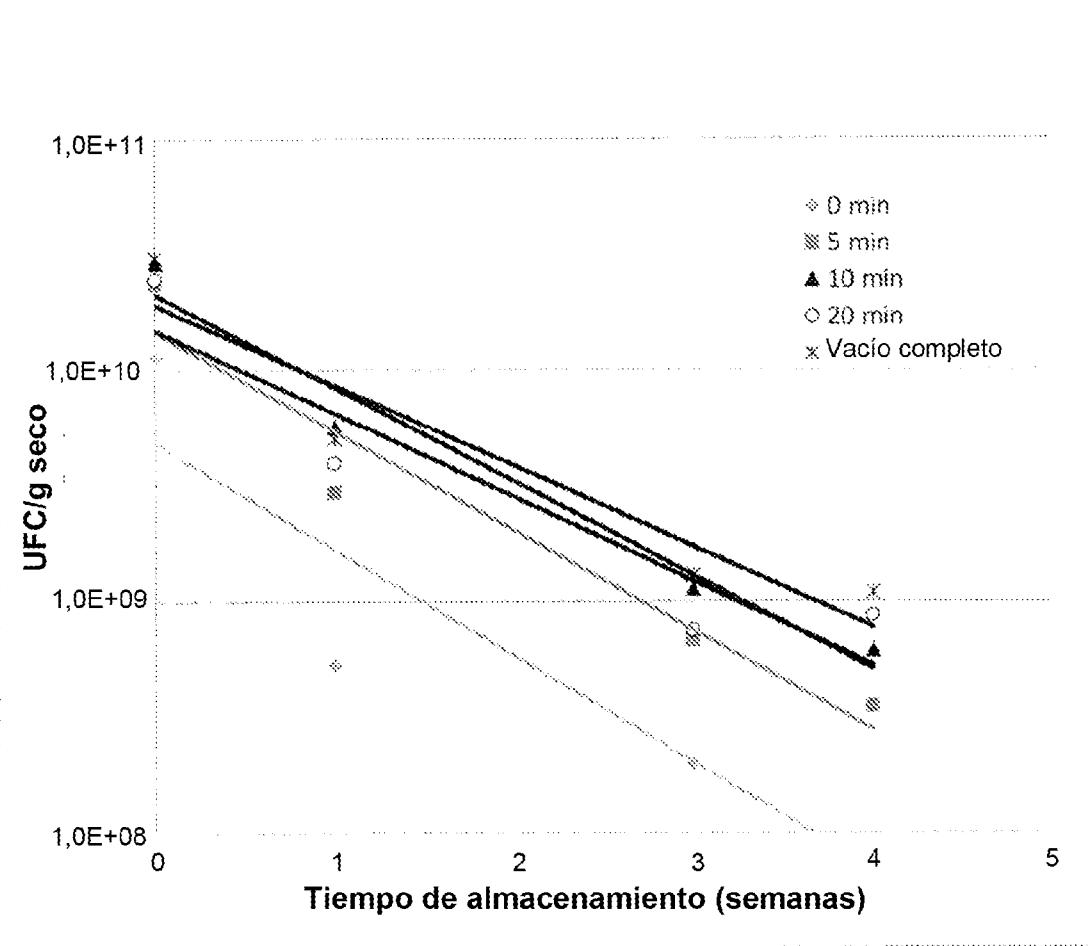


Figura 15

Estabilidad en almacenamiento en estante a 40 °C y 43 % de HR de *L. acidophilus* sp. liofilizado comúnmente o después de formular en una composición como se describió

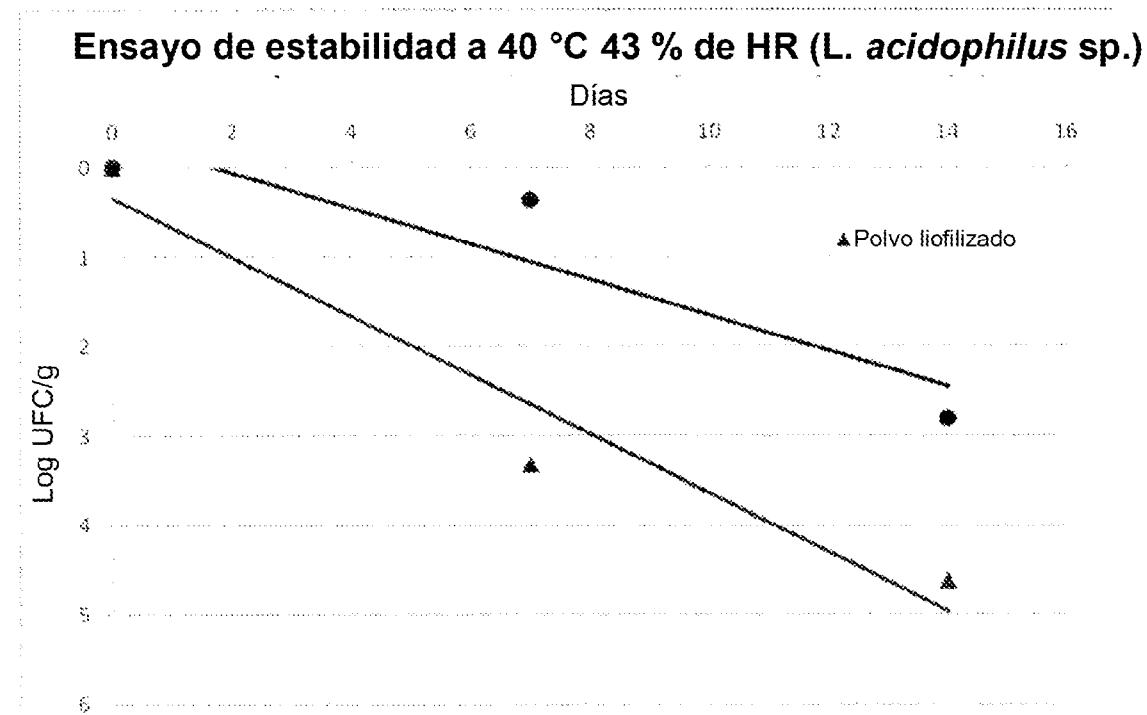
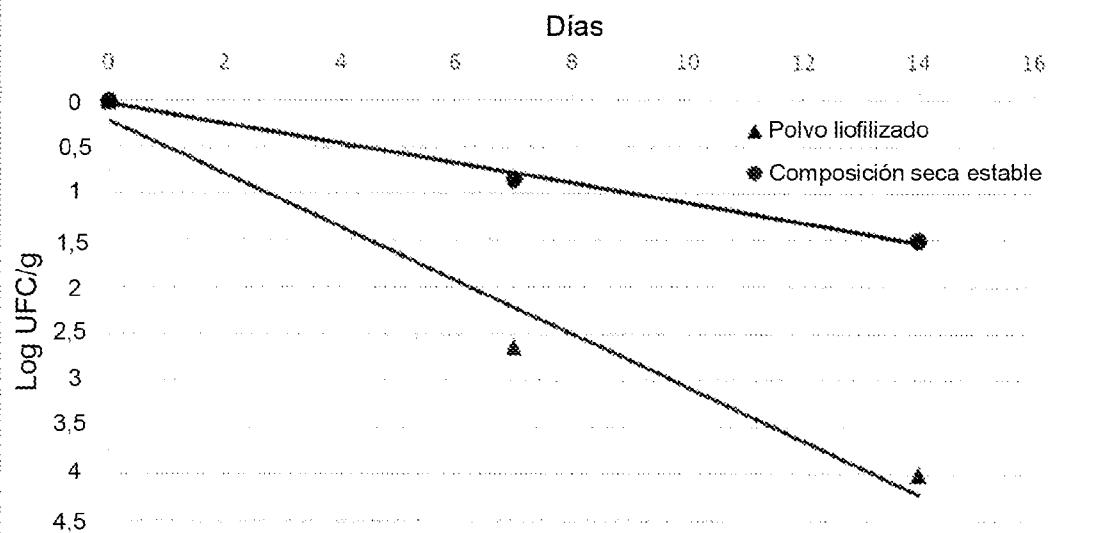


Figura 16

Estabilidad en almacenamiento en estante a 40 °C y 43 % de HR y 30 °C y 60 % de HR de *L. rhamnosus* sp. liofilizado comúnmente o después de formular ' en una composición como se describió.

Ensayo de estabilidad a 40 °C/43 % de HR (*L rhamnosus* sp.)



Ensayo de estabilidad a 30 °C/60 % de HR (*L rhamnosus* sp.)

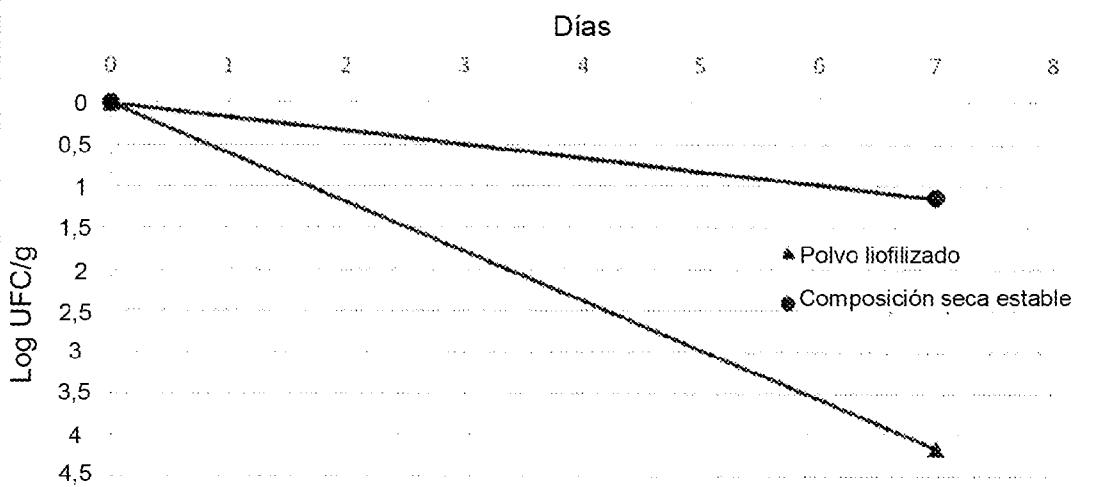


Figura 17

Efecto de la compresión en la prensa de comprimidos sobre la viabilidad y la estabilidad en almacenamiento a 40 °C y 43 % de HR del probiótico *L. rhamnosus* estabilizado y protegido en una composición como se describió.

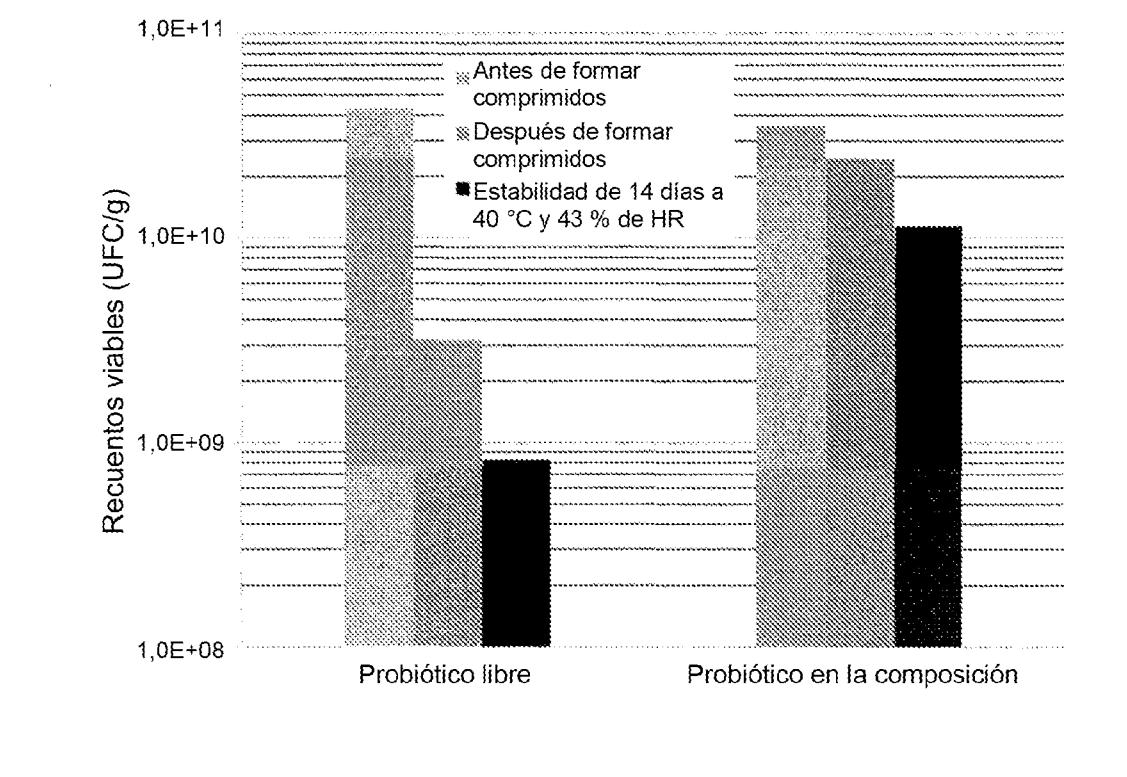


Figura 18

Efecto de la formación de comprimidos con una mezcla de multivitaminas y minerales y la exposición en almacenamiento a 40 °C y 43 % de HR sobre la viabilidad del probiótico *L. rhamnosus* estabilizado y protegido en la composición como se describió.

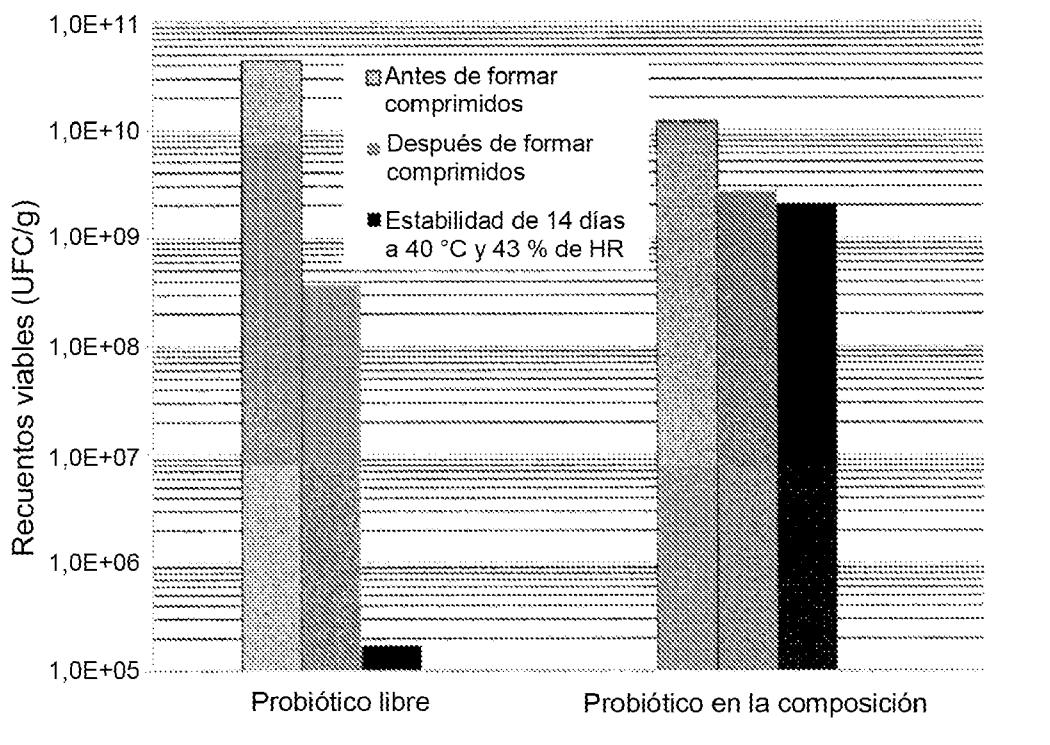


Figura 19

Efecto de la compresión en la prensa de comprimidos sobre la actividad de las enzimas proteasa y lipasa en forma libre o protegidas en la composición como se describió. Las enzimas se comprimieron individualmente o se mezclaron en cantidades iguales y después se comprimieron.

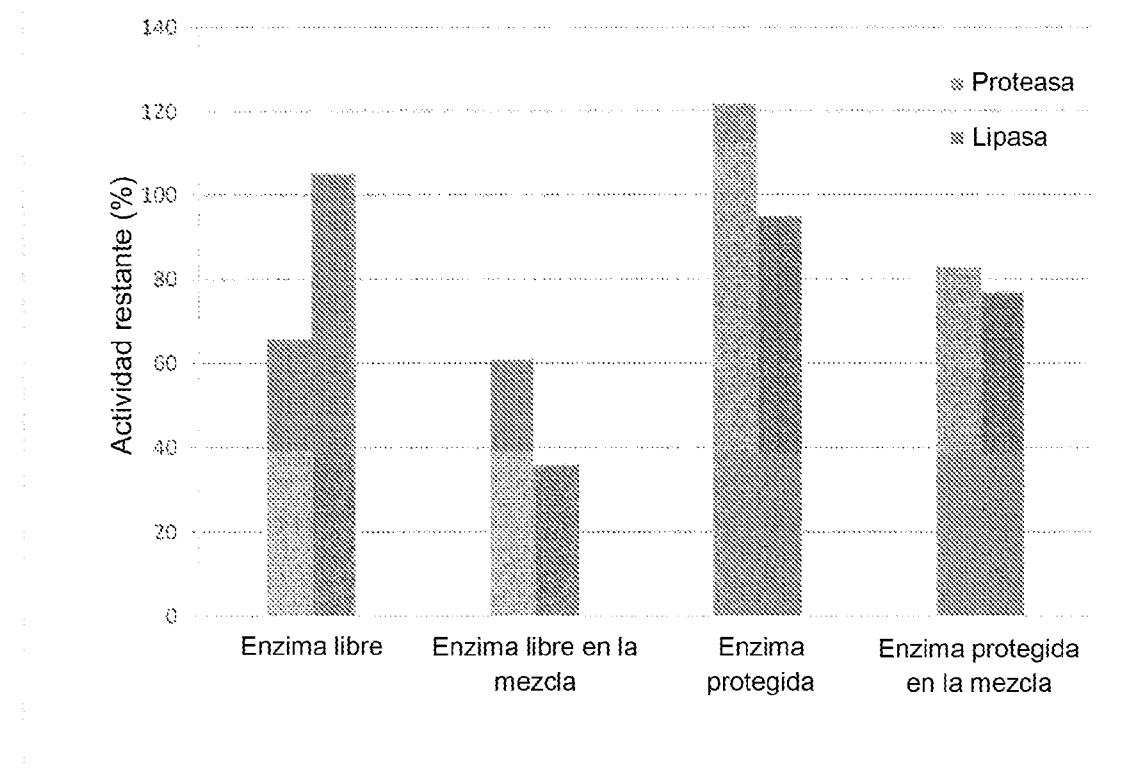


Figura 20