(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
04 de julio de 2019 (04.07.2019)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2019/126893 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A23L 29/00 (2016.01) *A61K 35/741* (2015.01)
A23L 33/135 (2016.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2018/050143

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de diciembre de 2018 (21.12.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
3444-2017 28 de diciembre de 2017 (28.12.2017) CL

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE** [CL/CL]; AV. LIBERTADOR BERNARDO O'HIGGINS 3363, ESTACION CENTRAL, SANTIAGO (CL).

(72) Inventor: **BUSTOS CERDA, Ruben Osvaldo**; Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estación Central, Santiago (CL).

(74) Mandatario: **ESTUDIO FEDERICO VILLASECA Y CIA**; ALONSO DE CORDOVA 5151, PISO 8, SANTIAGO, 7560873 (CL).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
— *en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.*

(54) **Title:** PROBIOTIC ADDITIVE FOR DEHYDRATED SOLID FOOD, PREFERABLY CEREAL, METHOD FOR PREPARING SAID ADDITIVE AND DEHYDRATED SOLID FOOD CONTAINING SAME

(54) **Título:** ADITIVO PROBIOTICO PARA ALIMENTO SOLIDO DESHIDRATADO, PREFERENTEMENTE, CEREAL; METODO DE PREPARACION DE DICHO ADITIVO Y ALIMENTO SOLIDO DESHIDRATADO QUE LO CONTIENE

(57) **Abstract:** The present invention relates to the food industry, preferably to a probiotic additive for dehydrated solid food, especially cereal, to a method for preparing said additive, and to a dehydrated solid food containing same. Preferably, the probiotic additive is covered with at least one layer of film-forming agent and at least one layer of osmotic protective agent, the film-forming agent being selected from a natural hydrocolloid, preferably alginate or an oil of plant origin, and the osmotic protective agent being selected from a monosaccharide or disaccharide sugar. Preferably, the monosaccharide sugar is glucose and the disaccharide sugar is trehalose.

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere al área de los alimentos, preferentemente, a un aditivo probiótico para alimento sólido deshidratado, especialmente, cereal; método de preparación de dicho aditivo y alimento sólido deshidratado que lo contiene. Preferentemente, el aditivo probiotico es cubierto con al menos una capa de agente filmogenico y al menos una capa de agente protector osmótico, donde el agente filmogenico se selecciona de un hidrocoloide natural, preferentemente, alginato o un aceite de origen vegetal, y dicho agente protector osmótico se selecciona de una azúcar monosacárido o disacárido, preferentemente, dicho azúcar monosacárido es glucosa y dicho azúcar disacárido es trehalosa.

WO 2019/126893 A1

ADITIVO PROBIOTICO PARA ALIMENTO SOLIDO DESHIDRATADO, PREFERENTEMENTE, CEREAL; METODO DE PREPARACION DE DICHO ADITIVO Y ALIMENTO SOLIDO DESHIDRATADO QUE LO CONTIENE

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al área de los alimentos, preferentemente, a un aditivo probiótico para alimento sólido deshidratado, especialmente, cereal; método de preparación de dicho aditivo y alimento sólido deshidratado que lo contiene. Preferentemente, el aditivo probiotico es cubierto con al menos una capa de agente filmogenico y al menos una capa de agente protector osmótico, donde el agente filmogenico se selecciona de un hidrocoloide natural, preferentemente, alginato o un aceite de origen vegetal, y dicho agente protector osmótico se selecciona de una azúcar monosacárido o disacárido, preferentemente, dicho azúcar monosacárido es glucosa y dicho azúcar disacárido es trehalosa.

ANTECEDENTES

Durante los últimos años se ha observado un aumento en el consumo de alimentos funcionales debido a los beneficios que estos aportan a la salud de las personas, siendo gran parte de estos una ayuda para la regulación de la digestión.

Los alimentos funcionales son aquellos que producen efectos beneficiosos a la salud, estos se definen como: “alimentos modificados o que contengan un ingrediente que demuestre una acción que incremente el bienestar del individuo o disminuya los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los nutrientes que contiene”.

Una parte de estos alimentos funcionales son llamados probióticos, alimentos que contienen bacterias denominadas probióticas; incorporadas en productos lácteos

de diversas marcas comerciales, cuyo objetivo es aportar una serie de beneficios, entre ellos, por ejemplo la regulación de la digestión o prevención de diarreas, siempre y cuando sean consumidas en forma periódica. Una de sus mayores ventajas es que los beneficios que aportan vienen de manera natural con su consumo, y sin efectos adversos; eso si no se considera la intolerancia a la lactosa que sufre gran parte de la población.

Gran parte de la población mundial sufre de cierto grado de intolerancia a la lactosa a lo largo de su vida, lo que causa un problema en la integración de estos alimentos probióticos a la dieta normal de las personas. Esto motiva a la generación de métodos que permitan el diseño de alimentos funcionales que no estén basados en productos lácteos, pero que permitan obtener todas las ventajas que estos ofrecen.

En particular, los cereales son considerados como la base de las grandes civilizaciones porque constituyeron una de las primeras actividades agrícolas humanas.

Las culturas europeas se formaron en torno al trigo, las civilizaciones del extremo oriente alrededor del arroz y las de América cultivaron el maíz.

La elaboración de los cereales de desayuno, surge a finales del siglo XIX cuando los hermanos Kellogg, descubren el proceso de temperado en el trigo y posteriormente inventan un método de procesamiento de los cereales que incluye cocido, temperado, laminado y tostado del grano para obtener hojuelas tostadas.

Los cereales para desayuno son productos elaborados por la industria a partir de diversos granos, principalmente trigo, maíz y arroz, sometidos a procesos por los que se consiguen que estallen, se expandan, se hinchen o se aplasten, de manera que estén listos para consumir. Conservan su valor nutricional y son más

digeribles que como grano entero y natural. Se presentan en forma de escamas, copos, filamentos, gránulos, etc. Con frecuencia se enriquecen con diversos ingredientes alimenticios con lo que puede aumentar considerablemente su valor nutricional y su acción dietética.

Hoy en día los cereales expandidos, son la base del desayuno de niños, jóvenes y adultos, y constituyen por sí mismos un buen alimento, completo y recomendable, son una de las formas más completas de consumir cereales y suelen venir complementados con vitaminas y minerales, de tal forma que 30 gr suministra aproximadamente el 25% de todos los requerimientos diarios de vitaminas y minerales en solo 114 Kcal. Contienen poca grasa, poco sodio y bastante fibra.
De acuerdo con cifras actuales, se registra que el consumo de cereales para el desayuno y cereales tipo snack ha ido en aumento, por lo tanto es una excelente vía de introducción de probióticos en la dieta habitual de las personas, lo que lo convierte en un potencial alimento funcional, la dosis recomendada diaria de cereal es de 30 g, por lo tanto este deberá contener al menos un número de unidades formadoras de colonias equivalente a $1x10^7$ UFC/g de cereal, donde UFC es unidades formadoras de colonia.

La presente invención propone usar protectores osmóticos y agentes filmógenos para proteger a las bacterias probioticas, especialmente, *lactobacillus rhamnosus*, y así maximizar su sobrevivencia, y así ser usados en forma eficiente como aditivo alimentario en alimentos sólidos deshidratados, preferentemente, hojuelas de maíz, para consumo humano. Lo anterior, estableciendo condiciones de aplicación para dicho protector osmótico y agente filmógeno, en el proceso de impregnación en cereales.

Se sabe que la flora intestinal es un gran conjunto de más de 100 trillones de bacterias con más de 400 especies que viven en el aparato digestivo de los seres humanos. Estos microorganismos se encuentran desde la boca hasta la parte final del intestino grueso, en donde cumplen con diversas funciones:

- Defender de infecciones.
- Ayudar a la digestión de algunos alimentos.
- Formar elementos nutritivos que contribuyen a que el organismo funcione adecuadamente.
- Contribuir a la producción de vitamina K (esencial en el proceso de coagulación), lo que ocurre cuando se ingieren alimentos (vegetales de hoja verde, raíces comestibles, frutas y semillas) que contienen precursores (que dan origen a la formación o desarrollo) de dicho nutriente.
- Estimular al sistema inmune (aquel que nos defiende de agresiones externas) para que trabaje adecuadamente.
- Utilizar la fibra de los alimentos para dar lugar a ácidos grasos, los cuales sirven como fuente de energía y mantienen en buen estado los tejidos del hígado, músculos y colon.

Cabe destacar que al momento de nacer el aparato digestivo humano es estéril, es decir, se encuentra libre de microorganismos, los cuales colonizan al intestino 48 horas después del alumbramiento, alcanzando cifras cercanas a 1010 microbios por gramo de heces. Este proceso se completa antes de los siete días de vida, periodo en el que puede considerarse que se posee flora intestinal establecida.

La flora está compuesta principalmente de un 86% de bacteroides, 6-9% eubacterias, 6-36% de bífidobacterias, 2-14% de peptococos, 5% enterobacterias, estreptococos y lactobacilos (Medina I (2002) Aislamiento, identificación y caracterización de

bífidobacterias presentes en heces de lactantes. Trabajo de Titulo, Carrera Licenciatura en Biología, Universidad de los Andes, Venezuela)

El balance de la flora intestinal depende de varios factores como la alimentación, los genes, el medio ambiente, tratamiento con antibióticos, estrés, uso de medicamentos, infecciones, edad, intervenciones quirúrgicas en el estómago o intestino, enfermedades hepáticas, renales y cáncer.

Los lactobacilos son fuerte competidores del espacio vital. Su método de acción es sencillo, se multiplican aceleradamente y obligan a los invasores a desaparecer ante falta de alimento, además de crean un ambiente ácido debido a la producción de ácido láctico, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas. (Escobar (2010) Desarrollo de una metodología de micro encapsulación de bacterias probióticas en un sistema Gelatina/Trehalosa. Trabajo de título, carrera Ingeniería Ejecución Química, Universidad de Santiago de Chile).

Para prevenir desequilibrios en la flora intestinal resulta eficaz recurrir a productos químicos o biológicos capaces de proteger a las bacterias que contribuyen al bienestar digestivo, un ejemplo son los probióticos que principalmente pueden encontrarse en bebidas, tabletas o polvo, y deben administrarse diariamente o según las indicaciones del fabricante.

De acuerdo a algunas fuentes, los pueblos nómadas de las regiones de Turquía, Asia central y Bulgaria transportaban leche fresca en sacos confeccionados con piel de cabra, y debido al contacto con este material y al calor se propiciaba la multiplicación de bacterias que fermentaban el alimento, volviéndolo una masa semisólida y coagulada.

Debido a su agradable sabor y a la facilidad que ofrecían para su transporte y conservación, estos productos se convirtieron en elemento fundamental para la alimentación local, por lo que no es de extrañar que justo ahí se acuñaran términos como yogurt (de origen árabe) o "leche búlgara". Asimismo, fue a través del consumo habitual que estos pueblos descubrieron virtudes mayores en los fermentos, como ayudar al buen funcionamiento del sistema digestivo y contribuir a la prevención de enfermedades intestinales. Pero las bacterias lácticas causantes de esta fermentación no fueron descubiertas, sino hasta 1857 por L. Pasteur.

En 1900, Moro cultiva por primera vez *Lactobacillus acidophilus*, a partir de heces de lactantes. En el mismo año, Tissier aisló una bacteria a partir de las heces de lactantes llamándola *Lactobacillus bifidus*.

En 1905, Grigoroff aisló de la leche búlgara fermentada el *Lactobacillus bulgaricus*. Este descubrimiento ganó importancia por los trabajos de Metchinikoff, quien a través de sus investigaciones demostró que este alimento era creado por bacterias capaces de convertir el azúcar de la leche (lactosa) en ácido láctico, y que a su vez esta sustancia hacía imposible el desarrollo en el intestino de microorganismos dañinos derivados de la descomposición de los alimentos. Tal descubrimiento le valió el Premio Nobel en 1908 y sentó las bases de la industria de alimentos novedosos.

En 1926, Orla-Jensen clasificó las bacterias lácticas en dos grupos según sus características bioquímicas: las homofermentativas y las heterofermentativas. Pero no fue hasta 1930, cuando el doctor japonés Minoru Shirota descubrió nuevas cepas o grupos de bacterias benéficas para el ser humano que no sólo generaban ácido láctico, sino que al consumirlas en cantidades importantes lograban alojarse

en el intestino por tiempo determinado y colaborar directamente con la flora intestinal.

Finalmente, el auge de los fermentos lácteos se ha elevado gradualmente desde los años 60 hasta alcanzar amplia demanda a partir de la última década del siglo XX y principios del siglo XXI, gracias a innovacíones tecnológicas que mejoraron los procesos de fabricación, pero también debido a la creciente población de individuos preocupados por llevar una dieta saludable y a la competencia entre distintas marcas y laboratorios, los cuales se dedican a perfeccionar el cultivo de diferentes especies de *Lactobacillus*, como *acidophilus*, *johnsonii*, *casei*, *fermentum*, *crispatus*, *reuteri*, *rhamnosus* o *plantarum*.

En lo que respecta a la morfología, los bacilos microaerófilos, gram positivos y catalasa negativos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares.

Los Lactobacilos homofermentativos dan lugar a ácido láctico como producto principal de fermentación. Este grupo está integrado por *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckü*.

Los Lactobacilos heterofermentativos producen además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y otro productos volátiles; *Lactobacillus fermenti* es heterofermentativo y es capaz además, de dar buen crecimiento a temperaturas elevadas (45ºC, 113ºF).

Respecto de la Fisiología, dado el tipo de respiración, los lactobacilos son anaerobios facultativos, debido a que algunas cepas pueden desarrollarse en

presencia de aire. Además, la temperatura óptima para su crecimiento varía según la especie, encontrándose para algunas de estas bacterias, la temperatura óptima en 45°C, mientras que en otras, dicha temperatura llega a los 30°C. Pero, no presentan crecimiento bajo los 20°C y sobre 46°C. En cuanto al pH, por ser bacterias productoras de ácido láctico, éstas sólo crecen en condiciones ácidas (pH<7), inclusive de extrema acidez.

En relación al metabolismo, según los productos de fermentación del azúcar, los lactobacilos se dividen en dos grupos. El grupo homofermentativo (Figura 1) que convierte el azúcar en ácido láctico y el grupo heterofermentativo (Figura 2) que además de producir ácido láctico, generan también dióxido de carbono, etanol y ácido acético (Escobar (2010) Desarrollo de una metodología de micro encapsulación de bacterias probióticas en un sistema Gelatina/Trehalosa. Trabajo de título, carrera Ingeniería Ejecución Química, Universidad de Santiago de Chile).

En cuanto a los requerimientos de nutrientes, sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no pueden cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero. Las necesidades individuales de aminoácidos varían de 2 a 15; en general, se requieren piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico, variando las necesidades en cada caso. Estos requerimientos nutritivos variados tienen aplicación práctica en técnicas de dosificación microbiológica de vitaminas y de algunos aminoácidos, para los cuales son más sensibles que los métodos químicos disponibles. En concentración adecuada, hay cierta relación definida, incluso lineal, entre la concentración de vitamina en un medio de cultivo adecuado, pero exento de vitamina, y el desarrollo o la cantidad de ácidos producidos. (Morales O. (2009) Propuesta de implementación para mejorar el rendimiento del

envasado de yogurt, en una fábrica de productos lácteos. Trabajo de Titulo, Ingeniería Mecánica Industrial, Universidad de San Carlos de Guatemala).

En particular, la especie de bacteria usada en el presente método es *Lactobacillus Rhamnosus*, un microorganismo probiótico descubierto como una sub especie de *Lactobacillus Casei*, que luego se concluyó que era una especie diferente. Este descubrimiento fue realizado por Sherwood Gorbach y Barry Goldin en 1983, lo que conlleva a que también sea conocida como LGG en honor a sus descubridores (Nicolai M, (2009) Estudio de condiciones de operación para maximizar viabilidad de bacterias probióticas en estado deshidratado. Trabajo de Titulo, carrera Ingeniería Civil Química. Universidad de Santiago de Chile).

Dentro de las características asociadas a esta bacteria, según la American Type Culture Collection (ATCC), se encuentra que no posee actividad antimicrobiana contra otras bacterias ácido lácticas y posee una buena adhesión a las glicoproteínas del íleon humano y a los productos con fibra de la dieta. También, es tolerante al pH bajo y a los fluidos pancreáticos y biliares.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens in vitro*; así como una actividad antilisteria cuando es aplicada como cultivo iniciador bioprotector de carne en embutidos secos, en etapas iniciales del proceso de maduración.

De especial importancia es el hecho que LGG sea clasificado como un microorganismo aerofilico, capaz de utilizar oxígeno en su proceso metabólico, pero que en concentraciones normales le resulta perjudicial.

Esta bacteria es aerotolerante, posee excelente viabilidad en yogurt durante cuatro semanas de almacenamiento a 4ºC y es útil en su producción, ya que es capaz de crecer durante la fermentación y además proporciona buenas propiedades organolépticas.

El crecimiento microbiano es un proceso autocatalítico: no habría crecimiento sin la presencia de al menos una célula viable y la tasa de crecimiento aumentará de acuerdo con la cantidad de biomasa viable presente. La pauta de crecimiento es la misma para bacterias y para hongos. Por tales razones es muy importante tener en cuenta la calidad de las materias primas para la elaboración de los alimentos (Virginia Leyva)

Las bacterias requieren ciertas condiciones para multiplicarse rápidamente, esta multiplicación rápida es la que causa problemas con relación a la seguridad del alimento. En condiciones ideales este crecimiento rápido puede llegar a un tiempo de generación menor de 20 minutos.

El intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una generación, el tiempo transcurrido para que esto ocurra se llama: tiempo de generación. Por tanto, el tiempo de generación es el tiempo que se requiere para que la población se duplique, razón por la cual, a veces, el tiempo de generación se llama tiempo de duplicación. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación comprendidos entre uno y tres horas, pero unas cuantas crecen muy rápidamente y se dividen en tan sólo diez minutos mientras que otras tardan varios días.

Si lleva a cabo un experimento para determinar el número de microorganismos en relación con el tiempo y después se representa una gráfica de logaritmo frente al tiempo, obtendremos la curva que se representa en la figura 3. El crecimiento bacteriano sigue cuatro fases. Cuando una población bacteriana se encuentra en un nuevo ambiente con elevada concentración de nutrientes que le permiten crecer necesita un período de adaptación a dicho ambiente.

La figura 3 representa el comportamiento durante la fase de crecimiento. Esta curva presenta las cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

La primera fase llamada también fase de adaptación o fase lag, conlleva a un lento crecimiento, donde las células se preparan para comenzar un rápido crecimiento, y una elevada tasa de biosíntesis de las proteínas necesarias para ello, como ribosomas, proteínas de membrana, etc. Esta depende además de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento.

La segunda fase de crecimiento, fase exponencial, se caracteriza por el crecimiento exponencial de las células. La velocidad de crecimiento durante esta fase se conoce como la tasa de crecimiento k y el tiempo que tarda cada célula en dividirse como el tiempo de generación g. Durante esta fase, los nutrientes son metabolizados a la máxima velocidad posible, hasta que dichos nutrientes se agoten.

La fase estacionaria se produce como consecuencia del agotamiento de los nutrientes en el medio. En esta fase las células reducen drásticamente su actividad metabólica y comienzan a utilizar como fuente energética aquellas proteínas celulares no esenciales. La fase estacionaria es un período de transición desde el rápido crecimiento a un estado de respuesta a estrés, en el cual se activa

la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, en el metabolismo antioxidante y en el transporte de nutrientes.

Finalmente una vez que las células han agotado completamente sus fuentes de nutrientes, comienzan a morir. Esta fase de muerte se caracteriza por la disminución continua de la población.

Entre los factores que afectan al crecimiento, es posible mencionar los siguientes:

- Efecto de la temperatura: Los microorganismos pueden clasificarse según el rango de temperaturas a las que crecen, como lo muestra la Tabla 1. Estos se clasifican en termófilos: aquellos que soportan condiciones extremas de temperatura relativamente altas; mesófilos: aquellos que tienen una temperatura media; y psicrófilos: aquellos que son capaces de vivir en temperaturas muy bajas.

Tabla 1: Clasificación de microorganismos según rango de temperaturas.

Clasificación	Rango
Termófilos	20 – 75 °C
Mesófilos	15 – 45 °C
Psicrófilos	4 – 30

- Efecto de los Nutrientes: Muchos microorganismos son capaces de utilizar de los alimentos los nutrientes y la energía que requieren para su desarrollo y en dependencia de los nutrientes que tenga un alimento en particular, éste se considerará de mayor o menor riesgo.

- Efecto del pH: En general, las bacterias crecen con mayor rapidez a pH

comprendido entre 6,0 y 8,0; las levaduras entre 4,5 y 6,0 y los hongos filamentosos entre 3,5 y 4,0.

- Efecto del potencial redox: En relación con los microorganismos, el potencial redox indica las relaciones de oxígeno entre los mismos y es utilizado para especificar el ambiente en que un microorganismo es capaz de generar energía y sintetizar nuevas células. Los microorganismos aerobios necesitan para crecer valores redox positivos (presencia de oxígeno), mientras que los anaerobios requieren valores redox negativos (ausencia de oxígeno). La mayoría de los microorganismos importantes para la salud pública en los alimentos, son facultativos, o sea, pueden crecer en presencia y ausencia de oxígeno.

Respecto de los tipos de probioticos, es posible mencionar que los alimentos suplementados por organismos vivos, que producen efectos beneficiosos en el huésped al mejorar el balance de la flora intestinal. Es decir incorporan microorganismos vivos, principalmente lactobacilos y bífidobacterias, que consumidos en cantidades suficientes deben producir efectos beneficiosos para la salud y el bienestar más allá de los efectos nutricionales habituales. El aporte principal de probióticos a la dieta se realiza a través de los productos lácteos fermentados, pero también se están introduciendo en zumos, preparados de cereales, etc.

En tanto los prebióticos son aquellos alimentos que incorporan ingredientes o sustancias no digeribles, fundamentalmente carbohidratos, que consumidos en cantidades suficientes deben producir efectos beneficiosos sobre la salud y el bienestar más allá de los efectos nutricionales habituales. La administración de hidratos de carbono no digeribles y la fermentación bacteriana de los mismos en el colon favorece el crecimiento selectivo de bífidobacterias y lactobacilos en detrimento del crecimiento de patógenos en la flora colónica. El aporte de prebióticos en la dieta se realiza bien por medio de alimentos naturales o incorporándolos a alimentos como productos lácteos, bebidas, pastelería, cereales, etc.

Los simbióticos en cambio son alimentos a los que se han incorporado componentes probióticos y prebióticos. Están representados fundamentalmente por los productos lácteos fermentados. Esta simbiosis tiene un efecto aditivo y hasta sinérgico positivo sobre la salud y el bienestar, así como sobre la prevención del riesgo de enfermedad.

Se sabe que la microbiota es clave para el estímulo del desarrollo y la función del sistema inmune y sus efectos imunomoduladores varían según el tipo de bacteria probiótica. La acción sobre el sistema inmune tiene algunas manifestaciones relevantes como es la estimulación de la producción de inmunoglobulina A, la posible participación en la regulación de la producción de citokinas, con un efecto estimulador sobre las antiinflamatorias y un efecto inhibidor sobre las proinflamatorias y en la acción de los receptores toll-like. (Leis y Tojo).

Los probióticos tienen una acción antagonista contra patógenos ya que compiten directamente con ellos por la ocupación de los nichos ecológicos. Al ser la adhesión un primer requisito de la colonización y de la invasión e infección, se evita la manifestación clínica de la patogenicidad. La adhesión de los probióticos

al moco intestinal puede potenciarse por la acción sinérgica entre varios de ellos como ocurre entre algunas especies de bífidobacterias y lactobacilos.

Los probióticos producen también sustancias antibacterianas (bacteriocinas) que actúan como antibióticos locales, con acción directa sobre los gérmenes patógenos, también producen inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas como son los ácidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno, y reducen la permeabilidad intestinal.

Asimismo, los probióticos producen nutrientes como vitaminas, ácidos orgánicos, aminoácidos, poliaminas, factores de crecimiento, antioxidantes y energía, y compiten con las bacterias patógenas por estos sustratos nutritivos a favor del huésped.

Igualmente, es sabido que el mercado de los cereales ha tenido un considerable aumento, este aumento en el consumo hace de los cereales un buen candidato como vía de administración de probióticos debido a que es un alimento de consumo diario y puede ser una alternativa frente a los productos lácteos a la hora de optar por un desayuno.

La dosis diaria recomendada para que los probióticos ejerzan efectos benéficos en la salud aún no está definida y varía según el tipo bacteria utilizada. Algunas normativas indican que los alimentos con adición de cepas de bacilos vivos (lactobacilos y bífidobacterias) deberán contener el 100% de la cantidad de bacilos vivos declarados al final de la vida útil del alimento y que el alimento deberá contener al menos $1x10^7$ UFC por gramo de producto terminado al final de su vida útil. Entonces para lograr que el cereal para el desayuno sea un alimento

funcional, este deberá contener como mínimo $1x10^7$ UFC/g de cereal de bacterias probióticas, donde UFC es unidades formadoras de colonia.

Se sabe que los microorganismos a fin de sobrevivir poseen mecanismos de adaptación, tanto fisiológicos como genéticos. Las bacterias están constantemente en contacto con sus alrededores, las barreras de la célula son permeables al agua, lo cual asegura que estas alcancen el equilibrio con el ambiente en que viven. En el caso de la adaptación de un estrés osmótico, los microorganismos en general logran la adaptación mediante la acumulación de solutos compatibles no iónicos como la trehalosa, glicerol, glucosa, sacarosa y manitol. Dichos solutos compatibles ayudan al balance de la presión osmótica y a la preservación de la función proteica dentro de la célula.

En este sentido, es necesario mencionar que el estrés no es exclusivo de los seres humanos ni de los animales superiores. Las bacterias también se estresan cada vez que su ambiente se modifica drásticamente. Y esta propiedad, la de estresarse ante ciertos entornos como la falta de agua o el exceso de sal, permite conocer más acerca de los procesos involucrados en la respuesta que da el organismo ante una “agresión” del medio.

El estrés osmótico es lo que le sucede a una célula cuando, por el fenómeno de ósmosis, el agua sale de su interior porque afuera hay una alta concentración de un soluto, como por ejemplo la sal, una bacteria padece estrés osmótico cuando hay un cambio en la salinidad del medio, o un diferencial de concentración en el medio.

Los lactobacillus son un poco más exigentes a la hora de ser cultivados. Requieren medios muy ricos en nutrientes y aminoácidos esenciales, y crecen

muy lentamente (MRS). Estos microorganismos participan en numerosos procesos útiles en la industria alimenticia, donde la sal es un factor importante, como por ejemplo, la producción de chacinados, quesos y yogures, entre otros.

Existen estudios de lactobacillus sobre su comportamiento en condiciones de estrés osmótico. En una situación de estrés, los lactobacillus cambian la estructura y composición de sus envolturas. Activándose una enzima (proteasa), que se encuentra en sus envolturas. Estas bacterias producen normalmente esa proteasa, debido a que no pueden sintetizar casi ningún otro compuesto, por lo tanto se ven obligadas a incorporar todo lo que encuentren afuera. Las proteínas en particular constituyen un elemento importante de su alimentación y tienen que ser degradadas para conseguir los aminoácidos; estos a su vez los utilizan también para generar la energía necesaria para su metabolismo.

El problema es que las proteínas son demasiado grandes y tienen una estructura globular que no les permite entrar a la célula. Por ello, deben ser cortadas en trocitos (péptidos) para que puedan ingresar al interior de la célula bacteriana. Para realizar ese recorte, la bacteria se vale de la proteasa de su envoltura, la cual, frente al estrés osmótico, incrementa su eficiencia y de este modo aumenta la concentración de péptidos intracelulares. En condiciones de estrés osmótico, esos péptidos no son degradados fácilmente y constituyen un buen osmoprotector.

La clave de este proceso de respuesta se encuentra en la pared celular que recubre a la bacteria, porque allí se producen importantes cambios, y ellos repercuten en las proteínas asociadas, como la proteasa, que se sobreactiva cuando se encuentra en ese entorno. (Sánchez C., Ruzal S., Laboratorio de estudios de estrés osmótico en bacterias Gram positivas. Departamento de

Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina).

Los cultivos de bacterias acido lácticas tienen mecanismos de protección de azucares, específicamente, los azúcares son reconocidos como protectores utilizados en la preparación de cultivos iniciadores secos. Estos aumentan la viabilidad de los cultivos durante el secado y almacenamiento.

Se ha estudiado el rol de los azúcares en la inducción de solutos compatibles, la reducción de lesiones térmicas y daño de la membrana durante el secado, la formación de matrices de azúcar cristalizada.

Por otra parte, la inducción de la acumulación de solutos compatibles u osmolitos, pequeños compuestos orgánicos que no interfieren con las funciones celulares, se utilizan para el ajuste osmótico. Estos compuestos incluso juegan un papel más allá del ajuste osmótico, como en la protección de la membrana celular y componentes celulares como las proteínas en la congelación, la desecación, y alta temperatura.

Los solutos compatibles incluyen aminoácidos (por ejemplo, glutamato, prolina) aminas cuaternarias (por ejemplo, betaína, carnitina), y algunos azúcares (como sacarosa, trehalosa). La presencia de solutos compatibles en las bacterias acido lácticas protegería a las células del estrés osmótico que ocurre durante un proceso de secado.

Se cree que el efecto protector de los solutos compatibles es debido a la exclusión preferencial de los solutos, el cual es el principal mecanismo de protección de las macromoléculas en los organismos contra la moderada pérdida de agua. La exclusión preferencial de soluto se puede definir como una situación en la que una

macromolécula tiene mayor afinidad por el agua que por el soluto, y por lo tanto el agua está presente en exceso en la superficie de la macromolécula. El daño a este nivel de extracción de agua puede surgir, por ejemplo, del aumento de la concentración total de soluto o sal, o un aumento en la concentración de proteínas a un nivel donde se producen las interacciones intermoleculares. (Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2007) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiology 25 (2008) 429–441. Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, Technische Universitat Munchen, Weihenstephaner)

En los procesos de secado térmico, además de la deshidratación, se puede producir la inactivación de cultivos debido a la alta temperatura. Sin embargo, cuando una suspensión de células se seca a altas temperaturas, muchos estudios han reportado que los azúcares protegen las células contra las lesiones térmicas. Por lo tanto se sugiere que el uso de azúcares como protectores térmicos puesto que pueden preservar las células contra el daño durante el secado.

Los microorganismos presentan aumentos en la resistencia al calor con la disminución de la concentración de agua mientras que la resistencia parece ser más pronunciada en ciertos rangos del agua. Se ha estudiado el efecto de protección térmica de los azúcares en función del contenido de humedad de células secas. Células liofilizadas fueron re humidificadas a diferentes contenidos de humedad y calentadas a 70ºC durante 100 horas. Los resultados mostraron claramente que las células con azucares maltosa y trehalosa presentan una mejor estabilidad térmica. (Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2007) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiology 25 (2008) 429–441. Chair for Food

Process Engineering and Dairy Technology, Technische Universitat Munchen, Weihenstephaner).

Asimismo, la capacidad de los azúcares para formar cristales se cree es un factor importante para la estabilización de las bacterias acido lácticas durante su almacenamiento.

Las reacciones de deterioro químico en el sistema de secado se ven afectados por los cristales, independientemente de la presencia de cristales de azúcar cerca de la superficie de la membrana Se cree que una matriz de cristal de azúcar puede mejorar la estabilidad de almacenamiento mediante el aumento de la T_g (Temperatura por debajo de las cuales la solución de azúcar se vitrifica) de la preparación del cultivo iniciador, y por lo tanto las células sobreviven mejor durante el almacenamiento en una condición dada.

Se cree que la alta viscosidad de los cristales bajo o alrededor de su Tg estabiliza y retarda la movilidad molecular y por lo tanto, disminuyendo la velocidad de reacción. Se indicó que la secuencia de la capacidad de protección de los azúcares sigue el orden de Tg (glucosa < sacarosa < maltosa < trehalosa). La Tg de los azúcares mencionados son 36, 67, 91, y 107º C, respectivamente (Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2007) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiology 25 (2008) 429–441. Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, Technische Universitat Munchen, Weihenstephaner).

Adicionalmente, la infusión al vacío se aplicaría para generar productos (esencialmente alimenticios) con cierta clase de densidad calórica, de bajo volumen de componente, elevado valor nutritivo y gran estabilidad (mayor

resistencia térmica) (Huerta S.A. (2006) Estudio de los factores que afectan el proceso de infusión al vacío para incorporación de aceite en alimentos acuáticos de alta energía para nutrición de salmones. Trabajo de Titulo, Carrera Ingeniería Civil Química, Universidad de Santiago de Chile).

La tecnología de infusión al vacío ha sido utilizada con el fin de incorporar componentes fisiológicamente activos dentro de estructuras de frutas, vegetales, quesos, carnes.

La tecnología de infusión al vacío de productos porosos consiste en el intercambio de gas interno contenido en los poros, o liquido ocluido en los poros abiertos, por una fase liquida externa. Dicho proceso se lleva a cabo por la acción de mecanismos hidrodinámicos promovidos por cambios de presión a los que se somete el producto a tratar (Fito P. (2000) Vaccum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering application in functional fresh food development. Journal of food Engineering. Food technology 49 (175-183) Department, Universidad Politécnica de Valencia, España).

La incorporación de probióticos en cereales para el desayuno, puede ser lograda mediante tecnología de infusión al vacío, la cual consiste en la impregnación de materiales porosos con líquidos de distinta naturaleza, mediante la aplicación de vacío por un tiempo determinado, y un posterior retorno paulatino a la presión normal, en un tiempo denominado de relajación o penetración (Espinoza (2007). Incorporación de microorganismos probióticos en cereales para el desayuno mediante tecnología de infusión al vacío. Trabajo de Titulo, Carrera Ingeniería Civil Química. Universidad de Santiago de Chile).

En el proceso de infusión al vacío, la impregnación es lograda mediante un cambio de gas-liquido. Dicho intercambio causa una rápida modificación en la estructura general del solido debido a un esfuerzo por retomar el estado inicial, mientras los poros permanecen llenos de líquidos. Esto es deseable para obtener una alta calidad en los productos deshidratados, limitando la duración del tiempo de impregnación tanto como sea posible (Zhao Y., Xie J. (2004) Practical Applications of Vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. Trends in food Science & Technology, Vol 15, 434 – 451).

Entre los factores que influyen en la infusión en matrices correspondiente a frutas y verduras, hay tres factores de importancia: salida del gas, deformación de la matriz sólida, el flujo líquido hacia el interior de dicha matriz, estos fenómenos son afectados por las características propias de la matriz solida porosa a inficionar.

- Estructura de tejido (tamaño y distribución de los poros).
- Tiempo de relajación de la matriz sólida, en función de las propiedades mecánicas del material.
- Presión de vacío.
- Velocidad de transporte de los mecanismos hidrodinámicos, como función de la estructura (tamaño y forma de los poros) y de la viscosidad de la solución.
- Tamaño y forma de la muestra.

El proceso de infusión al vacío y la calidad de los productos finales son determinados por las condiciones de proceso, incluyendo el tratamiento de las muestras, temperatura, composición y concentración de la solución, presión y tiempo de inmersión bajo el vacío, tiempo de restauración de la presión atmosférica, agitación, relación Liquido/Masa.

La selección de la solución impregnante a emplear en la infusión al vacío, debe considerar factores de importancia como: no toxicidad, características sensoriales, alta solubilidad, bajo costo, etc.

Entre los agentes protectores osmóticos, son preferibles los azúcares debido a sus precios relativamente bajos, químicamente de naturaleza inocua, y de uso común en la industria alimentaria. (Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2007) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiology 25 (2008) 429–441. Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology, Technische Universitat Munchen, Weihenstephaner).

Se emplea por ejemplo glicerol, etanol, trehalosa, glutamato monosódico, combinaciones de glucosa con sacarosa, glicerol con sacarosa, y sacarosa con sal. En muchos casos, se emplean soluciones de carbohidratos de bajo peso molecular para efectos de rápida penetración en las muestras (Espinoza (2007). Incorporación de microorganismos probióticos en cereales para el desayuno mediante tecnología de infusión al vacío. Trabajo de Titulo, Carrera Ingeniería Civil Química. Universidad de Santiago de Chile).

Entre las soluciones formadoras de películas para ingredientes alimentarios, existe una amplia variedad de materiales que pueden ser usados como cobertura en ingredientes alimentarios, donde se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones y gomas; algunos de los más efectivos son los aceites hidrogenados como el aceite de palma, algodón y soya, que son excelentes formadores de películas capaces de cubrir las partículas individuales. Otros materiales estudiados son los almidones de papa, maíz, trigo y arroz principalmente. Las dextrinas son formadas por el calentamiento de almidón, en

presencia de ácido o base, formando polímeros con alto grado de ramificación; comparadas con almidones no modificados, se mejoran sus características de solubilidad y viscosidad. Las maltodextrinas son obtenidas a partir de una hidrólisis parcial del almidón de maíz por vía ácida o enzimática; los polímeros de glucosa producidos pueden variar en longitud y en peso molecular; sus viscosidades son inferiores a las de la goma arábiga y no presentan grupos lipofílicos, por lo que sus propiedades emulsionantes son pobres. Sus ventajas incluyen sabor tenue, es posible su uso a altas concentraciones de sólidos y mejoran la vida de almacenamiento de aceites esenciales de cítricos; mezclas de sólidos de maíz, maltodextrinas y almidones modificados permiten una cobertura óptima.

Los alginatos son hidrocoloides extraídos de algas, los cuales reaccionan con iones calcio para la formación de geles estables; éstos son utilizados para atrapar sabores a temperatura ambiente.

La importancia de los alginatos como insumo para las industrias alimenticias, farmacéuticas y química en general, está dada por su propiedad hidrocoloide; esto es, su capacidad de hidratarse en agua caliente o fría para formar soluciones viscosas, dispersiones o geles. Los alginatos son, de esta manera, únicos en cuanto a sus propiedades como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadoras de películas; resultando un sinnúmero de aplicaciones.

En cuanto a documentos de patentes, es possible mencionar US2017000741 que se refiere a microcápsulas y su método de preparación, donde las microcápsulas comprenden un revestimiento polimérico que está al menos parcialmente reticulado con una matriz polimérica que comprende un polisacárido. En la matriz, un lípido y un agente activo o un profármaco o una sal del mismo están

incrustados, teniendo el lípido preferiblemente un punto de fusión de al menos 30ºC. Las microcápsulas pueden usarse como un medicamento, suplemento dietético o aditivo alimentario, las microcápsulas que comprende un recubrimiento polimérico que está al menos parcialmente reticulado con una matriz polimérica que comprende un polisacárido. Como anteriormente, un lípido y un agente activo o un profármaco o sal del mismo están incrustados en la matriz, teniendo el lípido preferiblemente un punto de fusión de al menos 30ºC. Útiles para tratar la diarrea o prevenir el cáncer de colon. El polisacárido se selecciona del grupo que consiste en pectinas, alginatos, carragenanos, xantano, gellan, tragacanto, ácido hialurónico, gomas, celulosas, almidones, agar, arabinoxilanos, curdlano, beta-glucano, glucomananos, pululano, sulfato de condroitina, dextranos, quitosanos, aminodextrano y dimetilaminodextrano y derivados de los polisacáridos mencionados anteriormente. El lípido incrustado tiene un punto de fusión de 30ºC a 80ºC, y en el que el lípido preferiblemente cristaliza al enfriarse en la forma cristalina beta prima. El agente activo es ácido butírico o un profármaco o una sal del mismo. El recubrimiento polimérico se retícula con la matriz a través de interacciones electrostáticas. Los polisacáridos presentes en la matriz están reticulados entre sí y/o consigo mismos a través de iones metálicos. Las microcápsulas tienen un tamaño de partícula medio en el intervalo de 0,1 a 5 mm, medido usando un calibrador digital. El recubrimiento polimérico no es esencialmente digerible por las enzimas humanas presentes en el tracto gastrointestinal superior. Las microcápsulas están adaptadas para que el agente activo no se libere en el tracto gastrointestinal superior, están adaptadas para que la liberación del agente activo tenga lugar en el colon. El revestimiento polimérico comprende un poliamino sacárido. Se divulga también suplemento dietético o aditivo alimentario que comprende dichas microcápsulas.

AgroLife Scietific Journal – Vol 3, No. 1, 2014 ISSN 2285-5718 ISSN CD-ROM 2285-5726 ISSN OnLine 2286-0126 ISSN-L 2285-5718 Microencapsulation in Food Products Petru ALexe, Cristian Dima menciona que microencapsular componentes bioactivos tales como vitaminas, peptidos, minerales, ácidos grasos, fitoesteroles, licopeno, antioxidantes, enzimas y células vivas para ser incorporados en alimentos, permite resguardar del deterioro a dichos componentes bioactivos.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser agregados como suplemento en la dieta, favorecen el desarrollo de la flora microbiana en el intestino. Actualmente, se encuentran incorporados en productos lácteos, sin embargo, cifras cercanas a un 50% de la población adulta chilena y un 90% de la población mundial sufre de intolerancia a la lactosa, por lo tanto se pretende desarrollar alimentos sustitutos capaces de contener dichos microorganismos probióticos, como es el caso de los cereales para el desayuno, cuyo consumo está en creciente aumento.

La presente invención propone usar protectores osmóticos y agentes filmógenos para proteger a las bacterias probioticas, especialmente, *lactobacillus rhamnosus*, y así maximizar su sobrevivencia, y así ser usados en forma eficiente como aditivo alimentario en alimentos sólidos deshidratados para consumo humano, preferentemente, cereal, aún más preferentemente, hojuelas de maíz. Lo anterior, estableciendo condiciones de aplicación para dicho protector osmótico y agente filmógeno, en el proceso de impregnación en cereales.

Así, la presente invención se refiere a un aditivo probiótico para alimento sólido deshidratado, preferentemente, cereal; método de preparación de dicho aditivo y alimento sólido deshidratado que lo contiene. En particular, el método propuesto permite aumentar la viabilidad de las bacterias probióticas impregnadas en alimentos sólidos deshidratados, preferentemente, cereales por medio de soluciones liquidas que buscan proteger las bacterias probióticas del estrés osmótico y térmico al que son sometidas en el proceso de elaboración del cereal.

La presente invención se refiere al área de los alimentos, preferentemente, a un aditivo probiótico para alimento sólido deshidratado, especialmente, cereal; método de preparación de dicho aditivo y alimento sólido deshidratado que lo contiene. Preferentemente, el aditivo probiotico es cubierto con al menos una capa de agente filmogenico y al menos una capa de agente protector osmótico, donde el agente filmogenico se selecciona de un hidrocoloide natural, preferentemente, alginato o un aceite de origen vegetal, y dicho agente protector osmótico se selecciona de una azúcar monosacárido o disacárido, preferentemente, dicho azúcar monosacárido es glucosa y dicho azúcar disacárido es trehalosa. Tanto el agente filmogenico como el protector osmótico pueden ubicarse en las capas, en forma alternada o en cualquier orden.

En particular, el método de la presente invención comprende dos etapas. Una primera etapa que comprende aislar la cepa *Lactobacillus Rhamnosus* para luego caracterizarla bioquímicamente, y una segunda etapa que comprende impregnar dicha bacteria en cereales hojuelas de maíz por el método de infusión al vacío, usando como vehículos líquidos: glucosa o trehalosa como protectores osmóticos y aceite de origen vegetal o alginato como agentes filmógenos. Los resultados de sobrevivencia fueron determinados haciendo uso de la técnica siembra en profundidad.

Se logró incorporar un valor de $3.2x10^7$ UFC/g de cereal, haciendo uso de una solución de glucosa al 5%, como vehículo de infusión y Alginato al 1% como agente filmógeno al cabo de 28 días de almacenamiento.

BREVE DESCRICPION DE LAS FIGURAS

Figura 1: Proceso homofermentativo de las bacterias ácido lácticas.

Figura 2: Proceso heterofermentativo de las bacterias ácido lácticas.

Figura 3: Curva de crecimiento para microorganismos.

Figura 4: Esquema del método de la presente invención.

Figura 5: Esquema del diseño preliminar del equipo donde 1 es válvula de ingreso vehículos líquidos de infusión, 2 es válvula de ingreso de aire, 3 es válvula de salida de aire, 4 es conector, 5 es vacuometro, 6 es rotor, 7 es cámara de vació, 8 es bomba de vació y 9 es línea de líquidos de infusión.

Figura 6: Fotografía de Tinción Gram violeta característica de *lactobacillus rhamnosus*.

Figura 7: Grafico que muestra las UFC/g de las bacterias probióticas infusionadas en cereales bajo las distintos factores de estudio v/s tiempo sin secado térmico.

Figura 8: Grafico que muestra las UFC/g de las bacterias probióticas infusionadas en cereales bajo las distintos factores de estudio v/s tiempo con secado.

Figura 9 Grafico de Pareto estandarizado para él % de sobrevivencia en día 0 de las bacterias *lactobacillus rhamnosus* bajo los factores de Protector Osmótico, Agente Filmógeno, Tipo de Aplicación y Secado.

Figura 10 Grafico de Pareto estandarizado para él % de sobrevivencia en día 14 de las bacterias *lactobacillus rhamnosus* bajo los factores de Protector Osmótico, Agente Filmógeno, Tipo de Aplicación y Secado.

Figura 11 Grafico de Pareto estandarizado para él % de sobrevivencia en día 28 de las bacterias *lactobacillus rhamnosus* bajo los factores de Protector Osmótico, Agente Filmógeno, Tipo de Aplicación y Secado.

Figura 12: Técnicas de siembra microbiológica

Figura 13: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Aceite Separado Sin Secado

Figura 14: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Aceite Separado Secado

Figura 15: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Aceite Junto Sin Secado

Figura 16: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Aceite Junto Secado

Figura 17: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Alginato Separado Sin Secado

Figura 18: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Alginato Separado con Secado

Figura 19: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Alginato Junto Sin Secado

Figura 20: Log(UFC/g) vs días, Glucosa Alginato Junto con Secado

Figura 21: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Aceite Separado Sin Secado

Figura 22: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Aceite Separado con Secado

Figura 23: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Aceite Junto Sin Secado

Figura 24: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Aceite Junto con Secado

Figura 25: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Alginato Separado Sin Secado

Figura 26: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Alginato Separado con Secado

Figura 27: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Alginato Junto Sin Secado

Figura 28: Log(UFC/g) vs días, Trehalosa Alginato Junto con Secado

Figura 29 Colonias de Lactobacillus Rhamnosus. Siembra de estrías. MRS- Agar

Figura 30: Colonias de Lactobacillus Rhamnosus. Siembra en profundidad. MRS-Agar

Figura 31: Cultivo Líquido de Lactobacillus Rhamnosus. Caldo MRS

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención propone usar protectores osmóticos y agentes filmógenos para proteger a las bacterias probioticas, especialmente, *lactobacillus rhamnosus*, y así maximizar su sobrevivencia, y así ser usados en forma eficiente como aditivo alimentario en alimentos sólidos deshidratados, preferentemente, hojuelas de maíz, para consumo humano. Lo anterior, estableciendo condiciones de aplicación para dicho protector osmótico y agente filmógeno, en el proceso de impregnación en cereales.

Así, la presente invención se refiere a un aditivo probiótico para alimento sólido deshidratado, preferentemente, cereal, y aún más preferentemente, hojuelas de maíz; método de preparación de dicho aditivo y alimento sólido deshidratado que lo contiene.

La presente invención se refiere al área de los alimentos, preferentemente, a un aditivo probiótico para alimento sólido deshidratado, especialmente, cereal; método de preparación de dicho aditivo y alimento sólido deshidratado que lo contiene. Preferentemente, el aditivo probiotico es cubierto con al menos una capa de agente filmogenico y al menos una capa de agente protector osmótico, donde el agente filmogenico se selecciona de un hidrocoloide natural, preferentemente, alginato o un aceite de origen vegetal, y dicho agente protector osmótico se selecciona de una azúcar monosacárido o disacárido, preferentemente, dicho azúcar monosacárido es glucosa y dicho azúcar disacárido es trehalosa.

La Figura 4 proporciona un esquema de la metodología desarrollada en la presente invención.

Para obtener la especie *Lactobacillus Rhamnosus* se utilizó el medio de cultivo Agar M.R.S. que fue desarrollado por Mano, Rugosa y Sharp para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

Tabla 2: Formulación Caldo de cultivo y Agar MRS para lactobacillus

Fórmula (en gramos por litro)	
Proteosa peptona	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	13.0

Se aseguraron condiciones asépticas para garantizar el éxito del aislamiento y la experimentación llevada a cabo. Se utilizaron mecheros bajo campana, los cuales proporcionan un radio de esterilidad de 30 cm aproximadamente. Antes de comenzar cualquier tipo de experiencia se limpia con alcohol al 70% la superficie de trabajo, por otro lado todos los elementos de trabajo a usar deben estar previamente autoclavados.

La cepa a utilizar, bacteria probiótica *lactobacillus rhamnosus*, se obtuvo de un producto probióitco individual de amplio consumo, y el aislamiento consistió en tomar una muestra del producto con un asa estéril y posteriormente se realiza una siembra en forma de estrías sobre placas petri que contiene medio MRS Agar para lactobacillus, luego se incubo a 37ºC por 48 horas, transcurrido el tiempo se identifican colonias aisladas de *Lactobacillus Rhamnosus*. Con la ayuda de una asa estéril se toma una colonia y se siembra en 80 mL de caldo de crecimiento MRS.

Una vez sembrada la colonia, se incubo en el agitador (N-Biotec Inc, modelo Nb-205) a 37ºC, 180 rpm y por 24 horas obteniéndose un inoculo concentrado llamado “caldo madre”. Figura 31.

En relación a la siembra o cultivo, ésta consistió en colocar a los microorganismos en un medio ambiente adecuado para que se desarrollen y multipliquen. Esta operación se realizó en forma aséptica sobre un medio de cultivo, mediante la siguiente técnica:

De medio sólido a sólido en placa de Petri.

1) Rotulando la placa con los datos correspondientes;
2) Flameando el asa para su esterilización;
3) Enfriando el asa en las paredes internas del tubo;

4) Tomando un inoculo del tubo problema;

5) Efectuando la siembra del tubo problema a la placa de petri estéril; para ello:

   a. Levantando la tapa de la placa lo necesario para introducir el asa.

   b. Imprimiendo al asa un movimiento de zig - zag, tocando superficialmente el medio de cultivo, procurando no romper el agar.

6) Tapando la placa y flameando el asa para su esterilización;

7) Incubando la placa sembrada a la temperatura adecuada.

Para las técnicas de aislamiento, se tomó el asa con la muestra y se procedió a hacer una estría zig-zag desde un extremo a otro de la placa. Sin esterilizar el asa se puede repetir la misma operación en una segunda o tercera placa para llegar a obtener colonias aisladas. Es preciso actuar con rapidez para evitar la contaminación con microorganismos presentes en el aire. Figura 13.

Entonces, para verificar la identidad de la bacteria aislada se realizaron los siguientes análisis bioquímicos.

- **Tinción gram:** esta prueba permite distinguir entre bacterias gram positivas y negativas dependiendo de la coloración que tome la muestra. Si la bacteria es positiva se tornará de un color violeta, en caso contrario, se tornará de un color rojo o rosa.

  En la primera etapa se extrae de una placa la colonia que se desea analizar y se mezcla con una gota de agua destilada situada en la superficie de un portaobjeto. A esta mezcla se le aplica calor de modo de fijar las bacterias en el portaobjeto y se procede a la primera etapa de la tinción, es decir, se le aplica cristal violeta y se espera que actúe por un minuto. Transcurrido el tiempo, se lava con agua destilada con el fin de eliminar el exceso de

colorante, cuidando que el chorro de agua no caiga directamente sobre la muestra.

La segunda etapa consiste en la aplicación de lugol por el mismo periodo de tiempo.

En la tercera etapa se decolora con etanol al 75%, etanol al 95%, acetona o alcohol-acetona, hasta que ya no escurra más colorante violeta. Posteriormente se lava con agua destilada y se aplica el colorante de contraste, safranina, dejando que actúe por un minuto. Para finalizar, se aplica el último lavado con agua y se seca.

- **Prueba de Catalasa:** Determina la presencia de la enzima catalasa. Una muestra de colonia, se deposita en un portaobjetos, se le agrega H_2O_2 al 3%, la formación de burbujas indica liberación de O_2 que es característico de un resultado positivo, por otro lado si no hay presencia de burbujas, se tiene un resultado negativo.

El reactivo de catalasa es una mezcla en partes iguales de tween 80 al 1% y peróxido de hidrógeno al 30%. Para conocer si un determinado microorganismo posee actividad catalasa, se coloca una gota de dicho reactivo sobre una colonia presente en placa petri y se observa si hay producción de burbujas o no, lo que indica si existe la degradación del peróxido.

- **Análisis morfológico:** En un microscópico óptico, se observan colonias aisladas utilizando un aumento de 100X.

El recuento en placa mediante siembra en profundidad que consiste en determinar el número de colonias presentes en una placa por 1 ml de muestra, fue utilizado en la presente invención. Para esto, se realizan diluciones seriadas a una muestra representativa del cultivo de interés, con el objetivo de disminuir la concentración y facilitar el posterior conteo bacteriano. Por ejemplo, para obtener una dilución de 10-1, se mezclan 100 µl de cultivo con 900 µl de agua destilada autoclavada, obteniéndose un volumen de 1 ml. Dicho volumen se vierte sobre una placa previamente esterilizada. Esta placa se cubre con 20 ml aproximadamente de MRS-Agar en estado líquido (45℃ aproximadamente), agitándola de manera tal que el inóculo quede uniformemente distribuido en el medio de cultivo. Luego que ocurra la gelificación, las placas se incuban a 37°C por un periodo de 48 h. El procedimiento se realiza por duplicado.

Para que no se produzca algún tipo de aglomeración de colonias que imposibilite el conteo celular, se recomienda sembrar las diluciones que se estimen representativas en cuanto al número de colonias presentes. Esta estimación se obtiene de la experiencia en el laboratorio y con la práctica.

Transcurrido el tiempo de incubación, se eligen las placas pertenecientes a una misma dilución que contengan entre 30 y 300 colonias, se determina la media aritmética y se multiplica por el factor de dilución correspondiente, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Biomasa\ \left(\frac{UFC}{g}\right) = n * f \qquad \text{A.1}$$

donde:

n: Media aritmética de las colonias por dilución

f: Factor de dilución

Para determinar el vehículo líquido de aplicación de las bacterias en el cereal por el método de infusión al vacío, determinar el mejor tipo de aplicación de los vehículos líquidos en cereal y su almacenaje, se tomaron en cuenta 4 factores con el fin de maximizar su viabilidad. Así, se realizó un diseño experimental multifactorial de cuatro factores en dos niveles, es decir 2^4 ensayos experimentales con su respectiva replica, Tabla 3.

Tabla 3: Factores de estudio para maximizar la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus*

SÍMBOLO	FACTORES	-1 (BAJO)	+1(ALTO)
A	Protector Osmótico (PO, A)	Glucosa	Trehalosa
B	Agente Filmógeno (AF, B)	Aceite	Alginato
C	Tipo de Aplicación (C)	Separado	Junto
D	Secado	Secado	Sin Secado

Para efectos de experimentación se prepararon, las siguientes soluciones presentadas en la tabla 4.

Tabla 4: Soluciones preparadas como Protector osmótico y Agente Filmógeno

	Solución	Concentración (%p/v)
Protector Osmótico (PO, A)	Trehalosa	2,5
	Glucosa	5
Agente Filmógeno (AF, B)	Aceite Comercial	-
	Alginato	1

Se preparó un concentrado de *lactobacillus rhamnosus* a partir del caldo madre antes mencionado, al 1%, la relación de caldo de cultivo MRS y aire presente en la

botella es 4:1, posteriormente se incuba por 24 horas a 37ºC con una agitación de 180 rpm en el equipo shaker.

Elegidos los factores a utilizar (Protector osmótico, agente filmógeno, tipo de aplicación) se procedió a la infusión al vacío de *Lactobacillus rhamnosus* en hojuelas de maíz, una vez terminada la infusión se procedió al cuarto factor de estudio, secado, el cereal seleccionado para el estudio fue hojuelas de maíz. Las condiciones de operación del equipo Infusión al vacío, se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Variables Operacionales aplicados en el equipo de infusión al vacío

Variables Operacionales Infusión al vacío	**Unidades**
Presión	0,8 bar
Relación $\frac{Volumen\ de\ Liquido\ (PO\ y\ AF)}{Masa\ de\ cereal}$	2/10
Relación $\frac{Protector\ Osmótico}{Agente\ Filmógeno}$	2/1
Tiempo	6 minutos
Velocidad de Agitación	90 rpm

Para que los cereales con probióticos sean considerados un alimento funcional debe contener 10^7 – 10^9 (UFC/g), por lo tanto se prepara un concentrado bacteriano con el fin de obtener en los cereales la cantidad de microorganismos requerido para el consumo diario.

Una vez obtenido el cultivo concentrado de *lactobacillus rhamnosus* se somete a centrifugación por 3700 rpm durante 5 minutos, se retira el medio de cultivo MRS, el concentrado de bacterias obtenidas se suspende en 10 mL del Protector Osmótico (Glucosa o Trehalosa), se homogeniza y reposo por 15 minutos para una mejor ambientación.

Los factores presentados en la tabla 4 (Protector Osmótico, Agente Filmógeno, tipo de aplicación, y secado) se genera una matriz aleatoria entregada por el software Statgraphics 5.1. Ver Tabla 6.

Tabla 6: Matriz aleatorias de niveles codificados del diseño experimental

Nº	Protector Osmótico	Agente Filmógeno	Tipo Aplicación	Con o Sin Secado
1	1	1	-1	-1
1	-1	1	-1	-1
1	1	-1	-1	1
1	1	-1	1	-1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	-1
1	-1	1	-1	1
1	-1	-1	1	1
1	1	1	-1	1
1	-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	1	-1
1	-1	1	1	-1
1	-1	-1	-1	1
1	-1	1	1	1
1	1	-1	1	1
1	1	-1	-1	-1
2	**-1**	**1**	**1**	**-1**
2	-1	-1	1	-1
2	-1	1	1	1

2	-1	1	-1	1
2	1	-1	1	-1
2	1	1	-1	-1
2	-1	1	-1	-1
2	1	1	1	-1
2	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1
2	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1	1
2	1	-1	-1	-1
2	1	-1	1	1
2	1	1	1	1

Con la matriz aleatoria, se da comienzo al proceso de enriquecimiento de cereales con probióticos mediante el método de infusión al vacío.

Los cereales son ingresados en la cámara de vacío donde se procede a aplicar vacío por un tiempo y presión determinados. Las condiciones de tiempo, presión, relaciones másicas y velocidad de agitación están dadas en la tabla 9. Inmediatamente después de aplicado el vacío, se procedió con el ingreso del protector osmótico que contiene las bacterias lactobacillus al sistema. Se otorgó un tiempo de 6 minutos a presión de vacío y agitación constante, con el fin de impregnar el total de los cereales con la solución liquida, transcurrido el tiempo, se procede el ingreso del agente filmógeno, se le otorgó un tiempo de 6 minutos a presión de vacío y agitación constante, con el fin de impregnar el total de los

cereales con el agente filmógeno. Luego de este tiempo, se detuvo el vacío y se retornó a la presión normal.

Para el tercer factor, es decir, Tipo de Aplicación, se preparó en un matraz una solución homogénea que contiene la bacteria *lactobacillus rhamnosus* con el protector osmótico y la solución liquida del agente filmógeno.

Los cereales hojuelas de maíz son ingresados a la cámara de vacío, se aplica vacío por un tiempo y presión determinado. Inmediatamente aplicado el vacío se procede con el ingreso de la solución homogénea que contiene las bacterias, el protector osmótico y agente filmógeno, se le otorgó un tiempo de 6 minutos a presión de vacío constante con el fin de permitir la impregnación de la solución en las hojuelas de maíz. Luego de este tiempo, se detiene el vacío y se retornó a la presión atmosférica en forma paulatina. Un esquema del equipo de infusor al vacío se presenta en la Figura 5.

Con el fin de eliminar la humedad presente en las hojuelas de maíz inmediatamente después del proceso de infusión al vacío, se procede al secado, es decir, el cuarto factor, a 45ºC con un flujo de aire constante de 5m/s, durante 15-20 minutos.

La humedad inicial del cereal, la humedad después de Infusionar, y la humedad después del secado, fue determinado por el Método de Secado al Horno. Para ello, se tuvo presente que el contenido de humedad de los alimentos varía enormemente y que el agua es un constituyente principal en la mayoría de los productos alimenticios. Entonces, el método usado se basó en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire (Binder, BD53). En este método la muestra se calienta

bajo condiciones específicas y la pérdida de peso de la muestra se utiliza para calcular el contenido de humedad de la misma. El tiempo requerido para el análisis puede ser de unos cuantos minutos hasta más de 24 horas.

Es sabido que el contenido de humedad de los alimentos varía enormemente. El agua es un constituyente principal en la mayoría de los productos alimenticios. El método para determinar la humedad en el presente invento, se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire. En este método la muestra se calienta bajo condiciones específicas y la pérdida de peso de la muestra se utiliza para calcular el contenido de humedad de la misma. El tiempo requerido para el análisis puede ser de unos cuantos minutos hasta más de 24 horas.

Así, el método de secado al horno, consistió en un análisis por duplicado, llevando a cabo los siguientes pasos:

1. Pesar la capsula que contendrá la muestra de cereales, con una aproximación de 0.1 mg. Registrar masas;
2. Pesar 5 g de muestra, previamente homogeneizada, en la capsula.
3. Colocar la muestra en la estufa a la temperatura de 105ºC y por un tiempo de 1,5 horas.
4. Empleando pinzas, trasladar la muestra a la balanza analítica (Arquimed, HR120), pesar la cápsula con una aproximación de 0.1 mg. Registrar masas

Los resultados fueron determinados mediante un conteo inicial de placas por siembra en profundidad de la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) presente en las destinas muestras para los días 0, 7, 14, 21 y 28 para cada ensayo entregado por la matriz aleatoria. Se utilizó el Software STATGRAPHICS PLUS 5.1, para la creación del diseño aleatoria de las corridas experimentales y análisis de respuestas.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Aislamiento del microorganismo

A partir del procedimiento antes descrito que comprende la preparación de un concentrado de *Lactobacillus rhamnosus* a partir del caldo madre, se obtuvieron colonias de microorganismos de interés. Esta especie en particular se caracteriza por formar colonias muy grandes, no presentando dificultades en su aislamiento.

Estas colonias fueron analizadas por pruebas bioquímicas: Tinción Gram y Prueba de Catalasa, como resultado se obtuvo una coloración violeta correspondiente a bacterias gram positivas, observadas en microscopio óptico con aumento 100x (Zeiss, KF2), Figura 6 y catalasa negativa. Dichos resultados corresponden a las características del microorganismo *Lactobacillus Rhamnosus*.

Ejemplo 2: Ensayo de Sobrevivencia

Para la realización del estudio se sobrevivencia de las bacterias probióticas infusionadas en hojuelas de maíz, se realizaron 16 ensayos experimentales en duplicado según la metodología antes descrita (ver tabla 3). La tabla 7 muestra cada número de ensayo con la combinación de factores.

Tabla 7: Condiciones de ensayo experimental de bacterias probióticas *lactobacillus rhamnosus* infusionadas en cereales

Ensayo	Condiciones
1	Glucosa Aceite Separado Sin Secado
2	Glucosa Aceite Separado con Secado
3	Glucosa Aceite Junto Sin Secado

4	Glucosa Aceite Junto con Secado
5	Glucosa Alginato Separado Sin Secado
6	Glucosa Alginato Separado con Secado
7	Glucosa Alginato Junto Sin Secado
8	Glucosa Alginato Junto con Secado
9	Trehalosa Aceite Separado Sin Secado
10	Trehalosa Aceite Separado con Secado
11	Trehalosa Aceite Junto Sin Secado
12	Trehalosa Aceite Junto con Secado
13	Trehalosa Alginato Separado Sin Secado
14	Trehalosa Alginato Separado con Secado
15	Trehalosa Alginato Junto Sin Secado
16	Trehalosa Alginato Junto con Secado

Una vez llevado a cabo los experimentos correspondientes al diseño experimental se obtuvieron los resultados mostrados en las figuras 7 y 8.

En la figura 7 se presenta las UFC/g presentes en los microorganismos impregnados en cereales, bajo los protectores osmóticos (Glucosa y Trehalosa), agentes filmógenos (Aceite y Alginato), tipos de aplicaciones (Junta o Separadas). Los ensayos mostrados en la figura 7 no presentan secado térmico al término de la infusión al vacío.

Para el estudio de la sobrevivencia de las bacterias probióticas en los cereales, se analiza la figura 7, específicamente para el día 0 y 28.

Para el día 0 todos los ensayos presentan valores superiores a 10^9 UFC/g y para el día 28, todos los ensayos presentan valores superiores a 10^7 UFC/g, por lo tanto todos son candidatos ser un alimento funcional. Glucosa y trehalosa son buenos osmoprotectores del estrés propio de las bacterias par al día 0, sin embargo se puede analizar cuáles son los mejores factores que aumenta la viabilidad de las bacterias en el día 28.

Los ensayos 3, 5, 13 y 15 presentan para el día 28 valores superiores a 10^8 UFC/g, (los ensayos restantes poseen valores superiores a 10^7 UFC/g pero inferiores a 10^8 UFC/g) de manera que el mejor agente filmógeno corresponde a Alginato, debido a que sus propiedades estabilizantes, gelificantes y formadoras de películas son superiores al aceite de origen vegetal, permitiendo reducir la movilidad y proteger las bacterias probióticas reduciendo su deterioro en el tiempo.

El tipo de aplicación de las soluciones liquidas en la infusión, no presenta un efecto significativo en el número de colonias presentes en las hojuelas de maíz.

En la figura 8 se presenta las UFC/g presentes en los microorganismos impregnados en cereales, bajo los protectores osmóticos (Glucosa y Trehalosa), agentes filmógenos (Aceite y Alginato), tipos de aplicaciones (Junta o Separadas). Los ensayos mostrados en la figura 8 presentan secado térmico al término de la infusión al vacío.

El proceso de secado térmico, se realizó con el fin de asegurar la estabilidad del producto (evitar contaminaciones, oxidación, etc.), disminuir el contenido de humedad de los cereales y lograr, bajo ciertas condiciones de secado, la inactivación de las bacterias probióticas.

Para el estudio de la sobrevivencia de las bacterias probióticas en los cereales, se analiza la figura 8, específicamente para el día 0 y 28.

Para el día 0 los ensayos 6 y 8 presentan valores del orden de 10^8 UFC/g, el efecto protector de la glucosa sobre la trehalosa en los ensayos 10, 12, 14 y 16 es predominante, por lo que este azúcar actúa como un crítico agente para la protección de la membrana celular durante condiciones de estrés térmico, y al daño a la membrana celular debido a que un alto nivel de extracción de agua pudiera ocurrir un aumento de la concentración total de soluto a un nivel donde se producen las interacciones intermoleculares. Por otro lado se puede inferir sobre la capacidad de los azúcares, en este caso glucosa, para formar cristales (vitrificación), siendo un factor importante para la estabilización de las bacterias probiótica durante su almacenamiento.

Para el día 28 los ensayos 6 y 8 presentan valores del orden de 10^7 UFC/g, (los ensayos restantes poseen valores inferiores a 10^7 UFC/g) de manera que el mejor agente filmógeno corresponde a Alginato, debido a que sus propiedades estabilizantes, gelificantes y formadoras de películas son superiores al aceite de origen vegetal, permitiendo reducir la movilidad y proteger las bacterias probióticas reduciendo su deterioro en el tiempo.

Las tablas siguientes muestran datos y resultados intermedios, que deben ser comprendidos en conjunto con las figuras que se indican:

Tabla 8: Unidades formadoras de Colonia por gramo, en los días 0, 7, 14, 21 y 28

Nº	Condiciones	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
1	Glucosa Aceite Separado Normal	9,00E+08	1,32E+08	6,80E+07	4,61E+07	3,80E+07
2	Glucosa Aceite Separado Secado	5,00E+07	1,95E+07	2,56E+07	2,61E+07	3,10E+06
3	Glucosa Aceite Junto Normal	2,74E+09	2,24E+08	2,30E+08	5,20E+07	3,00E+07
4	Glucosa Aceite Junto Secado	4,00E+07	2,07E+07	1,32E+07	1,09E+07	5,40E+06
5	Glucosa Alginato Separado Normal	2,83E+09	7,50E+08	4,80E+08	3,31E+08	1,53E+08
6	Glucosa Alginato Separado Secado	6,10E+08	3,94E+08	2,04E+08	1,11E+08	2,80E+07
7	Glucosa Alginato Junto Normal	2,12E+09	4,50E+08	4,00E+08	2,25E+08	5,00E+07
8	Glucosa Alginato Junto Secado	6,40E+08	2,84E+08	2,01E+08	1,10E+08	1,10E+07
9	Threaloza Aceite Separado Normal	9,60E+08	6,60E+07	4,21E+07	2,24E+07	1,84E+07
10	Threaloza Aceite Separado Secado	1,40E+07	1,07E+07	8,00E+06	9,00E+06	1,40E+06
11	Threaloza Aceite Junto Normal	1,21E+09	1,33E+08	5,80E+07	5,00E+07	4,40E+07
12	Threaloza Aceite	6,00E+06	1,67E+07	9,30E+06	9,50E+06	7,20E+05

	Junto Secado					
13	Threaloza Alginato Separado Normal	1,14E+09	9,00E+08	5,10E+08	2,90E+08	2,00E+08
14	Threaloza Alginato Separado Secado	7,00E+07	3,17E+07	2,30E+07	1,64E+07	4,13E+06
15	Threaloza Alginato Junto Normal	1,48E+09	4,70E+08	4,20E+08	2,90E+08	2,45E+08
16	Threaloza Alginato Junto Secado	3,10E+07	1,22E+07	1,25E+07	8,00E+06	3,33E+06
17	Glucosa Aceite Separado Normal	1,55E+09	2,61E+08	1,12E+08	7,80E+07	4,00E+07
18	Glucosa Aceite Separado Secado	4,50E+07	1,90E+07	2,90E+07	2,40E+07	1,80E+06
19	Glucosa Aceite Junto Normal	1,61E+09	2,54E+08	1,34E+08	1,30E+08	8,60E+07
20	Glucosa Aceite Junto Secado	8,00E+07	4,45E+07	1,60E+07	1,44E+07	3,00E+06
21	Glucosa Alginato Separado Normal	2,35E+09	6,40E+08	3,60E+08	3,35E+08	2,75E+08
22	Glucosa Alginato Separado	1,30E+09	3,55E+08	2,80E+08	1,86E+08	3,20E+07

	Secado					
23	Glucosa Alginato Junto Normal	1,35E+09	7,30E+08	8,00E+08	4,80E+08	6,80E+07
24	Glucosa Alginato Junto Secado	8,00E+08	2,78E+08	2,50E+08	1,50E+08	1,00E+08
25	Trehalosa Aceite Separado Normal	8,00E+08	8,80E+07	5,30E+07	2,89E+07	2,10E+07
26	Trehalosa Aceite Separado Secado	2,00E+07	1,50E+07	7,00E+06	7,70E+06	7,80E+05
27	Trehalosa Aceite Junto Normal	1,23E+09	1,05E+08	6,50E+07	3,50E+07	3,10E+07
28	Trehalosa Aceite Junto Secado	1,10E+07	1,45E+07	5,00E+06	5,50E+06	6,40E+05
29	Trehalosa Alginato Separado Normal	1,34E+09	5,75E+08	3,30E+08	2,25E+08	2,00E+08
30	Trehalosa Alginato Separado Secado	3,90E+07	1,53E+07	1,55E+07	1,40E+07	2,15E+06
31	Trehalosa Alginato Junto Normal	1,32E+09	5,35E+08	3,50E+08	3,45E+08	2,35E+08
32	Trehalosa Alginato Junto Secado	2,40E+07	1,28E+07	1,14E+07	9,80E+06	1,50E+06

Los datos para representación gráfica de los microorganismos fueron estandarizados. A modo de ejemplo, de la tabla B.1, para el ensayo Nº 1 se tiene que para el día 28, se obtiene $3,8x10^7$ UFC/g, para una mejor representación gráfica de los datos se aplica el logaritmo en base 10 a cada resultado con el siguiente ejemplo de cálculo: Log ($3,8x10^7$) = 7,58.

Estos datos son representados en la tabla 9 para el estudio de sobrevivencia.

Tabla 9: Logaritmo de las Unidades formadoras de Colonia por gramo, Log(UFC/g) en los días 0, 7, 14, 21 y 28 Ver Figuras 13 a 29

Nº	Condiciones	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
1	Glucosa Aceite Separado Normal	8,95	8,12	7,83	7,66	7,58
2	Glucosa Aceite Separado Secado	7,70	7,29	7,41	7,42	6,49
3	Glucosa Aceite Junto Normal	9,44	8,35	8,36	7,72	7,48
4	Glucosa Aceite Junto Secado	7,60	7,32	7,12	7,04	6,73
5	Glucosa Alginato Separado Normal	9,45	8,88	8,68	8,52	8,18
6	Glucosa Alginato Separado Secado	8,79	8,60	8,31	8,05	7,45
7	Glucosa Alginato Junto Normal	9,33	8,65	8,60	8,35	7,70
8	Glucosa Alginato	8,81	8,45	8,30	8,04	7,04

	Junto Secado					
9	Trehalosa Aceite Separado Normal	8,98	7,82	7,62	7,35	7,26
10	Trehalosa Aceite Separado Secado	7,15	7,03	6,90	6,95	6,15
11	Trehalosa Aceite Junto Normal	9,08	8,12	7,76	7,70	7,64
12	Trehalosa Aceite Junto Secado	6,78	7,22	6,97	6,98	5,86
13	Trehalosa Alginato Separado Normal	9,06	8,95	8,71	8,46	8,30
14	Trehalosa Alginato Separado Secado	7,85	7,50	7,36	7,21	6,62
15	Trehalosa Alginato Junto Normal	9,17	8,67	8,62	8,46	8,39
16	Trehalosa Alginato Junto Secado	7,49	7,09	7,10	6,90	6,52
17	Glucosa Aceite Separado Normal	9,19	8,42	8,05	7,89	7,60
18	Glucosa Aceite Separado Secado	7,65	7,28	7,46	7,38	6,26
19	Glucosa Aceite Junto Normal	9,21	8,40	8,13	8,11	7,93

20	Glucosa Aceite Junto Secado	7,90	7,65	7,20	7,16	6,48
21	Glucosa Alginato Separado Normal	9,37	8,81	8,56	8,53	8,44
22	Glucosa Alginato Separado Secado	9,11	8,55	8,45	8,27	7,51
23	Glucosa Alginato Junto Normal	9,13	8,86	8,90	8,68	7,83
24	Glucosa Alginato Junto Secado	8,90	8,44	8,40	8,18	8,00
25	Trehalosa Aceite Separado Normal	8,90	7,94	7,72	7,46	7,32
26	Trehalosa Aceite Separado Secado	7,30	7,18	6,85	6,89	5,89
27	Trehalosa Aceite Junto Normal	9,09	8,02	7,81	7,54	7,49
28	Trehalosa Aceite Junto Secado	7,04	7,16	6,70	6,74	5,81
29	Trehalosa Alginato Separado Normal	9,13	8,76	8,52	8,35	8,30
30	Trehalosa Alginato Separado Secado	7,59	7,18	7,19	7,15	6,33
31	Trehalosa Alginato Junto Normal	9,12	8,73	8,54	8,54	8,37

32	Trehalosa Alginato Junto Secado	7,38	7,11	7,06	6,99	6,18

Tabla 10 Factores y nivel de significancia

SÍMBOLO	FACTORES	-1	+1
A	Protector Osmótico	Glucosa	Trehalosa
B	Agente Filmógeno	Aceite	Alginato
C	Tipo de Aplicación	Separado	Junto
D	Secado	Secado	Sin Secado

El tipo de aplicación de las soluciones liquidas en la infusión, no presenta un efecto significativo en el número de colonias presentes en las hojuelas de maíz.

Ejemplo 3: Ensayos de humedad

Las muestras de cereales hojuelas de maíz antes de ser sometidas al proceso de infusión de vacío tal como fue descrito antes, son masadas para obtener la humedad luego de la infusión, los resultados se muestran en la tabla 11, por otro lado en la tabla 9 se presentan los valores de humedad después de Infusionar, como también la humedad final después del proceso de secado.

Tabla 11: Porcentaje de Humedad de las hojuelas de maíz, después de infusionadas para cada ensayo experimental

Nº	Condiciones	% humedad después de Infusionar
1	Glucosa Aceite Separado Normal	12,78%
3	Glucosa Aceite Junto Normal	11,40%

5	Glucosa Alginato Separado Normal	15,53%
7	Glucosa Alginato Junto Normal	11,92%
9	Trehalosa Aceite Separado Normal	15,60%
11	Trehalosa Aceite Junto Normal	14,50%
13	Trehalosa Alginato Separado Normal	12,90%
15	Trehalosa Alginato Junto Normal	12,63%
	Promedio:	**13,41%**

Tabla 12: Porcentaje de Humedad de las hojuelas de maíz, después de infusionadas y % Humedad presente en el cereal después del secado para cada ensayo experimental

Nº	**Condiciones**	**% humedad Después de Infusionar**	**% humedad después del secado**
2	Glucosa Aceite Separado Secado	13,59%	4,90%
4	Glucosa Aceite Junto Secado	13,66%	6,00%
6	Glucosa Alginato Separado Secado	14,00%	5,07%
8	Glucosa Alginato Junto Secado	12,40%	5,96%
10	Trehalosa Aceite Separado Secado	12,53%	5,98%
12	Trehalosa Aceite Junto Secado	13,09%	6,46%
14	Trehalosa Alginato Separado Secado	12,47%	5,35%
16	Trehalosa Alginato Junto Secado	12,77%	4,54%
Promedio:		**13,06%**	**5,53%**

5

Las hojuelas de maíz deben contener una humedad máxima de 7%, por lo tanto son sometidas a un secado térmico reduciendo la humedad hasta un valor promedio de 5,53%. De esta manera se puede comercializar como un producto deshidratado.

Para efectos de cálculo de humedad de las muestras de cereales impregnados con los líquidos de infusión, se utilizó la siguiente ecuación (1)

$$\%\ Humedad = \frac{masa\ cereal\ humedo - masa\ cereal\ seco}{masa\ cereal\ humedo} \quad (1)$$

Ejemplo de cálculo, para tabla 12, ensayo nº 1

$$\%\ Humedad = \frac{34{,}898 - 30{,}154}{34{,}898} x100 = 13{,}5\ 9\%$$

Sobrevivencia al día 0

En la tabla 13 se presentan los efectos correspondientes a los 4 factores de estudio junto con el valor P que determina la significancia de los efectos al día 0, los efectos significativos se pueden apreciar en la figura 9

Tabla 13: Efectos estimados y nivel de significancia de las variables sobre el número de microorganismos introducidos por gramo de cereal Log (UFC/g) en día 0

Variable	Efecto Log(UFC/g)	P-Valor
A Protector Osmótico	-0,589 +/- 0,061	0,0000
B Agente Filmógeno	0,481 +/- 0,061	0,0000
C Tipo Aplicación	-0,044 +/- 0,061	0,4834
D Secado	1,347 +/- 0,061	0,0000

Para este análisis los factores D, A, y B, presentan valores menores a 0,05 lo que indica que estas variables son significativas y puede afirmarse con un 95% de confianza que los valores de los factores D y B aumenta la sobrevivencia en 1,347 y 0,481 del Log(UFC/g) cuando cambian de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+), por otro lado, el factor A reduce la sobrevivencia en 0,589 Log(UFC/g) cuando pasa de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+), la variable C, posee un valor de P mayor a 0,05 por lo que no tiene significancia en el sistema., sin embargo podemos inferir que disminuye la respuesta en 0,044 Log(UFC/g) cuando va de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+).

Las colonias de bacterias lactobacillus las cuales se encuentran presentes en los cereales y que posteriormente son sometidas a un proceso de secado térmico se reducen, cierto número de bacterias no son capaces de soportar el estrés térmico, muriendo o quedando con daños en la membrana celular.

La glucosa es reconocida como fuentes de hidratos de carbonos y simultaneamente como protector osmotico. Sin embrago, la presente invención pone de manifiesto que la glucosa cumple una función más efectiva como protector osmótico de las bacterias lactobacillus en relación a la trehalosa, al menos en bacterias *lactobacillus rhamnosus* cultivadas en un medio MRS. Así, comparados entre sí ambos azúcares, la bacteria sufriría un menor estrés osmótico al ser impregnado con la glucosa como vehículo de aplicación en los cereales, sin embargo la bacteria probiótica al ser impregnada en el cereal con trehalosa como vehículo de aplicación, sufriría un mayor estrés osmótico debido a los gradientes de la osmolaidad de ambos azucares estudiados.

Comparados entre sí, los agentes filmógenos, el hidrocoloide natural, alginato, aumenta más la sobrevivencia que el aceite de origen aceite de origen vegetal, puesto

que efectivamente puede proveer de un efecto cobertor a las bacterias probióticas, logrando la inmovilización de las bacterias y de esta manera reduciendo el daño o la perdida celular de las bacterias que se encuentran bajo el osmoprotector.

Sobrevivencia al día 14

En la tabla 14 se presentan los efectos correspondientes a los 4 factores de estudio junto con el valor P que determina la significancia de los efectos al día 14, los efectos significativos se pueden apreciar en la figura 10

Tabla 14: Efectos estimados y nivel de significancia de las variables sobre el número de microorganismos introducidos por gramo de cereal Log (UFC/g) día 14

Variables	Efecto	P-valor
A:Protector Osmótico	-0,52 +/- 0,079	0,0000
B:Agente Filmógeno	0,712 +/- 0,079	0,0000
C:Tipo Aplicación	-0,002 +/- 0,079	0,9743
D:Secado	0,854 +/- 0,079	0,0000

Para este análisis los factores D, B, A presentan valores menores a 0,05 lo que indica que estas variables son significativas y puede afirmarse con un 95% de confianza que los valores de los factores D Y B aumenta la sobrevivencia en 0,854 log(UFC/g) y 0,712 log(UFC/g) respectivamente cuando cambia de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+) y por otro lado, el factor A reduce la sobrevivencia en 0,52 (UFC/g) cuando pasa de un nivel alto (+) a un nivel bajo (-), la variable C posee un valor de P mayor a 0,05 por lo que no tiene significancia en el sistema.

Las colonias de bacterias lactobacillus las cuales se encuentran presentes en los cereales y que posteriormente son sometidas a un proceso de secado térmico se

reducen, cierto número de bacterias no son capaces de soportar el estrés térmico, muriendo o quedando con daños en la membrana celular.

El efecto de los azucares cumple una función osmoprotector para el comienzo del proceso de infusión al vacío, día 0, sin embargo se puede inferir que las propiedades de vitrificación pueda ofrecer un buen protector a las bacterias probióticas de manera de inmovilizarlas y reducir su deterioro en su almacenamiento.

El agente filmógeno que aumenta la sobrevivencia es el alginato que efectivamente puede proveer de un efecto cobertor a las células, permitir su inmovilización reduciendo el daño o la perdida celular de las bacterias que se encuentran bajo el osmoprotector, en comparación al aceite

Sobrevivencia al día 28

En la tabla 15 se presentan los efectos correspondientes a los 4 factores de estudio junto con el valor P que determina la significancia de los efectos al día 28, los efectos significativos se pueden apreciar en la figura 11

Tabla 15: Efectos estimados y nivel de significancia de las variables sobre el número de microorganismos introducidos por gramo de cereal Log (UFC/g) día 28

Variables	Efecto	P-valor
A:Protector Osmótico	-0,392 +/- 0,1038	0,0012
B:Agente Filmógeno	0,699 +/- 0,1038	0,0000
C:Tipo Aplicación	-0,014 +/- 0,1038	0,8913
D:Secado	1,283 +/- 0,1038	0,0000

Para este análisis los factores D, B y A presentan valores menores a 0,05 lo que indica que estas variables son significativas y puede afirmarse con un 95% de

confianza que los valores de los factores D y B aumenta la sobrevivencia en 1,283 Log(UFC/g) y 0,699 Log(UFC/g) respectivamente cuando cambia de un nivel bajo (-) a un nivel alto (+) y por otro lado, el factor A reduce la sobrevivencia en 0,392 Log(UFC/g) cuando pasa de un nivel alto (+) a un nivel bajo (-),la variable C posee un valor de P mayor a 0,05 por lo que no tienen significancia en el sistema.

Las colonias de bacterias lactobacillus las cuales se encuentran presentes en los cereales y que posteriormente son sometidas a un proceso de secado térmico se reducen, cierto número de bacterias no son capaces de soportar el estrés térmico, muriendo o quedando con daños en la membrana celular.

El efecto de los azucares cumple una función osmoprotector para el comienzo del proceso de infusión al vacío, día 0, sin embargo se puede inferir que las propiedades de vitrificación pueda ofrecer un buen protector a las bacterias probióticas de manera de inmovilizarlas y reducir su deterioro en su almacenamiento.

El agente filmógeno que aumenta la sobrevivencia es el Alginato que efectivamente puede proveer de un efecto cobertor a las células, permitir su inmovilización reduciendo el daño o la perdida celular de las bacterias, en relación al aceite.

Tabla 16: Variables de operación y sobrevivencia al día 28

Variable	Variables optimas
A Protector Osmótico	Glucosa
B Agente Filmógeno	Alginato
C Tipo Aplicación	Sin observacíones
D Secado	Sin secado Térmico

Al comparar la presente invención con los resultados obtenidos en base a la misma experimentación anterior pero usando como usando como capa protectora de las bacterias probióticas en cereales, Glucosa 140 [mOSM] a temperatura ambiente., para obtener cereales con una incorporación de niveles altos de bacterias probióticas, esto es, *Lactobacillus rhamnosus*, en niveles promedio de 1E+09 [UFC/g]), se debieron usar las siguientes variables: Presión de Vacío (PV) = -0.8 [bar]; Relación líquido a infusionar : masa de cereal (LC) = 2/10 [mL/g]; tiempo de vacío (tV) = 4[min]; R = 90[rpm]. Para lograr un porcentaje de sobrevivencia a los 7 días de almacenaje es 28.1% para *Lactobacillus rhamnosus* en cereales, se debió usar las siguientes variables de proceso de infusión: PV= -0.8 [bar]; LC = 1/10 [mL/g]; tV = 2[min]; R = 60[rpm] (Tesis Valeria Espinoza, Universidad de Santiago).

REIVINDICACIONES

1. Aditivo probiotico para alimento solido deshidratado caracterizado porque comprende un probiotico cubierto con al menos una capa de azúcar monosacárido o disacárido como protector osmótico y al menos una capa de un hidrocoloide natural o un aceite de origen vegetal como agente filmogenico.

2. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho azúcar monosacárido se selecciona de glucosa.

3. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho azúcar disacárido se selecciona de trehalosa.

4. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque hidrocoloide natural es alginato.

5. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho azúcar monosacárido es trehalosa y dicho hidrocoloide natural es alginato.

6. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho azúcar monosacárido es glucosa y dicho agente filmogenico es un aceite de origen vegetal.

7. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho azúcar disacárido es trehalosa y dicho agente filmogenico es un aceite de origen vegetal.

8. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho probiotico es *lactobacillus rhamnosus*.

9. El aditivo probiotico de la reivindicación 1 caracterizado porque dichas capas pueden alternarse o estar presente en cualquier orden.

10. Alimento solido deshidratado caracterizado porque comprende un cereal y el aditivo probiotico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

11. El alimento sólido deshidratado de la reivindicación 9 caracterizado porque es cereal.

12. El alimento sólido deshidratado de la reivindicación 9 caracterizado porque es hojuela de maíz.

13. Método para preparar alimento sólido deshidratado con probioticos recubiertos caracterizado porque comprende adicionar por infusión al vacío, el aditivo probiotico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores a un alimento deshidratado sólido.

14. El método de la reivindicación 12 caracterizado porque dicho alimento deshidratado sólido es cereal.

15. El alimento sólido deshidratado de la reivindicación 13 caracterizado porque dicho cereal es hojuela de maíz.

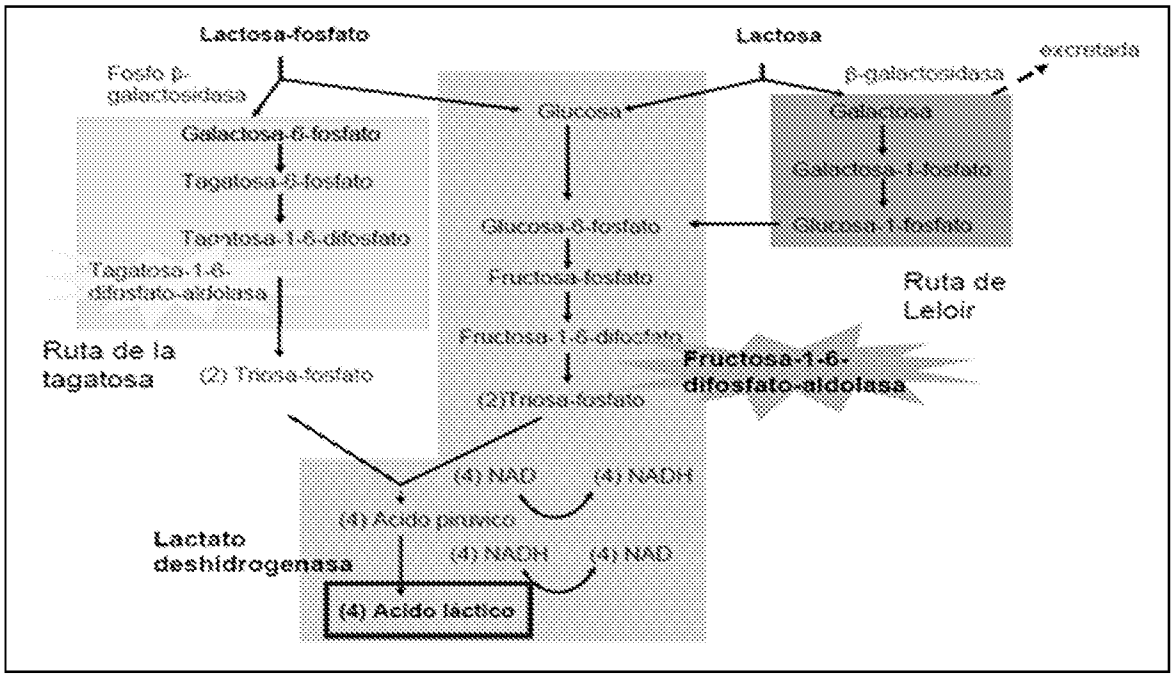

Figura 1

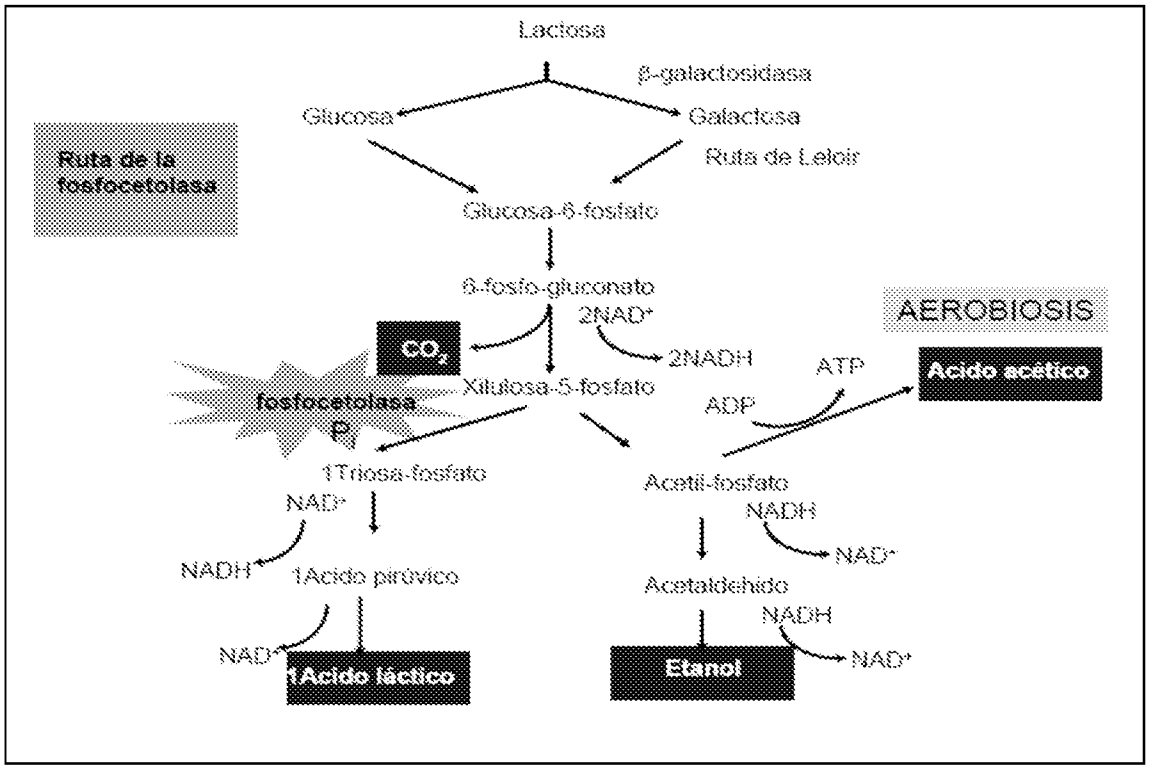

Figura 2

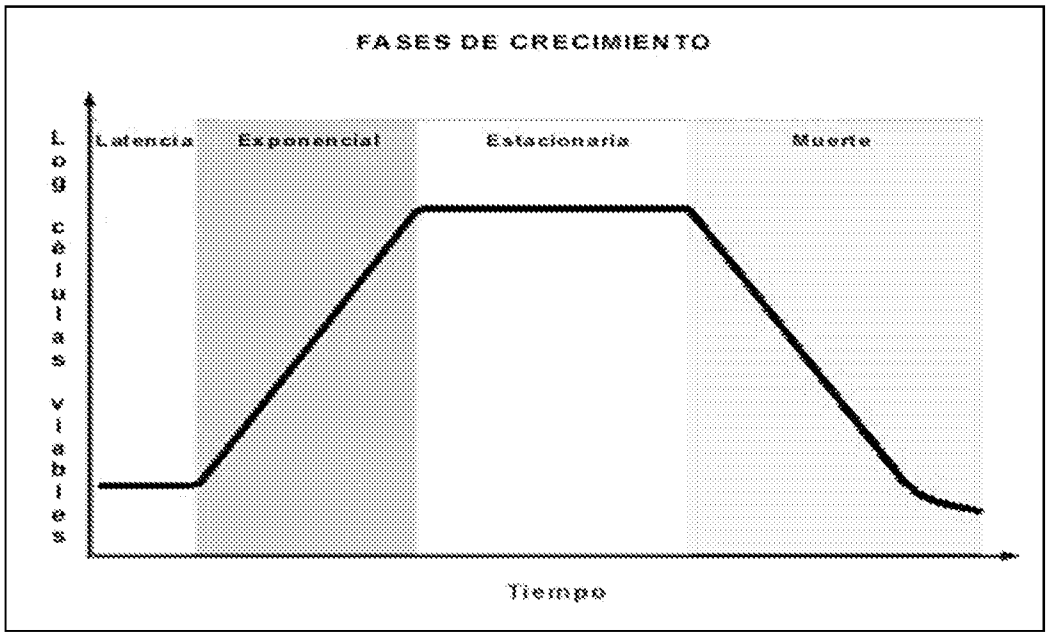
FASES DE CRECIMIENTO
Latencia
Exponencial
Estacionaria
Muerte
Log células viables
Tiempo

Figura 3

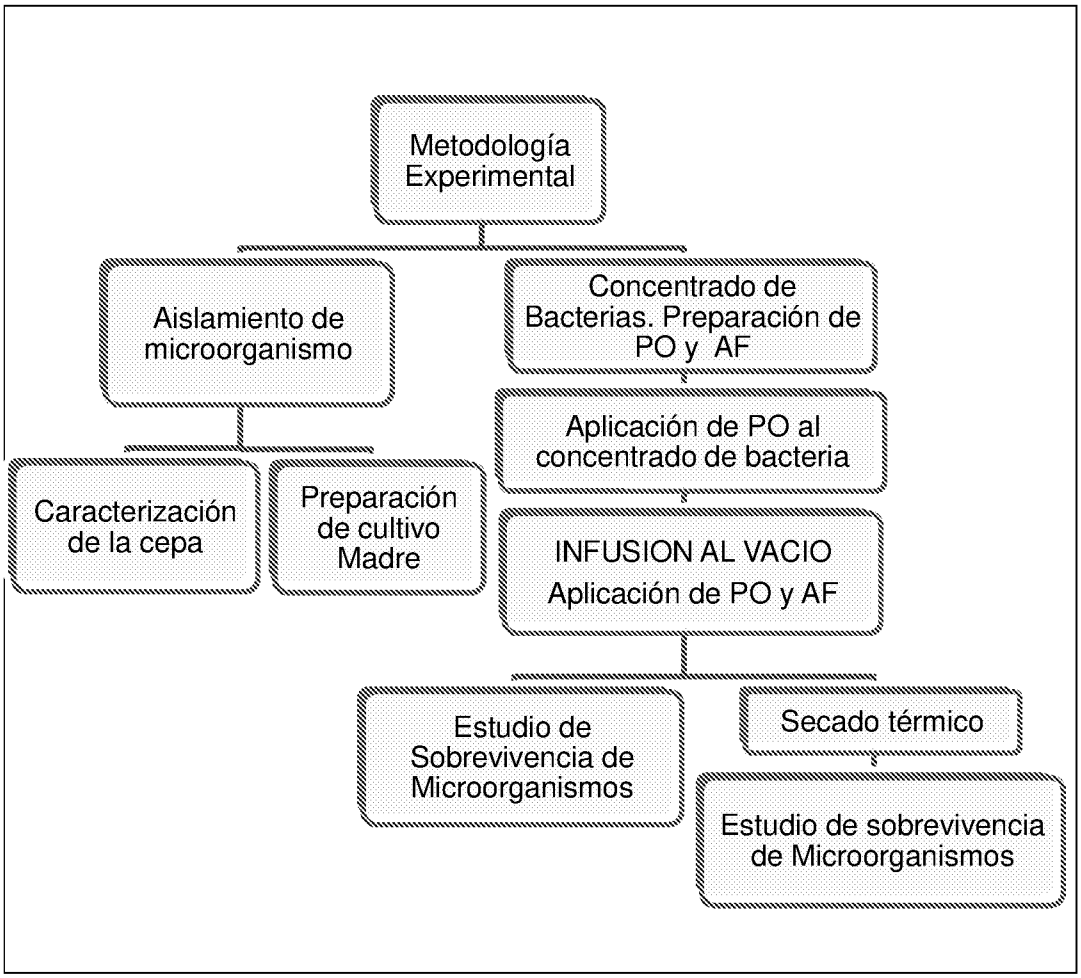
Metodología Experimental
Aislamiento de microorganismo
Concentrado de Bacterias. Preparación de PO y AF
Aplicación de PO al concentrado de bacteria
Caracterización de la cepa
Preparación de cultivo Madre
INFUSION AL VACIO
Aplicación de PO y AF
Estudio de Sobrevivencia de Microorganismos
Secado térmico
Estudio de sobrevivencia de Microorganismos

Figura 4

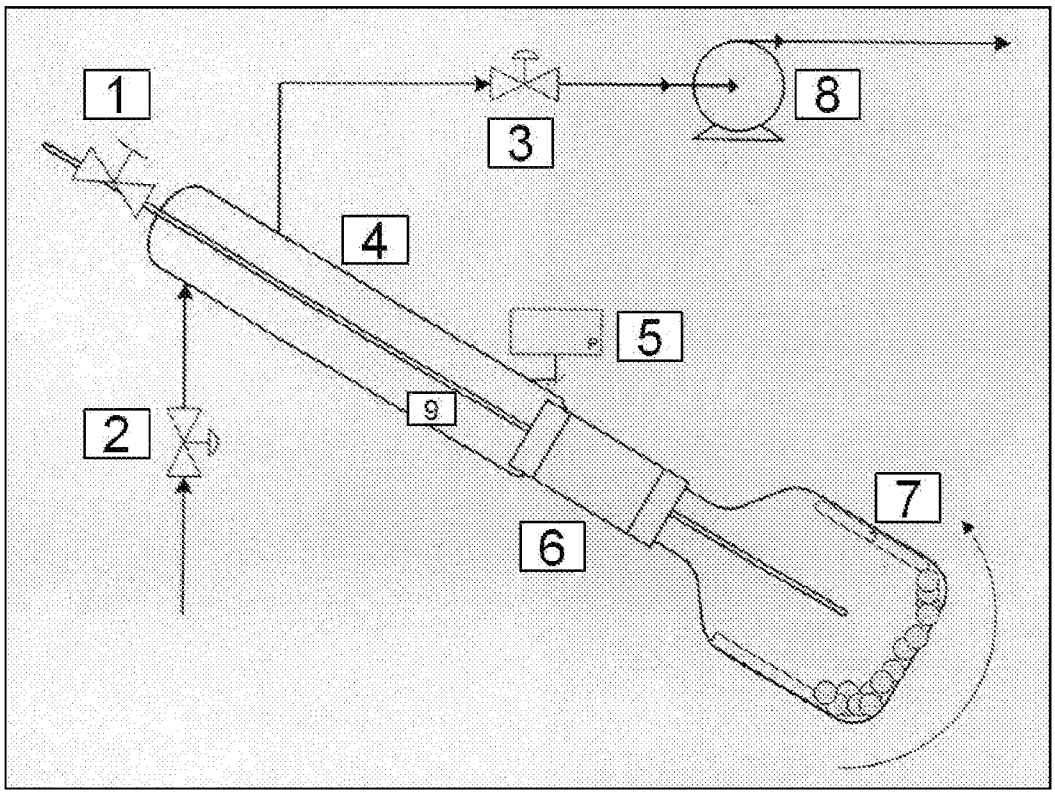

Figura 5

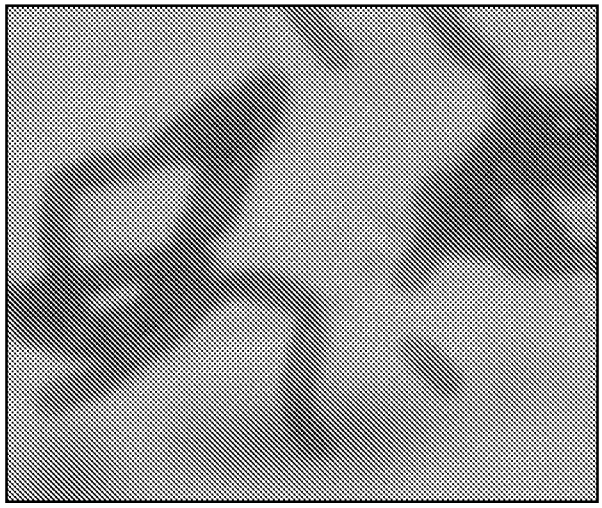

FIGURA 6

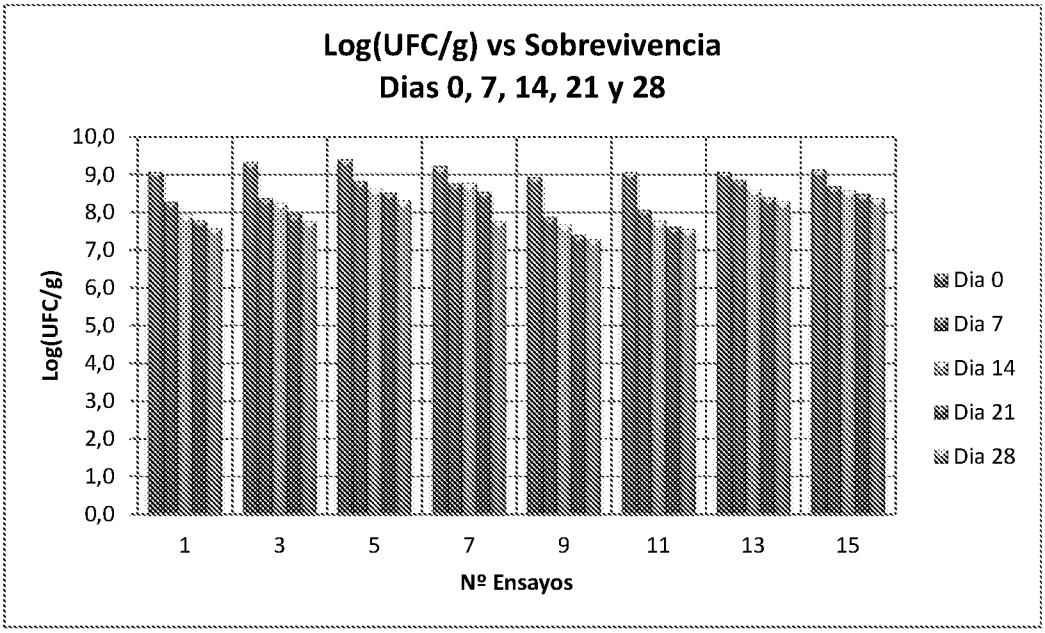

Figura 7

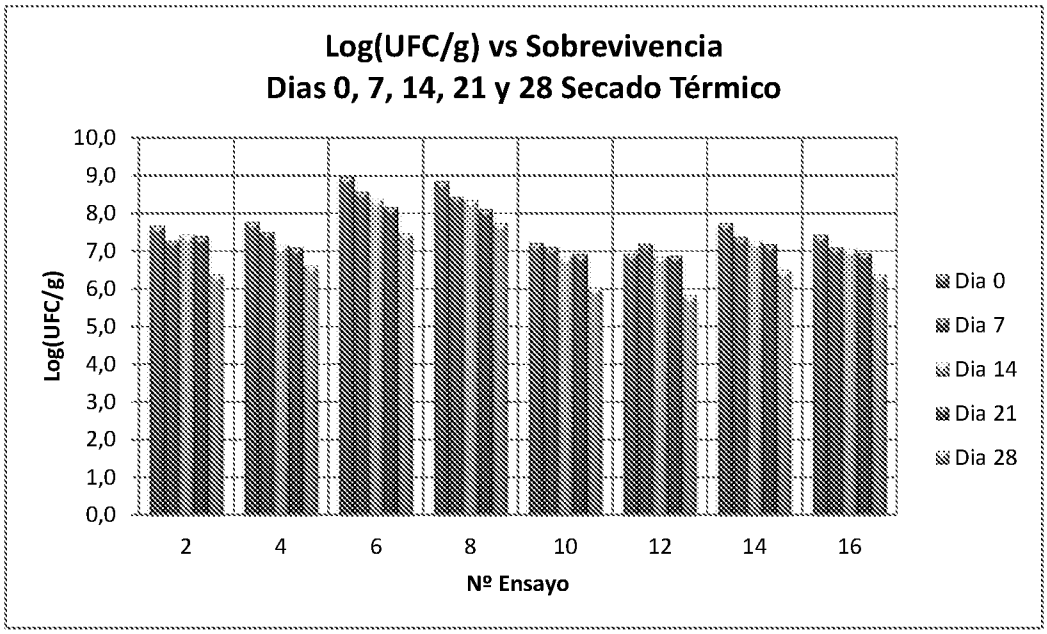

Figura 8

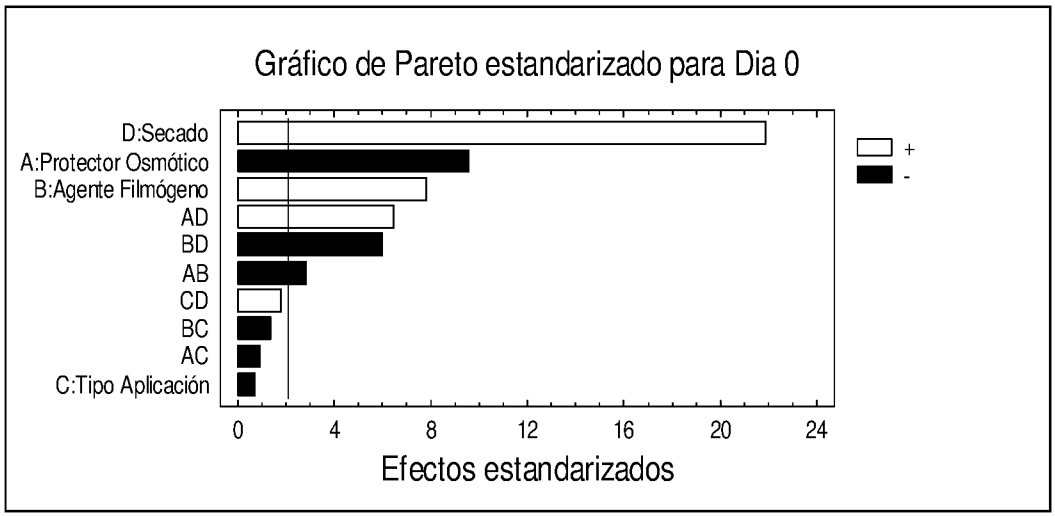

Figura 9

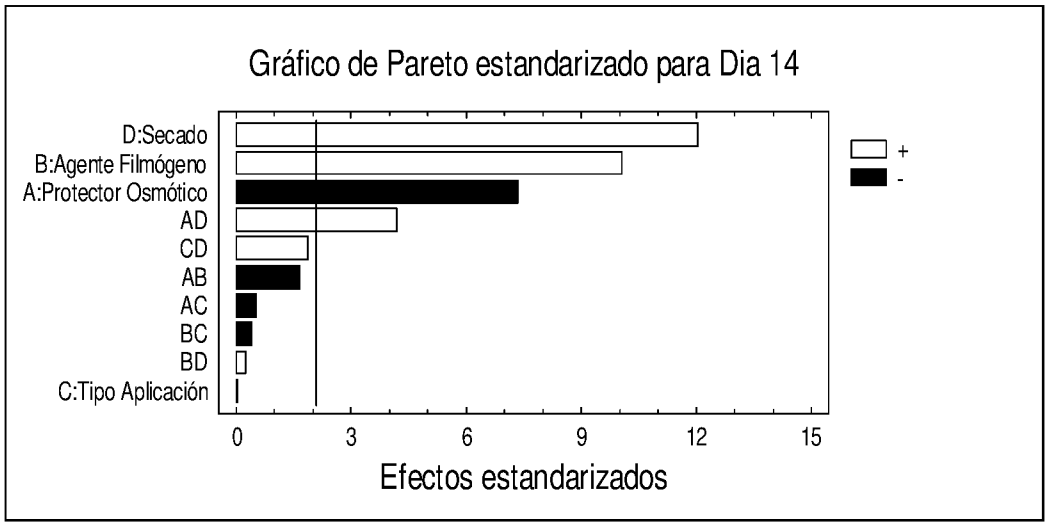

Figura 10

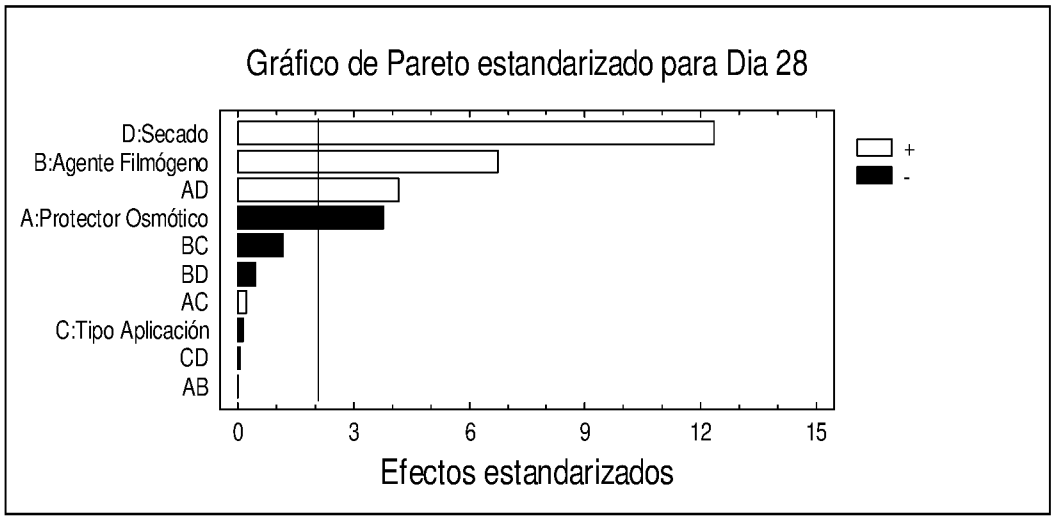

Figura 11

5

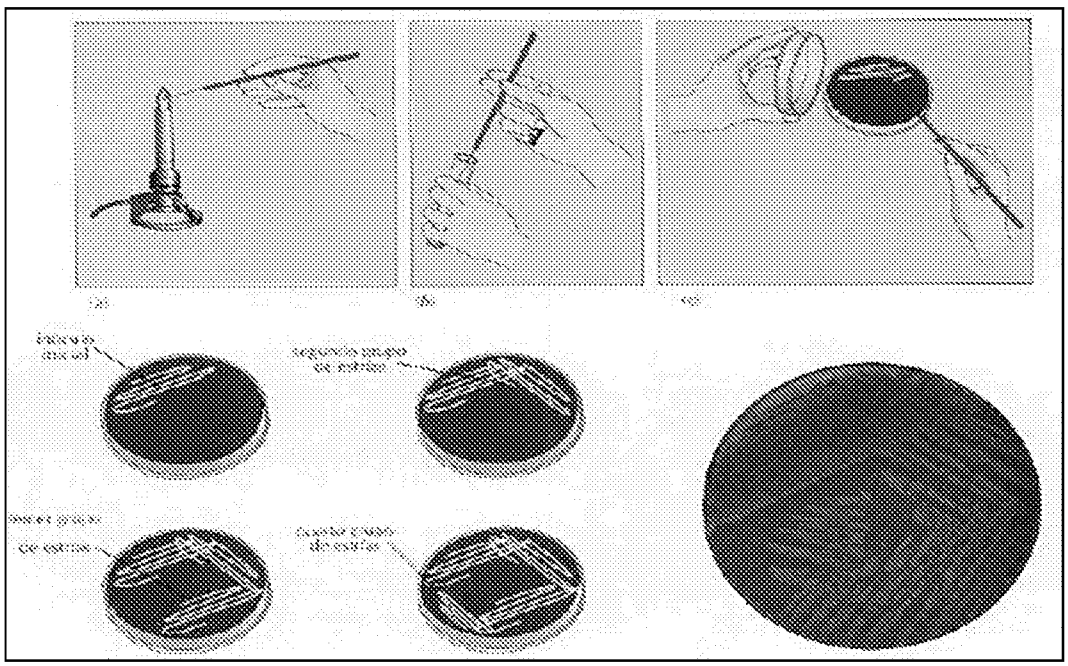

Figura 12

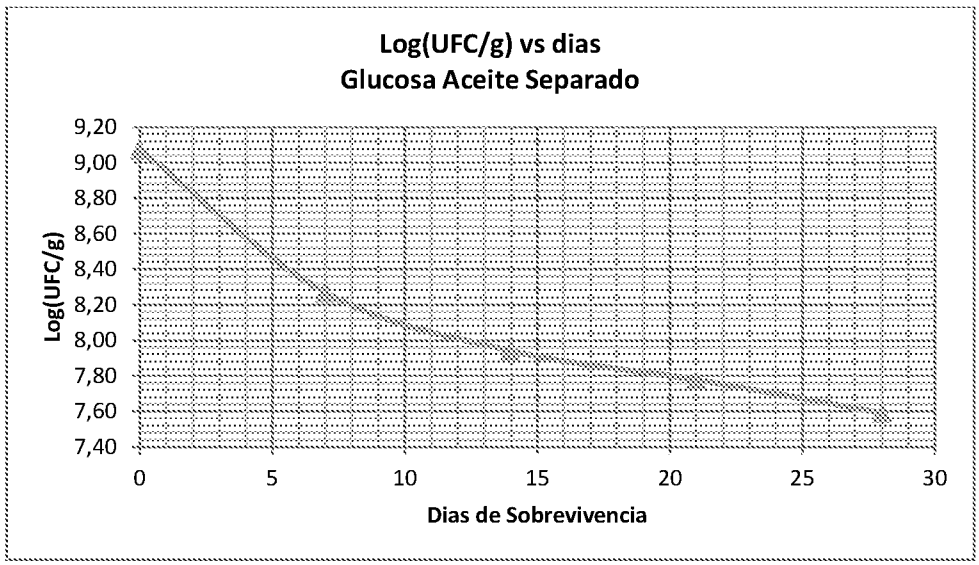

Figura 13

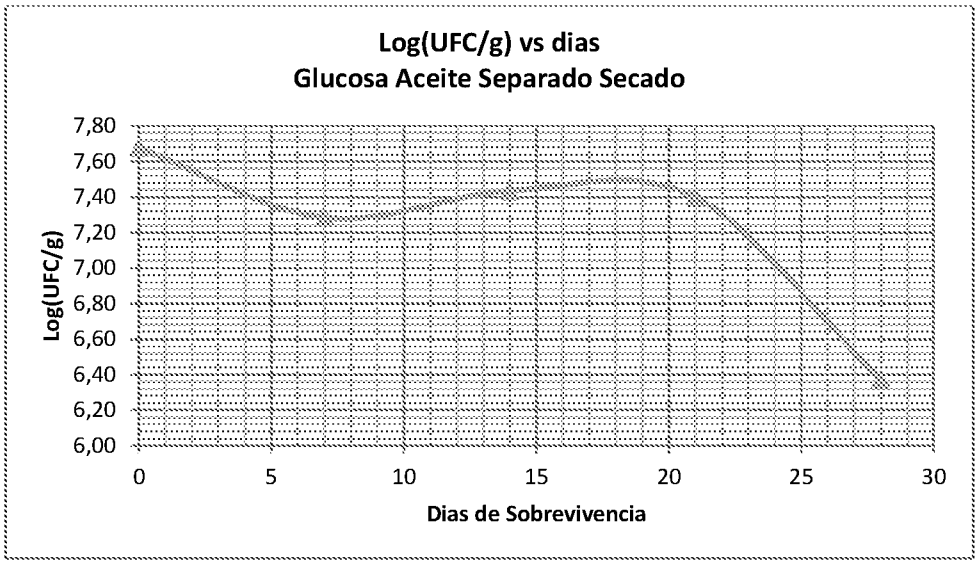

Figura 14

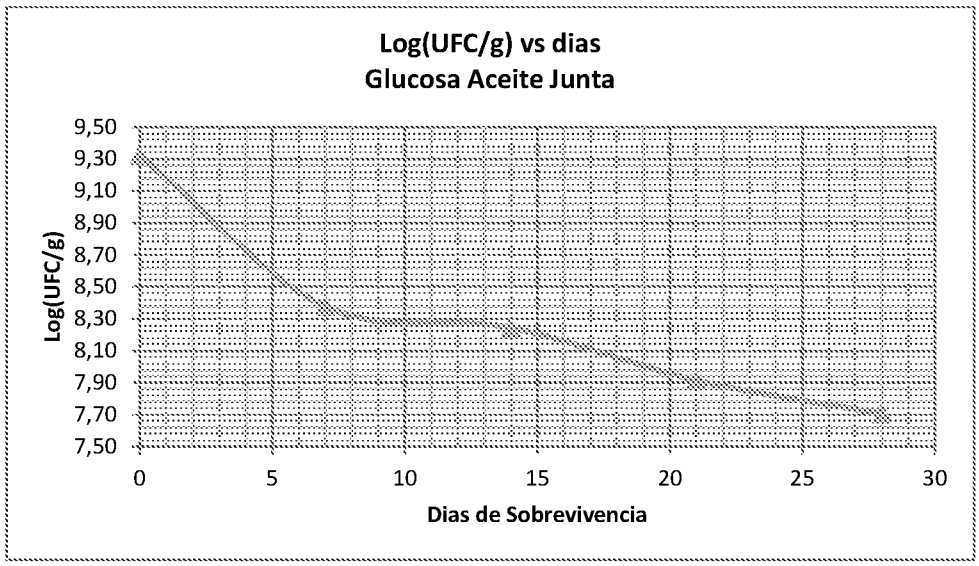

Figura 15

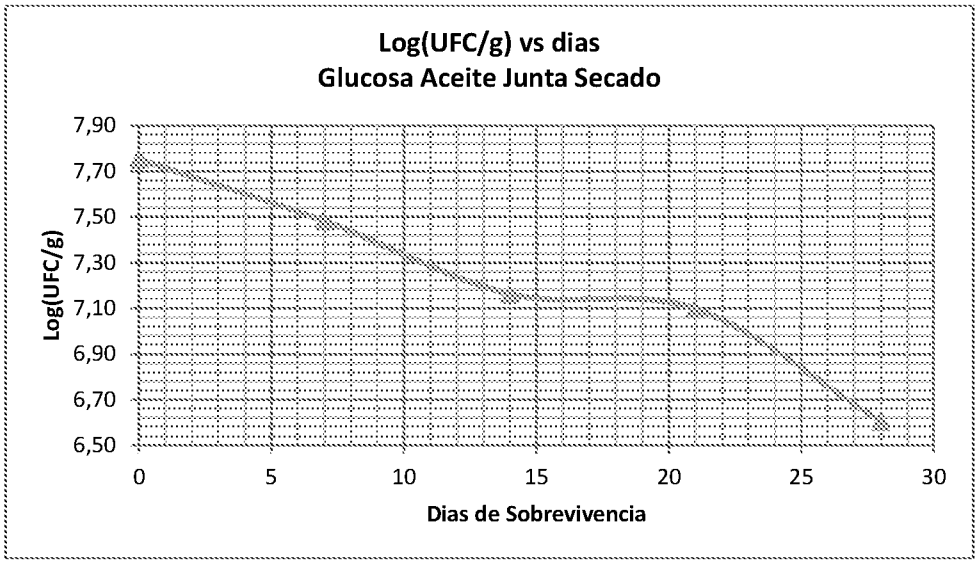

Figura 16

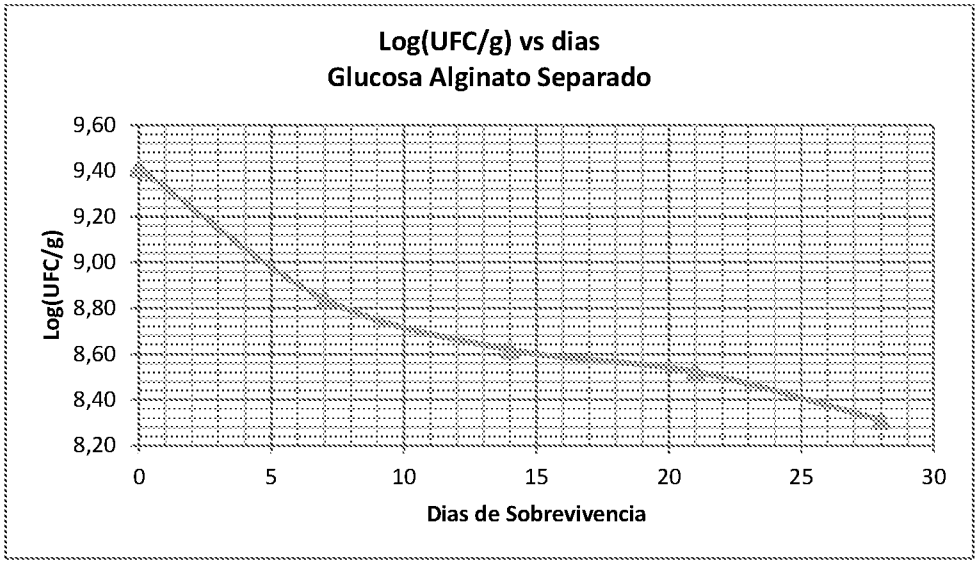

Figura 17

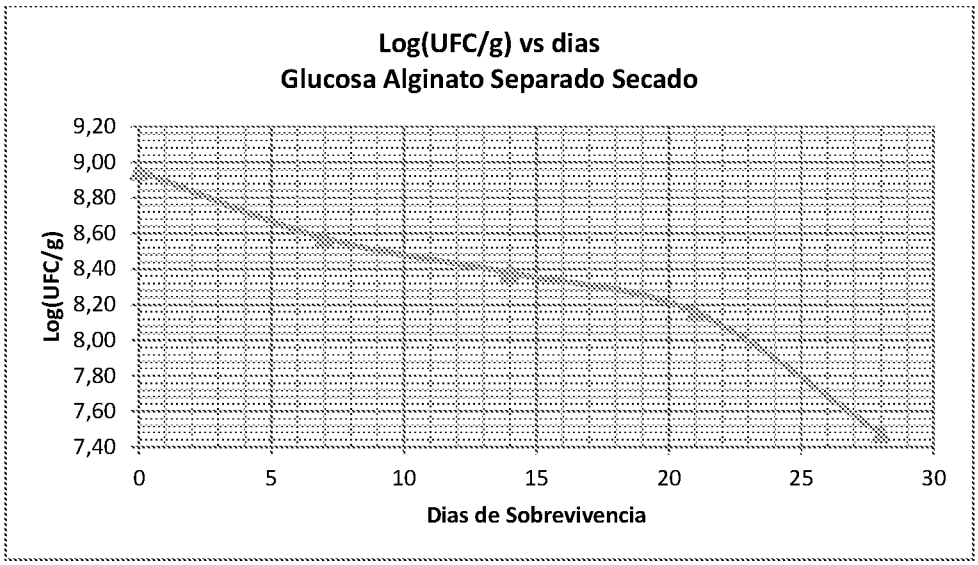

Figura 18

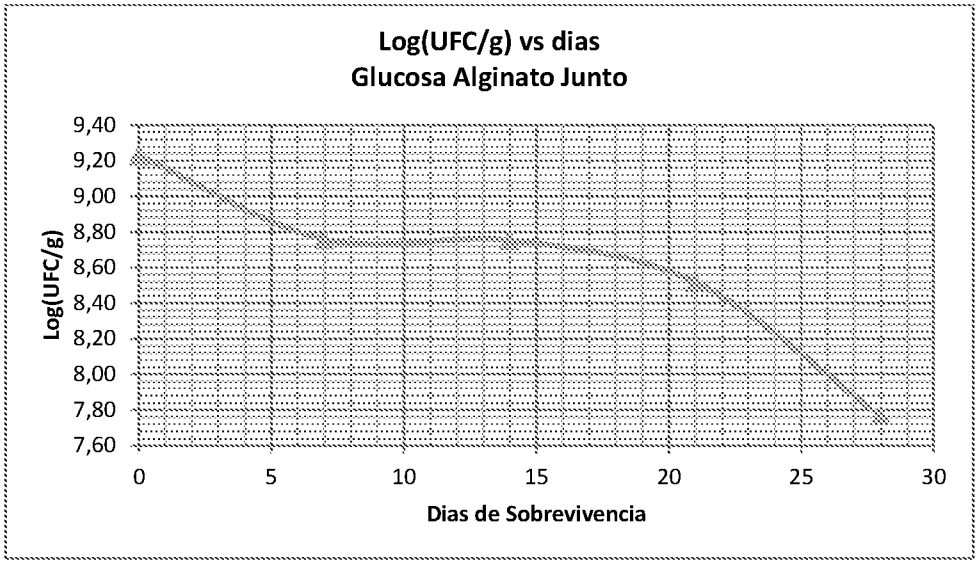

Figura 19

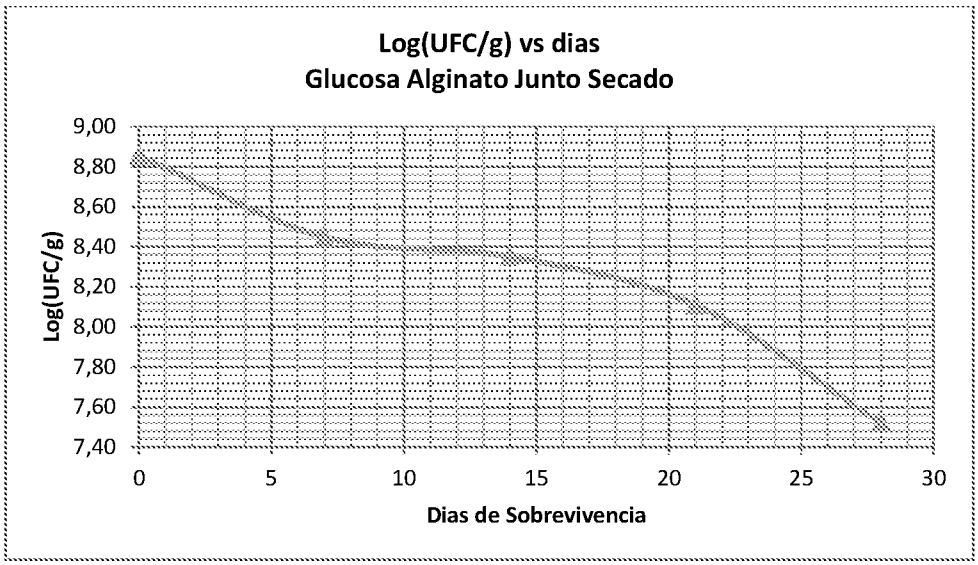

Figura 20

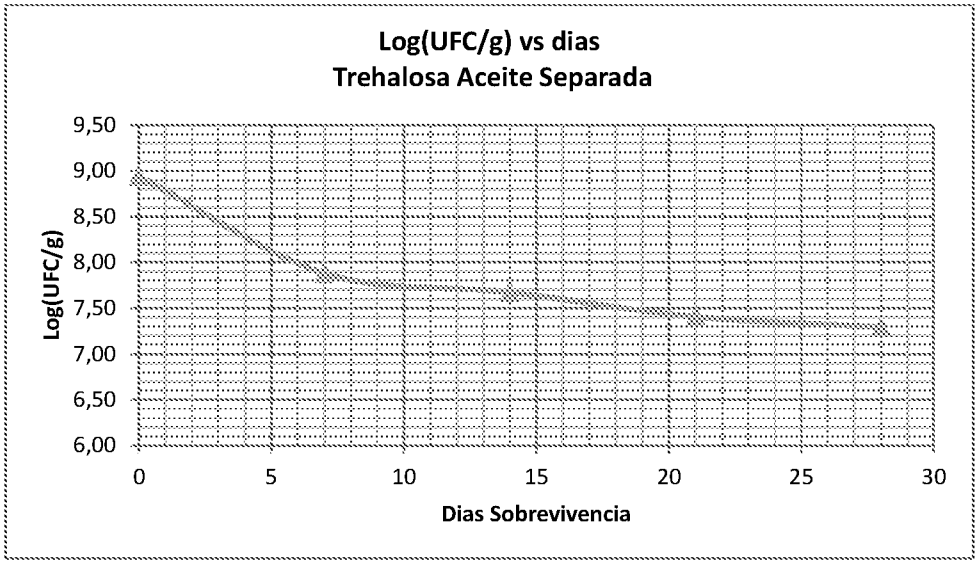

Figura 21

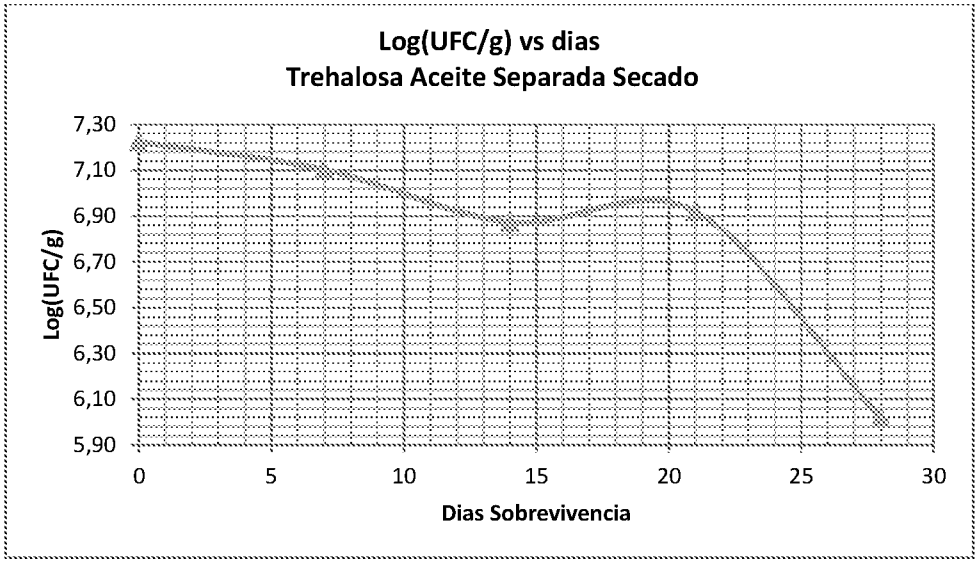

Figura 22

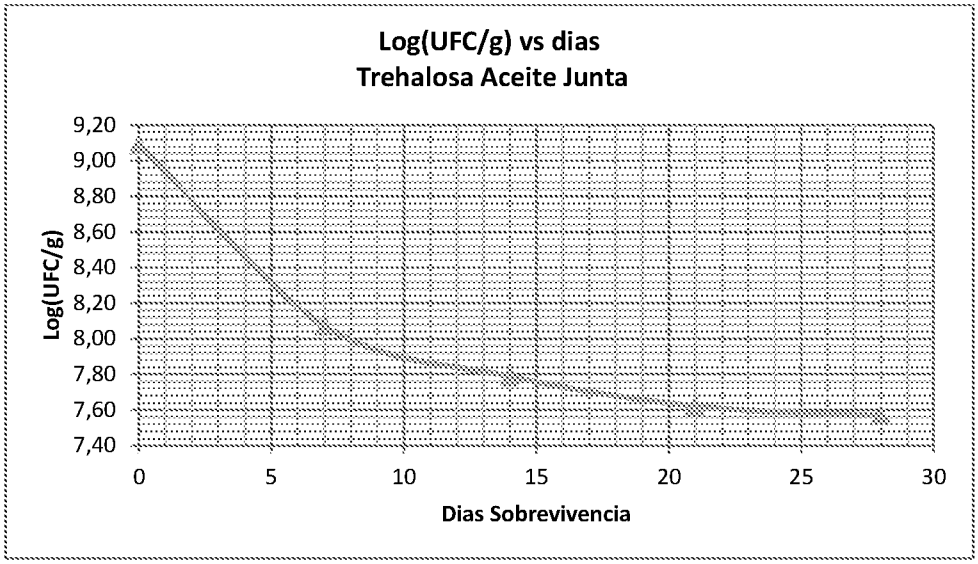

Figura 23

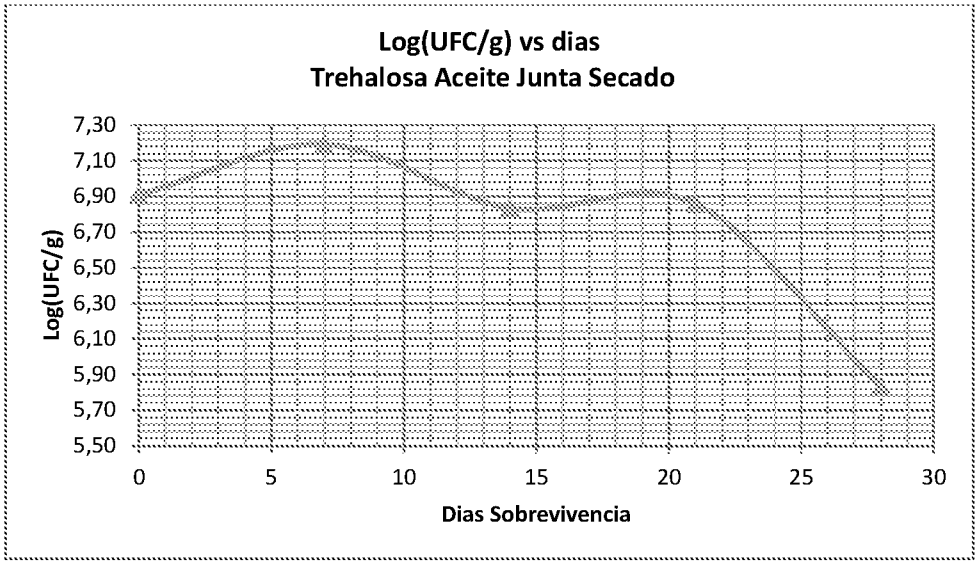

Figura 24

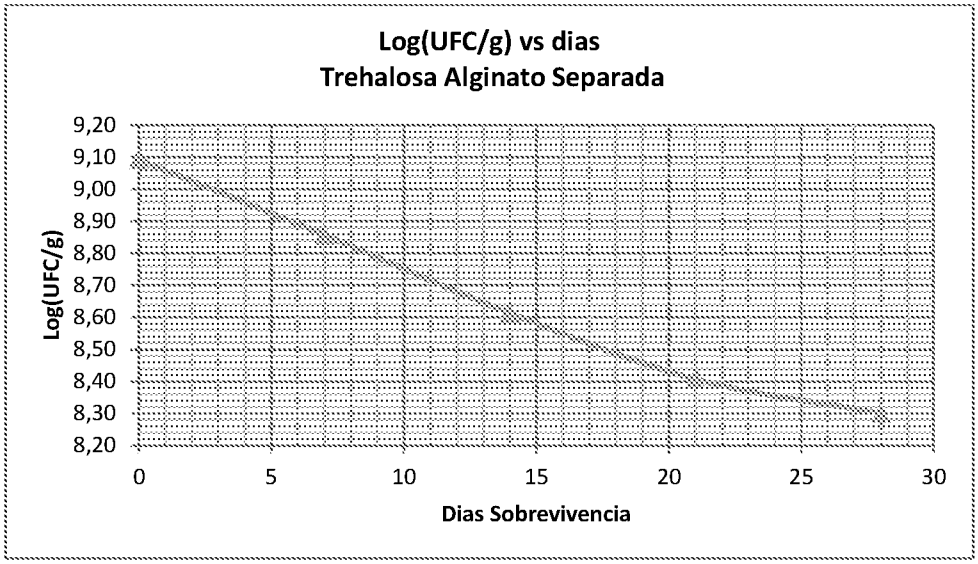

Figura 25

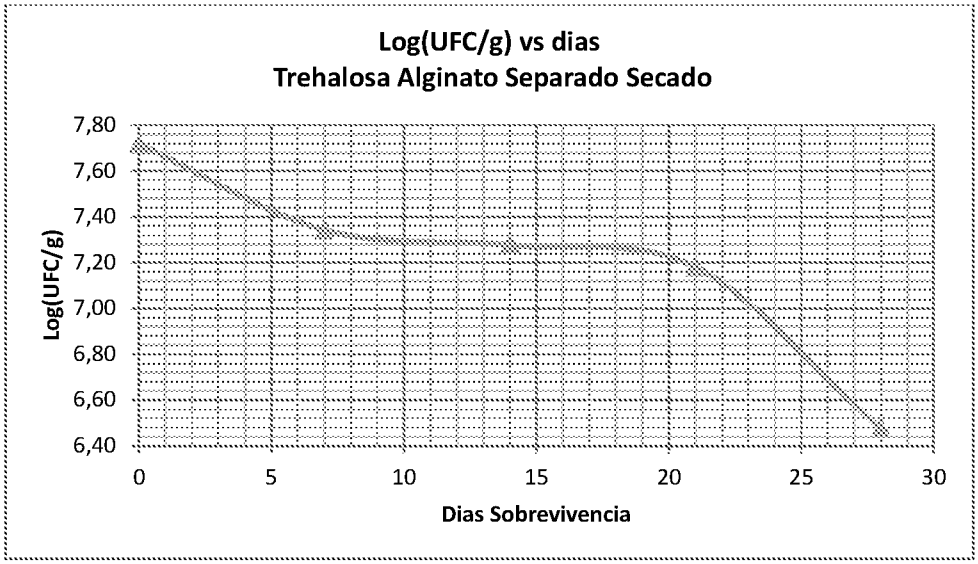

Figura 26

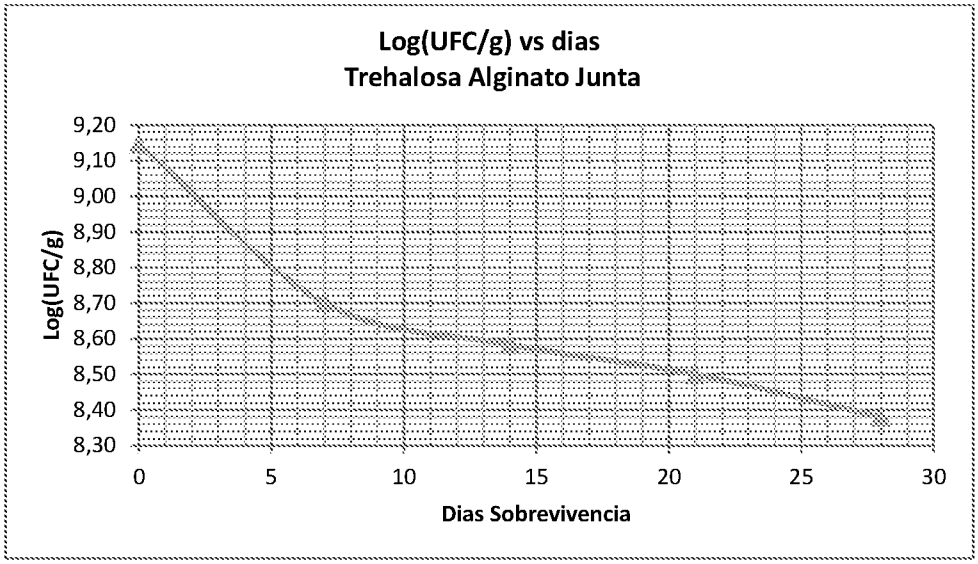

Figura 27

5

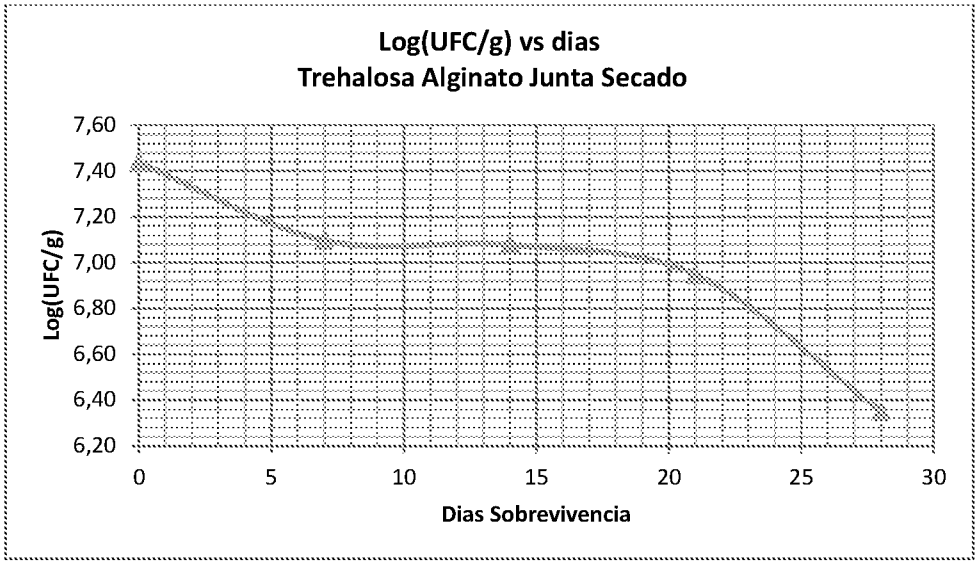

Figura 28

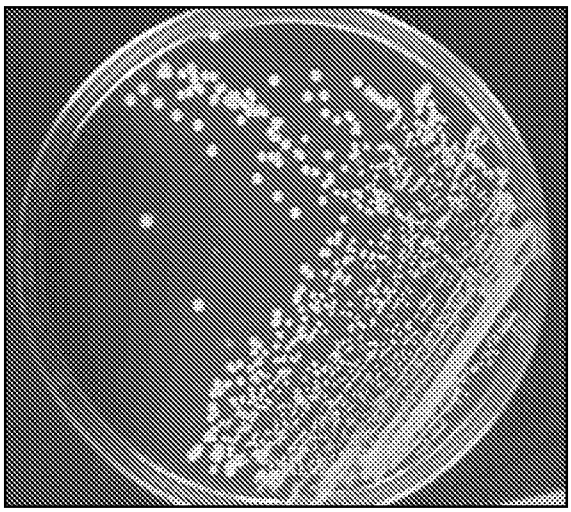

Figura 29

5

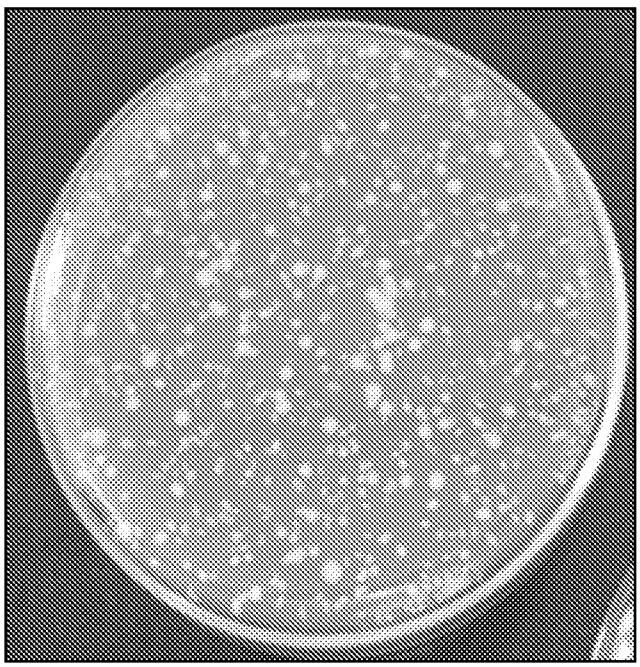

Figura 30

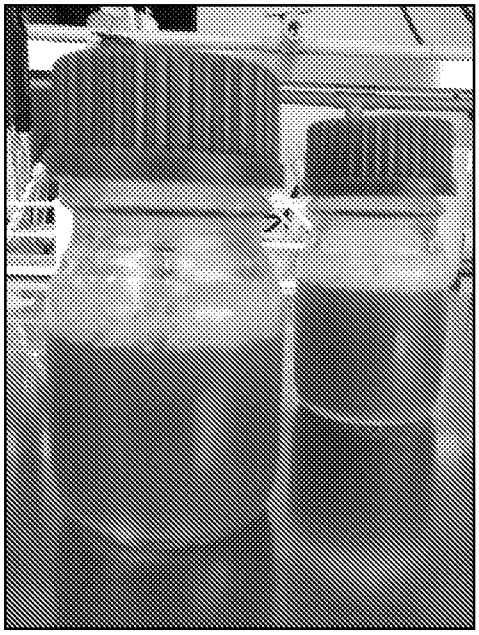

Figura 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2018/050143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(CIP) A23L29/00, 33/135, A61K35/741 (2019.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

(CIP) A23L29/00, 33/135, A61K35/741 (CPC) A23L29/00, 29/065, 33/135, A61K35/741

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN, Esp@cenet, Derwent, Patentscope, Google, INAPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO2008076975 (A1) (ADVANCED BIONUTRITION CORP) 26/06/2008 The whole document	1, 3-5, 7-12 2, 6 y 13-15
X Y	EP2529004 (B1) (ADVANCED BIONUTRITION CORP) 07/06/2017 The whole document	1, 3-5 , 7-9 2, 6
X	WO2012077038 (A1) (DEGAMA BERRIER LTD) 14/06/2012 The whole document	1, 3-5
X Y	WO 2011/035093 (A1) (MEAD JOHNSON NUTRITION CO) 24/03/2011 The whole document	1, 3-5, 8-9 2 y 6

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 March 2019 (01.03.2019)	12 April 2019 (12.04.2019)
Name and mailing address of the ISA/ CL Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2018/050143

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO2012/016282 (A1) (JORROCKS PTY LTD) 09/02/2012 See the whole document, specially pages 1[20] and 5 [15-30] and 8 [5-20]	13-15
A	CN103180432 (B) (MASSEY UNIVERSITY) 16/03/2016 The whole document	

WO2008076975 (A1)	26-06-2008	CA2673120 (A1)	26-06-2008
		CA2673120 (C)	26-06-2008
		EP2117354 (A1)	18-11-2009
		EP2117354 (A4)	18-11-2009
		EP2117354 (B1)	18-11-2009
		JP2010512755 (A)	30-04-2010
		JP5285617 (B2)	30-04-2010
		US2010074994 (A1)	25-03-2010
		US8460726 (B2)	25-03-2010
		US2013287896 (A1	31-10-2013
		US9072310 (B2)	31-10-2013
		US2014377409 (A1)	25-12-2014
		US9480276 (B2)	25-12-2014
EP2529004 (B1)	07/06/2017	EP2529004 (A2)	05-12-2012
		EP2529004 (A4)	05-12-2012
		EP2529004 (B1)	05-12-2012
		AR080073 (A1)	14-03-2012
		AR082682 (A1)	26-12-2012
		AR093204 (A1)	27-05-2015
		AU2011289272 (A1)	21-02-2013
		AU2011289272 (B2)	21-02-2013
		AU2013234931 (A1)	18-09-2014
		AU2013234931 (A2)	18-09-2014
		AU2013234931 (B2)	18-09-2014
		BR112012018839 (A2)	15-09-2015
		BR112013003244 (A2)	17-05-2016
		BR112013003244 (B1)	17-05-2016
		BR112014023234 (A2)	20-06-2017
		BR112014023234 (A8)	20-06-2017
		CA2785815 (A1)	04-08-2011
		CA2785815 (C)	04-08-2011
		CA2807997 (A1)	16-02-2012
		CA2807997 (C)	16-02-2012
		CA2866889 (A1)	26-09-2013
		CL2014002506 (A1)	09-01-2015
		CN102725393 (A)	10-10-2012
		CN102725393 (B)	10-10-2012
		CN103140145 (A)	05-06-2013
		CN103140145 (B)	05-06-2013
		CN104147605 (A)	19-11-2014
		CN104244985 (A)	24-12-2014
		DK2529004 (T3)	25-09-2017
		DK2603100 (T3)	06-08-2018
		EP2603100 (A2)	19-06-2013
		EP2603100 (A4)	19-06-2013
		EP2603100 (B1)	19-06-2013
		EP2827905 (A1)	28-01-2015
		EP2827905 (A4)	28-01-2015
		ES2639397 (T3)	26-10-2017
		ES2676656 (T3)	23-07-2018
		HRP20181121 (T1)	21-09-2018

		HUE039058 (T2)	28-12-2018
WO2012077038 (A1)	14/06/2012	AU2011340174 (A1)	25-07-2013
		BR112013014044 (A2)	31-10-2017
		CA2820178 (A1)	14-06-2012
		CN103347395 (A)	09-10-2013
		CN103347395 (B)	09-10-2013
		EP2648528 (A1)	16-10-2013
		EP2648528 (B1)	16-10-2013
		ES2597038 (T3)	13-01-2017
		PT2648528 (T)	25-10-2016
		US2013323362 (A1)	05-12-2013
		US2016360777 (A1)	15-12-2016
WO 2011/035093 (A1)	24/03/2011	AR098597 (A1)	01-06-2016
		AR098598 (A1)	01-06-2016
		AU2010295508 (A1)	15-03-2012
		AU2010295508 (B2)	15-03-2012
		AU2014357609 (B2)	12-10-2017
		AU2014357610 (A1)	12-05-2016
		AU2014357610 (B2)	12-05-2016
		BR112012006220 (A2)	06-06-2017
		CA2772534 (A1)	24-03-2011
		CA2929168 (A1)	11-06-2015
		CA2929170 (A1)	11-06-2015
		CN102573862 (A)	11-07-2012
		CN105792676 (A)	20-07-2016
		CN106028839 (A)	12-10-2016
		CN107594537 (A)	19-01-2018
		CO6511231 (A2)	31-08-2012
		ECSP12011820 (A)	30-05-2012
		EP2477638 (A1)	25-07-2012
		EP2477638 (A4)	25-07-2012
		EP2477638 (B1)	25-07-2012
		EP3079503 (A1)	19-10-2016
		EP3113631 (A1)	11-01-2017
		ES2683310 (T3)	26-09-2018
		IN1440DEN2012 (A)	05-06-2015
		JP2013505257 (A)	14-02-2013
		JP6240386 (B2)	27-06-2012
		KR20120068851 (A)	11-04-2012
		MX2016007006 (A)	07-09-2016
WO2012/016282 (A1)	09-02-2012	AU2011286161 (A1)	21-03-2013
		AU2016202796 (A1)	09-06-2016
		AU2017261592 (A1)	15-02-2018
		JP2013534134 (A)	02-09-2013
		US2013129865 (A1)	23-05-2013

CN103180432 (B)	16/03/2016	CN103180432 (A)	26-06-2013
		AU2011293982 (A1)	14-03-2013
		NZ607590 (A)	27-02-2015
		SG188301 (A1)	30-04-2013
		US2013224303 (A1)	29-08-2013
		WO2012026832 (A1)	01-03-2012

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CL2018/050143

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP) A23L29/00, 33/135, A61K35/741 (2019.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

(CIP) A23L29/00, 33/135, A61K35/741 (CPC) A23L29/00, 29/065, 33/135, A61K35/741

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) STN, Esp@cenet, Derwent, Patentscope, Google, INAPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X Y	WO2008076975 (A1) (ADVANCED BIONUTRITION CORP) 26/06/2008 Ver todo el documento	1, 3-5, 7-12 2, 6 y 13-15
X Y	EP2529004 (B1) (ADVANCED BIONUTRITION CORP) 07/06/2017 Ver todo el documento	1, 3-5 , 7-9 2, 6
X	WO2012077038 (A1) (DEGAMA BERRIER LTD) 14/06/2012 Ver todo el documento	1, 3-5
X Y	WO 2011/035093 (A1) (MEAD JOHNSON NUTRITION CO) 24/03/2011 Ver todo el documento	1, 3-5, 8-9 2 y 6

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
01/03/2019 01/marzo/2019	12/04/2019 12/abril/2019
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile	Funcionario autorizado SCHMIDT ACHARÁN, Paula Andrea
N° de fax	N° de teléfono 56-2-28870551

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050143

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	WO2012/016282 (A1) (JORROCKS PTY LTD) 09/02/2012 Ver todo el documento, especialmente páginas 1[20] y 5 [15-30] y 8 [5-20].	13-15
A	CN103180432 (B) (MASSEY UNIVERSITY) 16/03/2016 Ver todo el documento	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050143

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
WO2008076975 (A1)	26-06-2008	CA2673120 (A1)	26-06-2008
		CA2673120 (C)	26-06-2008
		EP2117354 (A1)	18-11-2009
		EP2117354 (A4)	18-11-2009
		EP2117354 (B1)	18-11-2009
		JP2010512755 (A)	30-04-2010
		JP5285617 (B2)	30-04-2010
		US2010074994 (A1)	25-03-2010
		US8460726 (B2)	25-03-2010
		US2013287896 (A1	31-10-2013
		US9072310 (B2)	31-10-2013
		US2014377409 (A1)	25-12-2014
		US9480276 (B2)	25-12-2014
EP2529004 (B1)	07/06/2017	EP2529004 (A2)	05-12-2012
		EP2529004 (A4)	05-12-2012
		EP2529004 (B1)	05-12-2012
		AR080073 (A1)	14-03-2012
		AR082682 (A1)	26-12-2012
		AR093204 (A1)	27-05-2015
		AU2011289272 (A1)	21-02-2013
		AU2011289272 (B2)	21-02-2013
		AU2013234931 (A1)	18-09-2014
		AU2013234931 (A2)	18-09-2014
		AU2013234931 (B2)	18-09-2014
		BR112012018839 (A2)	15-09-2015
		BR112013003244 (A2)	17-05-2016
		BR112013003244 (B1)	17-05-2016
		BR112014023234 (A2)	20-06-2017
		BR112014023234 (A8)	20-06-2017
		CA2785815 (A1)	04-08-2011
		CA2785815 (C)	04-08-2011
		CA2807997 (A1)	16-02-2012
		CA2807997 (C)	16-02-2012
		CA2866889 (A1)	26-09-2013
		CL2014002506 (A1)	09-01-2015
		CN102725393 (A)	10-10-2012
		CN102725393 (B)	10-10-2012
		CN103140145 (A)	05-06-2013
		CN103140145 (B)	05-06-2013
		CN104147605 (A)	19-11-2014
		CN104244985 (A)	24-12-2014
		DK2529004 (T3)	25-09-2017
		DK2603100 (T3)	06-08-2018
		EP2603100 (A2)	19-06-2013
		EP2603100 (A4)	19-06-2013
		EP2603100 (B1)	19-06-2013
		EP2827905 (A1)	28-01-2015
		EP2827905 (A4)	28-01-2015
		ES2639397 (T3)	26-10-2017
		ES2676656 (T3)	23-07-2018
		HRP20181121 (T1)	21-09-2018

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°
PCT/CL2018/050143

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
		HUE039058 (T2)	28-12-2018
WO2012077038 (A1)	14/06/2012	AU2011340174 (A1)	25-07-2013
		BR112013014044 (A2)	31-10-2017
		CA2820178 (A1)	14-06-2012
		CN103347395 (A)	09-10-2013
		CN103347395 (B)	09-10-2013
		EP2648528 (A1)	16-10-2013
		EP2648528 (B1)	16-10-2013
		ES2597038 (T3)	13-01-2017
		PT2648528 (T)	25-10-2016
		US2013323362 (A1)	05-12-2013
		US2016360777 (A1)	15-12-2016
WO 2011/035093 (A1)	24/03/2011	AR098597 (A1)	01-06-2016
		AR098598 (A1)	01-06-2016
		AU2010295508 (A1)	15-03-2012
		AU2010295508 (B2)	15-03-2012
		AU2014357609 (B2)	12-10-2017
		AU2014357610 (A1)	12-05-2016
		AU2014357610 (B2)	12-05-2016
		BR112012006220 (A2)	06-06-2017
		CA2772534 (A1)	24-03-2011
		CA2929168 (A1)	11-06-2015
		CA2929170 (A1)	11-06-2015
		CN102573862 (A)	11-07-2012
		CN105792676 (A)	20-07-2016
		CN106028839 (A)	12-10-2016
		CN107594537 (A)	19-01-2018
		CO6511231 (A2)	31-08-2012
		ECSP12011820 (A)	30-05-2012
		EP2477638 (A1)	25-07-2012
		EP2477638 (A4)	25-07-2012
		EP2477638 (B1)	25-07-2012
		EP3079503 (A1)	19-10-2016
		EP3113631 (A1)	11-01-2017
		ES2683310 (T3)	26-09-2018
		IN1440DEN2012 (A)	05-06-2015
		JP2013505257 (A)	14-02-2013
		JP6240386 (B2)	27-06-2012
		KR20120068851 (A)	11-04-2012
		MX2016007006 (A)	07-09-2016
WO2012/016282 (A1)	09-02-2012	AU2011286161 (A1)	21-03-2013
		AU2016202796 (A1)	09-06-2016
		AU2017261592 (A1)	15-02-2018
		JP2013534134 (A)	02-09-2013
		US2013129865 (A1)	23-05-2013

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional Nº

PCT/CL2018/050143

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
CN103180432 (B)	16/03/2016	CN103180432 (A)	26-06-2013
		AU2011293982 (A1)	14-03-2013
		NZ607590 (A)	27-02-2015
		SG188301 (A1)	30-04-2013
		US2013224303 (A1)	29-08-2013
		WO2012026832 (A1)	01-03-2012