

COMPOSICIÓN PROBIÓTICA EN POLVO A BASE DE FRUTA Y SU PROCESO DE FABRICACIÓN

CAMPO TÉCNICO

5

El desarrollo pertenece al campo farmacéutico, alimenticio, nutricional y de medicina en general, particularmente a una composición probiótica no láctea, en forma de polvo soluble a base de jugo o zumo de una fruta cítrica.

10

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Los alimentos funcionales corresponden a aquellos que han sido elaborados añadiendo ingredientes biológicamente activos que cumplen una función específica y contribuyen a mejorar la salud, así como aquellos que en su estado natural aportan vitaminas, minerales, fibra, antioxidantes, entre otros y que tienen un efecto potencialmente positivo en la salud más allá de la nutrición básica. Particularmente, ejercen un papel como controladores de la microbiota gastrointestinal patógena y de acción preventiva, ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de algunas enfermedades y así sugieren un gran potencial terapéutico, cuando se administran en cantidad adecuada, confieren beneficios para la salud con seguridad y eficacia demostradas.

20

25

Dentro de los alimentos funcionales se incluyen los probióticos, prebióticos y simbióticos, los cuales generan el balance en la microbiota intestinal. En la actualidad, la gran mayoría de probióticos disponibles en el mercado se basan en productos lácteos, por lo que dada la demanda de alimentos dirigidos a personas con galactosemia, se genera la necesidad de desarrollar productos de origen vegetal con adición de microorganismos probióticos.

30

En el campo técnico se describen productos probióticos no lácteos o de bajo contenido en lactosa, como por ejemplo, la patente US10448661 que divulga una composición alimenticia en polvo de bajo contenido en lactosa o completamente exenta de la misma,

que comprende carbohidratos, proteínas, grasas y opcionalmente microorganismos probióticos y/o prebióticos y vitaminas, minerales, texturizantes, fibras, edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

- 5 Por otro lado, la patente CN108651804 divulga un método para elaborar un producto probiótico sólido a base de jugo de naranja navel, polvo de fermento como vegetales secados por aspersión después de fermentarlos con *Lactobacillus*, azúcar blanco granulado, lactosa, almidón, maltodextrina, polidextrosa, oligoisomaltosa y bacterias ácido lácticas, para ajustar la función intestinal y aportar alto valor nutricional.

10

Finalmente, autores como Bastos J. [Bastos J. (2015). *DEVELOPMENT OF A FUNCTIONAL ORANGE JUICE POWDER BY SPRAY DRYING*. Universidad Católica Portuguesa, 1-201] enseñan un producto no lácteo funcional en polvo a base de jugo de naranja por secado por aspersión, el cual incorpora *L. plantarum* 299v y *P. acidilactici*
15 HA-6111-2 como agentes probióticos y maltodextrina o goma arábiga como agentes prebióticos.

20

Bastos analiza las condiciones adecuadas del proceso de secado por aspersión, los efectos de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad del producto y elementos del producto que mejoren la viabilidad probiótica, concluyendo que no se
lograron resultados ideales para el producto desarrollado bajo almacenamiento a temperatura ambiente.

25

Sin embargo, estas formulaciones presentan limitaciones como por ejemplo tecnologías de producción retadoras en tanto repercuten en la viabilidad del microorganismo probiótico y efecto sensorial del producto final, así como en la estabilidad del producto final y el uso de ingredientes de alto poder calórico.

30

Por lo tanto, aún persiste la necesidad de desarrollar formulaciones simbióticas no lácteas que incorporen agentes probióticos en productos de origen vegetal, con características que permitan el uso de estas matrices alimentarias como vehículos de

inclusión en el desarrollo de alimentos funcionales sin perder características organolépticas, fisicoquímicas y bioactivas.

BREVE DESCRIPCIÓN

5

El presente desarrollo hace referencia a una composición en polvo no láctea a base de jugo o zumo de una fruta con pH ácido que incorpora biomasa de un microorganismo probiótico del género *Bacillus*, y al menos dos agentes prebióticos. Adicionalmente, el presente desarrollo también hace referencia al método para elaborar dichas composiciones mediante la técnica de secado por aspersión.

10

En un aspecto adicional, el presente desarrollo hace referencia al uso de la composición probiótica para la prevención y tratamiento de afecciones gastrointestinales, tales como la enfermedad diarreica aguda (EDA) o como agente estabilizador de la flora gastrointestinal posterior a tratamientos antibióticos.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Viabilidad celular de la composición probiótica a base de zumo de naranja y *Bacillus coagulans* A. a una concentración del microorganismo de 2,5%. B. a una concentración del microorganismo de 5%.

20

FIG.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del microorganismo *Bacillus coagulans* en la composición probiótica en polvo. Se visualiza la estructura microscópica del microorganismo viable con presencia de una endospora esférica con localización terminal y subterminal, por lo que se denomina como palillo de tambor.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para propósitos de interpretar los términos usados a lo largo del presente documento se debe tener en cuenta su significado usual en el campo técnico, a menos que se incorpore

30

una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

5 Composición

El presente desarrollo corresponde a una composición probiótica a base de jugo o zumo deshidratado de una fruta con pH ácido, que comprende biomasa de un microorganismo probiótico del género *Bacillus* y al menos dos sustancias prebióticas.

10

Se entiende por probiótico a los microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud cuando son administrados en cantidades adecuadas. En una modalidad particular, el agente probiótico comprende biomasa de un microorganismo que se selecciona del género *Bacillus*, preferiblemente el microorganismo es de la especie *B. coagulans* *B. subtilis*, *B. licheniformis* o *B. clausi* y más preferiblemente el microorganismo es *Bacillus coagulans*

15

La especie del microorganismo del género *Bacillus* que se incorpora en la composición incide directamente sobre la supervivencia del mismo, en tanto, su estructura morfológica, al poseer cápsula le permite obtener una supervivencia bajo condiciones extremas de temperatura, humedad y presión osmótica.

20

La composición probiótica comprende concentraciones de la biomasa del microorganismo empleado de al menos 0,5% p/p y células viables de al menos 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/g. En una modalidad particular la concentración de la biomasa del microorganismo está entre 0,5 y 6% p/p y células viables entre 10^6 y 10^{12} UFC/g, más particularmente la concentración es de 1,31% p/p y células viables entre 10^7 y 10^8 UFC/g.

25

La composición probiótica comprende jugo o zumo de fruta deshidratado. En una modalidad particular, sin constituir una limitante el jugo o zumo de fruta se selecciona de una fruta cuyo pH se encuentre entre 3 y 4,5 o cuya acidez sea entre 0,6 y 1,4%.

30

Preferiblemente la fruta se selecciona del grupo que comprende naranja (*Citrus sinensis*), mora (*Rubus glaucus Benth*), mandarina (*Citrus reticulata*), fresa (*Fragaria vesca*), piña (*Ananas comosus*), pera (*Pyrus communis*), cereza (*Prunus cerasus*), arándano (*Vaccinium myrtillus*), melocotón (*Prunus pérsica*) y tomate de árbol
5 (*Solanum betaceum*), más preferiblemente el jugo o zumo de fruta es de naranja (*Citrus sinensis*) o mora (*Rubus glaucus Benth*).

En una modalidad particular, el zumo de fruta deshidratado constituye entre el 50 y el 80% p/p de la composición probiótica. En otra modalidad particular el zumo de fruta
10 está en un 71,02% en peso.

La incorporación de jugo o zumo de una fruta, el microorganismo probiótico y las sustancias prebióticas en la composición, permiten el desarrollo de un alimento funcional con características naturales, nutritivas, digestivas e inmunomoduladoras.
15 Además, las características de acidez del zumo de las frutas particularmente incorporadas, aportan ácidos orgánicos facilitando un pH ácido que favorece la viabilidad y la estabilidad del microorganismo probiótico.

Adicionalmente, la cantidad de azúcares promueve la afinidad química entre las
20 moléculas de agua y los azúcares de bajo peso molecular (sustancias prebióticas), permitiendo la obtención de una suspensión homogénea y por su misma composición favorece de manera natural el crecimiento del microorganismo probiótico. [Bernal. C et al. (2017), *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. Revista chilena de nutrición*, 44(4)].

De acuerdo con el presente desarrollo, las sustancias prebióticas se entienden como componentes alimentarios pobremente absorbidos o no digeridos por las enzimas humanas, que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan el intestino, favoreciendo la multiplicación de bacterias benéficas. Particularmente las
30 sustancias prebióticas incorporadas pueden ser de tipo di, oligo, polisacárido, almidones resistentes y polioles de azúcar.

En una modalidad se incorporan al menos dos sustancias prebióticas que se seleccionan del grupo que consiste en inulina, maltodextrina, oligofructosa, fructooligosacaridos (FOS), almidón resistente, galactooligosacáridos (GOS), galactotriosa/TOS, xilooligosacáridos (XOS), lactulosa, isomalto-oligosacáridos (OMI), polidextrosa y oligosacáridos de soja (SOS). En una modalidad particular, se seleccionan dos sustancias prebióticas que son inulina y maltodextrina.

En una modalidad particular, las dos sustancias prebióticas se encuentran en proporciones entre 1:1 y 1:4, a una concentración entre 4,5 y 38% p/p más particularmente en una proporción de 1:1, que permite obtener características adecuadas de viscosidad e intensidad en el sabor en cuanto al grado de dulzor de la suspensión. Adicionalmente, esta proporción cumple con los requerimientos mínimos para que sea funcional, ya que debe contener como mínimo entre 1,0 y 1,5 g de prebiótico por porción de consumo (200 mL).

Las al menos dos sustancias prebióticas actúan como material de pared, es decir, que le proporcionan protección al microorganismo en cuanto a condiciones adversas, como variaciones de temperatura, presión osmótica y humedad. Adicionalmente, las sustancias prebióticas junto con el microorganismo, favorecen una acción simbiótica en tanto mejoran la viabilidad del mismo, estimulan la microbiota benéfica en el tracto gastrointestinal, mejoran las características sensoriales y fisicoquímicas del producto, en tanto funcionan como agente edulcorante, funcionan como estabilizantes para evitar procesos de licuefacción y como componentes protectores en las diferentes técnicas de encapsulación de microorganismos con capacidad probiótica, con el fin de favorecer las condiciones ambientales y de adaptabilidad de los mismos- [Bernal. C et al. (2017), *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. Revista chilena de nutrición*, 44(4)]

La composición de la presente invención corresponde a una formulación no láctea en polvo destinada a ser solubilizada en medios líquidos, preferiblemente no oleosos para ser consumida en forma de bebida (jugo, licuado, batidos, aromática, etc.), con el fin de ejercer acción gastrointestinal.

Método de elaboración de la composición

El presente desarrollo también se dirige al método de elaboración de una composición
5 probiótica en polvo. El método de elaboración de la composición comprende someter
jugo o zumo de una fruta a una pasteurización lenta y dejar enfriar entre 4 y 10°C,
adicionar sustancias prebióticas y biomasa de un microorganismo probiótico del género
Bacillus a una concentración de al menos 10^6 UFC/g, agitar la mezcla durante 10
10 minutos entre 100 a 150 rpm, a temperatura entre 18 y 25°C, secar por aspersión la
mezcla obtenida a una temperatura de entrada entre 100 y 130°C, temperatura de salida
entre 73 y 77°C, humedad relativa entre 55 y 65%, velocidad de aspersión de 32000
rpm e inyección de aire del 80% de la capacidad máxima.

En la primera etapa se somete el jugo o zumo de una fruta con pH entre 3 y 4,5 o una
15 acidez de entre 0,6 y 1,4% a una pasteurización lenta y se deja enfriar. En una
modalidad particular, el jugo o zumo de fruta después de pasteurizado se deja enfriar
hasta alcanzar una temperatura entre 4 y 10°C. Particularmente la fruta se selecciona
del grupo que comprende naranja (*Citrus sinensis*), mora (*Rubus glaucus Benth*),
mandarina (*Citrus reticulata*), fresa (*Fragaria vesca*), piña (*Ananas comosus*), pera
20 (*Pyrus communis*), cereza (*Prunus cerasus*), arándano (*Vaccinium myrtillus*), melocotón
(*Prunus pérsica*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*), más preferiblemente el jugo o
zumo de fruta es de naranja (*Citrus sinensis*) o mora (*Rubus glaucus Benth*). Más
particularmente naranja (*Citrus sinensis*) y mora (*Rubus glaucus Benth*).
Adicionalmente, la viscosidad de los zumos de fruta, aportada por la pectina, así como
25 las sustancias prebióticas aporta sólidos solubles expresados en grados Brix, y le
confiere características reológicas a la suspensión antes de someterse a un proceso de
secado, para la obtención del producto en polvo.

Una vez enfriado el zumo de fruta se adicionan las sustancias prebióticas seleccionadas
30 entre, sin limitarse inulina, maltodextrina, oligofructosa, fructooligosacaridos (FOS),
almidón resistente, galactooligosacáridos (GOS), galactotriosa/TOS, Xilooligosacáridos

(XOS), lactulosa, isomalto-oligosacáridos (OMI), polidextrosa y oligosacáridos de soja (SOS).

5 En una modalidad particular, por cada litro de zumo o jugo de fruta se adicionan las sustancias prebióticas, particularmente al menos dos sustancias prebióticas, en una proporción entre 1:1 a 1:4, a una concentración entre 5,0 y 20% p/v.

10 En otra modalidad particular se incorporan dos sustancias prebióticas, preferiblemente inulina y maltodextrina, en una proporción de 1:4 a una concentración de 5% y 20% p/v, respectivamente.

15 Para aumentar la supervivencia de los microorganismos probióticos en la composición, las sustancias prebióticas se adicionan como agentes protectores en las diferentes técnicas de encapsulación de microorganismos con capacidad probiótica con el fin de favorecer las condiciones ambientales y de adaptabilidad de estas bacterias en diferentes clases de matrices vegetales.

20 Particularmente, las al menos dos sustancias prebióticas actúan como una barrera protectora y de recubrimiento que protege al organismo probiótico durante el proceso de secado y promueven la microencapsulación para conservarlo. La microencapsulación ofrece el potencial de reducir los efectos adversos sobre la viabilidad de los probióticos en los alimentos y los efectos gastrointestinales en el huésped, así como durante el procesamiento, almacenamiento y consumo [Bernal. C et al. (2017), *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. Revista chilena de nutrición*, 44(4)].

30 Posteriormente, se adiciona la biomasa de un microorganismo probiótico del género *Bacillus* a una concentración entre 2,0 y 10% p/v y a una concentración final de células de al menos 10^6 UFC/g. En una modalidad particular, el microorganismo probiótico es *Bacillus coagulans* a una concentración de 2,5% p/v y una concentración final de células entre 10^7 y 10^8 UFC/g.

El género *Bacillus*, especie *coagulans* se emplea particularmente por hacer parte del grupo de probióticos, cuya singular estructura morfológica al poseer cápsula, le permite obtener una supervivencia bajo condiciones extremas de temperatura, humedad y presión osmótica al ser sometido a un proceso de transformación industrial.

5 Particularmente, otros tipos de microorganismos probióticos como el género *Lactobacillus*, no sobreviven bajo tratamientos extremos como altas temperaturas, dada su estructura morfológica (ausencia de cápsula). Adicionalmente, no son estables en almacenamiento.

10 Seguido a esto, la mezcla se homogeniza durante 10 minutos a una agitación constante entre 100 y 150 rpm y una temperatura entre 18 y 25 °C, garantizando de esta manera una mayor homogeneidad de la suspensión con todos sus componentes.

Finalmente, se seca la mezcla por aspersión a una temperatura de entrada entre 100 y
15 130°C, temperatura de salida entre 73 y 77°C, humedad relativa entre 55 y 65%, velocidad de aspersión de 32000 rpm e inyección de aire del 80% de la capacidad máxima.

En una modalidad particular, la temperatura de entrada es de 130°C, la temperatura de
20 salida de 75°C, la humedad relativa de 62%, velocidad de aspersión de 32000 rpm e inyección de aire del 80%.

Dentro de las variables que se deben controlar en el método para la fabricación de la composición probiótica en polvo, la temperatura de entrada se convierte en un punto
25 crítico de control ya que al salirse del rango superior se pone en riesgo la supervivencia del microorganismo y por ende la calidad del producto final. La velocidad de aspersión tiene un impacto significativo en el tamaño de partícula del polvo, lo que determina la solubilidad del mismo en un medio líquido. Finalmente, la temperatura de salida y la humedad relativa dependen del equipo de secado que se utilice y de su capacidad de
30 carga.

Las propiedades intrínsecas de los microorganismos incorporados a la composición, tales como la supervivencia y colonización del tracto gastrointestinal, tolerancia a determinados rangos de pH y la pepsina del estómago, sales biliares, pancreatina en la parte superior del intestino, y la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, se ven directamente afectadas por las condiciones de fabricación y procesamiento del producto [Bernal. C et al. (2017), *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. Revista chilena de nutrición*, 44(4)], por lo que es crítico el control de las variables y condiciones de reacción tal y como se describen anteriormente.

Adicionalmente, el proceso que se reclama permite que la composición probiótica en polvo soluble al ser rehidratada conserve las características organolépticas del jugo de fruta y que a su vez garantice la máxima supervivencia del microorganismo probiótico incorporado.

Usos y métodos de tratamiento

La composición probiótica obtenida en la presente invención es útil como alimento funcional preventivo para la población vulnerable a enfermedad diarreica aguda (EDA), de baja inmunidad y el tratamiento de afecciones gastrointestinales en general, que puede ser administrado a personas con galactosemia, restricciones en el consumo de colesterol y alergias a las proteínas de la leche, en tanto es un producto no lácteo.

El consumo de la composición sugiere beneficios como la regeneración de la microbiota beneficiosa del tracto gastrointestinal y estabilización de la flora gastrointestinal posterior a tratamientos antibióticos, la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de amoníaco, estimulación del sistema inmune, estimulación selectiva del crecimiento de bacterias beneficiosas del colon, protección frente a infecciones intestinales y disminución del riesgo de padecer cáncer de colon, favorecer la absorción de minerales, disminución de alergias tóxicas, reducción de la presión arterial, y niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos, fosfolípidos en sangre, síntesis de triglicéridos y

ácidos grasos en el hígado, inhibición del crecimiento de bacterias productoras de amoníaco.

Finalmente, la composición probiótica de la invención sirve como coadyuvante para el tratamiento de las condiciones anteriormente mencionadas y condiciones o enfermedades asociadas a patologías intestinales como enfermedad diarreica aguda (EDA), síndrome de intestino irritable y enfermedades inflamatorias intestinales, a través de la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición. Una cantidad terapéuticamente efectiva para efectos de la presente invención se define como la cantidad o dosis mínima de la composición que permite producir el efecto deseado a saber, probiótico determinado de acuerdo con los métodos de la práctica clínica.

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. *Composición probiótica a base de jugo de naranja y *Bacillus coagulans**

Se emplearon los siguientes ingredientes para obtener las composiciones que se ilustran en la Tabla 1 a continuación:

- Zumo de naranja valencia (*Citrus sinensis*) tipo balín con un pH de 3,3 y acidez de 0,90%.
- *Bacillus coagulans* ATCC® 7050
- Inulina comercial
- Maltodextrina

Tabla 1. *Composiciones de jugo de naranja y *Bacillus coagulans* obtenidas*

Componente	Formulación			
	A	B	C	D
Zumo de naranja valencia (%p/p)	79,12	71,02	61,61	51,08
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC® 7050 (%p/p)	0,84	1,31	2,38	5,71
Maltodextrina (%p/p)	6,29	10,48	4,76	5,71
Inulina comercial (%p/p)	13,75	17,19	31,25	37,5

Ejemplo 2. Método de elaboración

Para la elaboración de las composiciones del Ejemplo 1 realizaron las siguientes etapas:

5

- Las naranjas fueron lavadas y desinfectadas por inmersión durante 10 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a 50 ppm, posteriormente se cortaron por la mitad de manera transversal al tallo y se realizó el proceso de extracción del zumo en equipo exprimidor eléctrico convencional. Este procedimiento debe realizarse en condiciones asépticas.

10

- Luego de obtener el zumo o jugo de naranja sin semillas se procedió a un proceso de pasteurización lenta que comprende temperaturas entre 62 a 64 °C durante 30 minutos. Luego, el zumo de naranja debe ser enfriado a temperaturas entre 4 y 10 °C.

15

- Posteriormente, para un volumen de 1 litro, mediante condiciones asépticas se adicionaron los prebióticos, particularmente inulina y maltodextrina en una proporción de 1:4 al 5% y 20% p/v, respectivamente.
- Se adicionó después el microorganismo probiótico *Bacillus coagulans* al 2,5% p/v.

20

- La mezcla se homogenizó durante 10 minutos mediante agitación magnética a una velocidad de 150 rpm y temperatura de 25°C en recipientes cerrados para la obtención de un producto probiótico líquido.
- Finalmente, se ajustaron las condiciones operativas del equipo de secado por aspersión Marca Vibrasec SAS®:

25

- Temperatura de entrada: 130°C

- Temperatura de salida: 75°C
- Humedad relativa: 62%
- Velocidad de aspersión: 32000 rpm
- Inyección de aire: 80% de la capacidad máxima
- Tiempo de secado: 47 minutos

Se pasó el producto probiótico líquido bajo condiciones de temperatura ambiente ($18^{\circ}\text{C} \pm 2$) con agitación constante para garantizar que el paso del producto sea homogéneo.

Las cepas de *Bacillus coagulans* ATCC®-7050 se conservaron en crioviales (pélets con glicerol al 10%), se reconstituyeron en caldo MRS e incubaron a 37°C por 24 horas en condiciones microaerofílicas. La biomasa se recuperó por centrifugación (5000 rpm) a 4°C y el sobrenadante se descartó. Los cultivos se transfirieron en 500 mL de caldo MRS e incubaron bajo agitación lenta (50 rpm) en las mismas condiciones anteriores para la obtención de una concentración final de células no menor a 10^6 UFC/g. Las células se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se lavaron con una solución estéril de NaCl al 0,85%. Finalmente, se obtuvo la biomasa de *Bacillus coagulans* a una concentración de 2,5% p/v.

El equipo de secado por aspersión antes del proceso se sometió a un lavado y desinfección exhaustiva para evitar la contaminación del producto. Adicionalmente, se precalentó por 10 minutos antes de ajustar las condiciones de operación para el proceso de secado.

El proceso descrito arrojó un rendimiento del 69%.

Ejemplo 3. Estabilidad y viabilidad de la composición probiótica

Una vez finalizado el proceso de secado, las composiciones del Ejemplo 1 obtenidas a partir del método descrito en el Ejemplo 2 se colectaron de inmediato y empacaron al vacío en bolsas o películas de polipropileno metalizada de alta barrera y almacenaron a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$) por aproximadamente un año.

Al producto en polvo obtenido y almacenado se le realizó la medición de supervivencia del microorganismo probiótico *Bacillus coagulans* encapsulado con las sustancias prebióticas inulina y maltodextrina. El número de células viables fue determinado antes y después del secado cada 7 días durante el almacenamiento a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ hasta obtener los recuentos microbiológicos de células viables expresados en base seca (UFC/g). Se emplearon como criterios de estabilidad, una viabilidad que fuese no menor a 10^6 UFC/g.

Particularmente, este resultado aproximadamente hacia los 12 meses demostró una viabilidad del microorganismo probiótico de al menos 6 unidades exponenciales por gramo de producto, particularmente 10^9 UFC/g, lo cual indica su carácter funcional no sólo por el contenido de sustancias prebióticas, sino también al obtener una concentración final de células viables del microorganismo probiótico *Bacillus coagulans* no menor a 10^6 UFC/g en base seca, como se exige en la normatividad colombiana (Resolución 333 de 2011).

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Concentración del Microorganismo	tiempo (meses)	Viabilidad (Log%)	DE	Viabilidad (LogUFC/g)	DE
1,31% p/p	0	100,00	0,000	8,720	0,404
	1	89,42	3,22	8,336	0,227
	2	82,95	3,85	7,641	0,015
	3	82,34	5,81	7,493	0,193
	4	83,23	3,93	7,592	0,011
	5	81,31	4,10	7,513	0,034
	6	80,00	3,47	6,908	0,013
	7	78,00	3,44	6,843	0,039
	8	77,91	4,07	6,592	0,063
	9	75,25	0,73	6,298	0,339
2,38% p/p	0	100,00	0,000	9,089	0,471
	1	95,68	1,80	8,131	0,559
	2	87,75	6,01	7,518	0,260
	3	86,14	6,62	7,459	0,250
	4	87,25	5,63	7,539	0,116
	5	86,35	5,84	7,364	0,139

	6	85,12	5,71	7,052	0,174
	7	84,21	4,34	7,249	0,010
	8	82,57	5,93	7,054	0,162
	9	78,26	4,51	7,000	0,723

Tabla 1. Viabilidad en base seca de las formulaciones B y C

De acuerdo a los datos descritos en la Tabla 1 y las Figuras 1 A y B se puede concluir que las concentraciones de biomasa incorporada al producto no evidencian diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del microorganismo lo que indica que los agentes prebióticos ejercieron su efecto termoprotector durante el proceso de secado y durante el almacenamiento como material de reserva para mantener su supervivencia en la matriz alimenticia.

Adicionalmente, este microorganismo tiene la particularidad de ser termotolerante dada su condición estructural por poseer una endospora o cápsula que le confiere mayor resistencia frente a tratamientos térmicos agresivos.

El análisis de varianza, no mostró un efecto significativo sobre la viabilidad del *Bacillus coagulans* presente en el polvo de naranja en unidades logarítmicas tras el proceso de secado por aspersión en presencia de los agentes prebióticos mencionados ($p < 0.05$).

Ejemplo 4. Características fisicoquímicas de la composición probiótica

Adicionalmente a las pruebas descritas en el Ejemplo 3, se llevó a cabo el registro de variables fisicoquímicas como pH, acidez, sólidos solubles y actividad de agua (A_w). Estos parámetros fueron determinados periódicamente por triplicado.

En un lapso de tiempo de almacenamiento de alrededor de 7 meses el producto presenta tendencia a la higroscopicidad, entendido como la capacidad del material de absorber la humedad del ambiente, debido su contenido de azúcares, lo cual puede incidir en la calidad física y sensorial del producto, así como aumentar el riesgo de una contaminación biológica y por ende se afectada la estabilidad del producto en almacenamiento.

Los datos se muestran en la siguiente tabla:

	Características fisicoquímicas			
	pH	Acidez (%)	°Brix	Aw
Condiciones iniciales	3,32	0,9088	11	-
	3,31	0,9216	10	
	3,31	0,9216	10	
Tiempo 0	3,64	0,4096	18,0	0,34
	3,55	0,3712	16,0	0,35
				0,36
Tiempo 1	3,62	0,4288	20	0,33
	3,61	0,4160	19	0,32
	3,61	0,4480	20	0,35
Tiempo 2	3,60	0,4096	20	0,31
	3,59	0,4352	20	0,30
	3,59	0,4288	19	0,30
Tiempo 3	3,69	0,4726	22	0,34
	3,66	0,4628	20	0,36
	3,67	0,4628	22	0,37
Tiempo 4	3,72	0,6912	20	0,32
	3,72	0,7168	22	0,32
	3,72	0,6912	20	0,33
Tiempo 5	2,98	0,5120	19	0,43
	2,97	0,5227	19	0,44
	2,97		18	0,43
Tiempo 6	1,37	0,3264	11	0,45
	1,37	0,4256	10	0,45
	1,36		12	0,46
Tiempo 7	1,36	0,4992	17	0,46
	1,36	0,4960	19	0,46
	1,35		18	0,45
Tiempo 8	1,35	0,3621	16	0,42
	1,34	0,3621	17	0,46
	1,36	0,3621	18	0,47
Tiempo 9	1,35	0,3621	16	0,48
	1,34	0,3621	15	0,45
	1,37	0,3621	16	0,46

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la composición probiótica seca según el Ejemplo 1, formulación B

5

En general, el comportamiento de las propiedades fisicoquímicas del producto probiótico en polvo a través del tiempo en almacenamiento, muestra de manera relevante y estadísticamente significativa una disminución del pH, debido a la disociación de los ácidos orgánicos que tienden a acumularse dentro de los microorganismos, que pueden alterar muchas funciones metabólicas. A partir del mes 5

10

en almacenamiento, los sólidos solubles disminuyen porque se disuelven o se solubilizan en el agua que va quedando disponible en el producto, por tal razón se evidencia su incremento a través del tiempo.

- 5 Los parámetros de producción de la composición probiótica son claves, como el pH del producto final que permita la supervivencia de los microorganismos, la temperatura de almacenamiento, logrando la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial del producto, evitando la producción de metabolitos que impacten en la viabilidad o que alteren los procesos metabólicos de los microorganismos probióticos.

10

FIGURAS

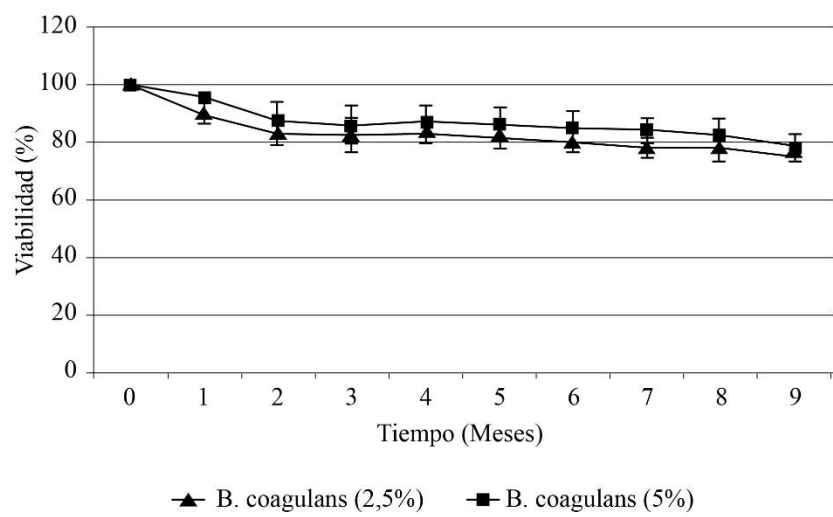


FIG. 1A

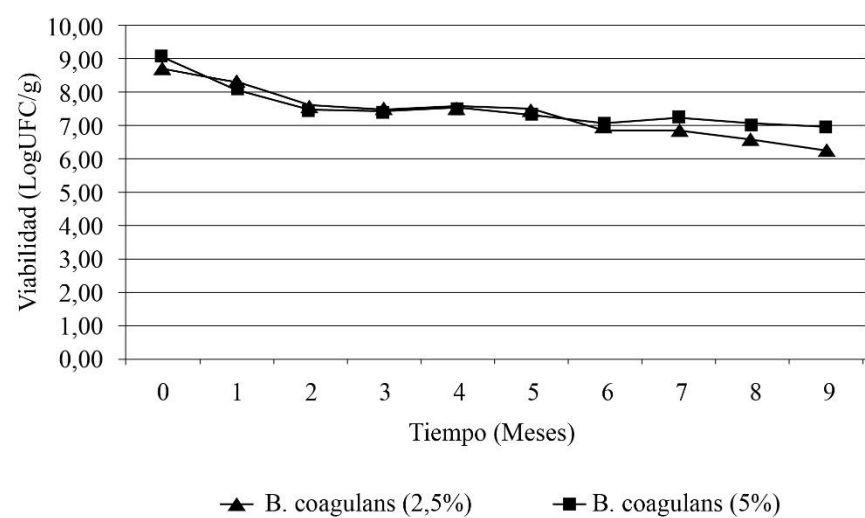


FIG. 1B

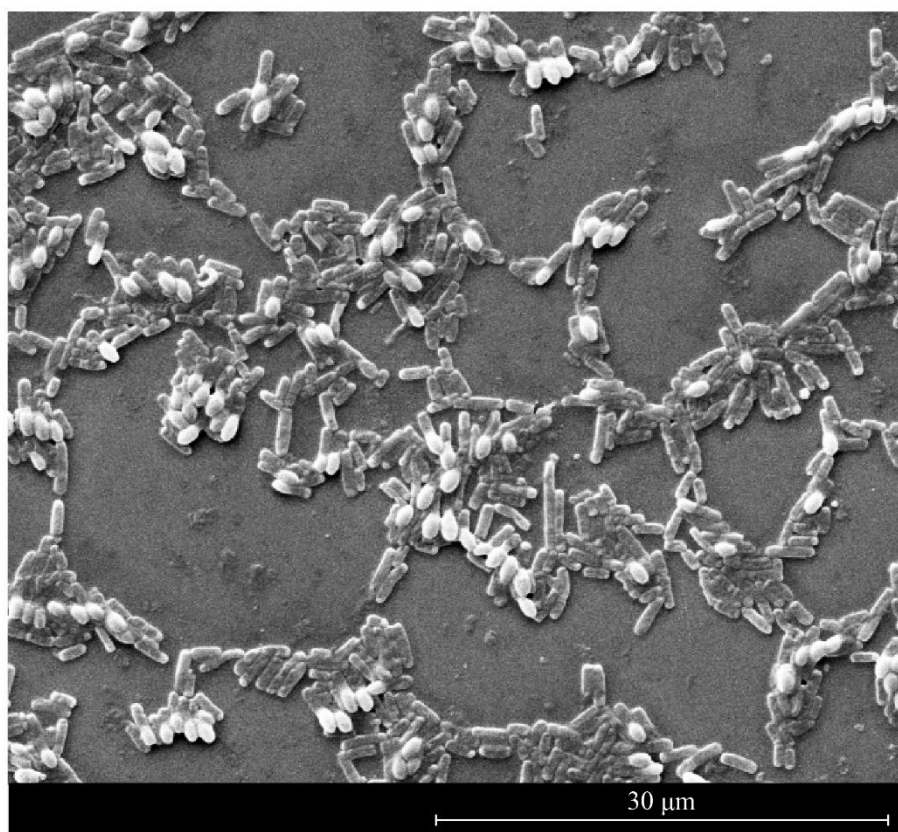


FIG. 2

REIVINDICACIONES

1. Una composición probiótica en polvo que comprende:
5 jugo o zumo deshidratado de una fruta con pH entre 3 y 4,5 o una acidez de entre 0,6 y 1,4%;
biomasa de un microorganismo probiótico del género *Bacillus*;
al menos dos sustancias prebióticas;
en donde la composición probiótica es un polvo soluble no lácteo.
10
2. La composición probiótica según la Reivindicación 1, en donde la fruta se selecciona del grupo que comprende naranja (*Citrus×sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), fresa (*Fragaria vesca*), piña (*Ananas comosus*), pera (*Pyrus communis*), cereza (*Prunus cerasus*), melocotón (*Prunus persica*) o tomate de árbol (*Solanum
15 betaceum*).
3. La composición probiótica según la Reivindicación 1, en donde el microorganismo probiótico es *Bacillus coagulans*.
- 20 4. La composición probiótica según la Reivindicación 1, en donde la biomasa del microorganismo está en una concentración entre 0,8 y 5,7% p/p y células viables entre 10^6 y 10^{12} UFC/g.
5. La composición probiótica según la Reivindicación 1, en donde las sustancias
25 prebióticas se seleccionan del grupo que comprende inulina, maltodextrina, oligofructosa, fructooligosacaridos (FOS), almidón resistente, galactooligosacáridos (GOS), galactotriosa/TOS, Xilooligosacáridos (XOS) y lactulosa.
6. La composición probiótica según la Reivindicación 1, en donde las al menos dos
30 sustancias prebióticas se encuentran en proporciones 1:1 a 1:4.

7. Un método para la fabricación de una composición probiótica en polvo, que comprende:

a. someter jugo o zumo de una fruta con pH entre 3 y 4,5 o una acidez de entre 0,6 y 1,4% a una pasteurización lenta y dejar enfriar entre 4 y 10°C;

5 b. adicionar al zumo resultante de la etapa a) sustancias prebióticas;

c. adicionar a la mezcla obtenida en b) biomasa de un microorganismo probiótico del género *Bacillus* a una concentración de al menos 10^6 UFC/g;

d. agitar la mezcla de c) durante 10 minutos entre 100 a 150 rpm, a temperatura entre 18 y 25 °C;

10 e. secar por aspersión la mezcla obtenida en d) a una temperatura de entrada entre 100 y 130°C, temperatura de salida entre 73 y 77°C, humedad relativa entre 55 y 65%, velocidad de aspersión de 32000 rpm e inyección de aire del 80% de la capacidad máxima.

15 8. El método según la Reivindicación 7, en donde por cada litro de zumo se adicionan las sustancias prebióticas en una proporción entre 1:1 a 1:4 a una concentración entre 5,0 y 20% p/v.

9. El método según la Reivindicación 7, en donde en la etapa c) se adiciona entre
20 2,0 y 10% p/v de biomasa.

10. El método según la Reivindicación 7, en donde las condiciones del secado por aspersión son temperatura de entrada de 130°C, temperatura de salida de 75°C, humedad relativa de 62%, velocidad de aspersión de 32000 rpm e inyección de aire del
25 80%.

11. Uso de la composición probiótica en polvo según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 para la regeneración de la microbiota beneficiosa del tracto gastrointestinal, la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de amoníaco, estimulación del sistema inmune, estimulación selectiva del crecimiento de bacterias
30 beneficiosas del colon, protección frente a infecciones intestinales y disminución del riesgo de padecer cáncer de colon, favorecer la absorción de minerales, disminución de

alergias tópicas, reducción de la presión arterial, y niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos, fosfolípidos en sangre, síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado, inhibición del crecimiento de bacterias productoras de amoníaco.

RESUMEN

El presente desarrollo se refiere a una composición probiótica no láctea en polvo soluble, que comprende jugo o zumo de una fruta con pH entre 3 y 4,5 o una acidez de
5 entre 0,6 y 1,4%, biomasa de un microorganismo probiótico del género *Bacillus* y sustancias prebióticas. El presente desarrollo, también se refiere al método para producir dicha composición a través secado por aspersión.

La composición y método desarrollados permite microencapsular el microorganismo
10 probiótico de tal manera que exhibe una viabilidad celular por encima de las 6 unidades exponenciales y una estabilidad microbiológica y fisicoquímica de aproximadamente 12 meses favoreciendo el efecto estabilizador y protector gastrointestinal.