

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 724**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2006** **E 09180335 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 2169050**

54 Título: **Procedimiento de preparación de cultivos bacterianos probióticos analérgicos y uso relacionado**

30 Prioridad:

11.10.2005 IT MI20051910

23.06.2006 IT MI20061212

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

29.05.2014

73 Titular/es:

PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)

VIA MATTEI 3

28100 NOVARA (NO), IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI y

STROZZI, GIAN PAOLO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 463 724 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de cultivos bacterianos probióticos analérgicos y uso relacionado

El objetivo de la presente invención, es un procedimiento para la preparación de cultivos bacterianos probióticos analérgicos.

- 5 Se sabe que el tracto gastrointestinal (GI) humano contiene una comunidad microbiana compleja, llamada microbiota, que consta principalmente de bacterias estrictamente anaerobias capaces de desempeñar diferentes acciones con efectos que afectan a nivel gastrointestinal local e indirectamente a nivel sistémico general, que implican casi todos los órganos y las funciones del huésped.
- 10 La microflora intestinal, que consta de una gran diversidad de diferentes especies (400-500) capaces de colonizar tanto la mucosa intestinal como las partículas de alimento ingerido, es entonces capaz de condicionar en gran medida la salud del individuo.
- La composición de la microflora intestinal puede alterarse por varios factores, tales como la edad, el estado fisiológico del individuo, la presencia de diferentes patologías, el estrés y por encima de todo la dieta.
- 15 Como consecuencia de factores negativos endógenos y exógenos, hay una disminución de las bacterias útiles (típicamente bacterias que pertenecen al grupo de las ácido lácticas en el intestino delgado y bifidobacterias en el intestino grueso) y un aumento de las enterobacterias, estreptococos y clostridios patógenos.
- La administración de probióticos específicos a través de especialidades medicinales, productos dietéticos, productos integradores y por encima de todo el alimento (los llamados alimentos "funcionales" o "nutracéuticos") permite re-equilibrar la microflora del huésped, restaurando una funcionalidad intestinal óptima.
- 20 El término "probiótico" se refiere habitualmente a microorganismos vivos, seleccionados entre la microflora intestinal de individuos sanos, que una vez administrados en cantidades oportunas y durante un tiempo adecuado, son capaces de colonizar, también en casos solamente temporales, los diferentes tractos del intestino y de conferir un efecto beneficioso a la salud del organismo huésped.
- 25 Pertenecen a los probióticos principalmente algunas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc* y en menor medida, *Saccharomyces*, *Bacillus* y *Enterococcus*.
- Entre los efectos saludables y beneficiosos, mostrados por ensayos clínicos rigurosos realizados en todo el mundo e inducidos en el consumidor por la ingesta de probióticos pueden mencionarse:
1. Estimulación del sistema inmune;
 - 30 2. Inducción de efectos antimutagénicos y antigenotóxicos;
 3. Acción antitumoral y antimetastásica que se refiere, por ejemplo, a:
 - carcinoma de intestino grueso
 - carcinoma de mama
 - cáncer de vejiga
 - 35 4. Mejora de la absorción de nutrientes;
 5. Disminución de los síntomas de intolerancia a la lactosa;
 6. Mejora de la motilidad intestinal debido a la disminución del pH y a la disminución del estreñimiento;
 7. Disminución de la absorción de colesterol y grasas;
 8. Actividades anti-diarréicas, anti-hipertensivas, anti-diabéticas que inhiben infecciones del sistema urogenital femenino;
 - 40 9. Actividad de prevención de patologías geriátricas.
- Los probióticos para uso oral deben caracterizarse por los siguientes requisitos generales y funcionales:
- i) origen intestinal humano; de individuos en buen estado de salud;
 - ii) bio-seguridad; no deben causar efectos secundarios especialmente en personas debilitadas o inmunodeprimidas;
 - 45 iii) resistencia y viabilidad; deben tener características de resistencia tales para ser capaces de sobrevivir al jugo

gástrico, las secreciones pancreáticas y biliares de modo que alcancen el íleo y el colon de forma intacta y aún perfectamente viables.

La competición que comienza entre los microorganismos probióticos y la microflora patógena solamente puede suceder si, una vez ingeridos, los microorganismos probióticos son capaces de alcanzar el tracto intestinal y por lo tanto de sobrevivir a la acidez gástrica y a la elevada concentración de las sales biliares. Generalmente, una vez han alcanzado el tracto intestinal, se dice que empiezan a través de mecanismos de adhesión que implican proteínas y/o carbohidratos con funcionalidades de adhesión específica a las vellosidades intestinales.

A nivel industrial, los probióticos se producen en forma de cultivos bacterianos liofilizados, concretamente se determina el crecimiento de las células en un medio apropiado (fermentación) y después, tras la concentración y purificación de la biomasa, se realiza la deshidratación de la misma por liofilización. Dicho procedimiento es necesario para permitir que las bacterias se reproduzcan por sí mismas en una cantidad adecuada (etapa fermentativa) y para conservarse a sí mismas durante un largo tiempo (etapa de liofilización).

Para que el procedimiento fermentativo se realice satisfactoriamente y con rendimientos adecuados, es necesario proporcionar a las células fuentes de carbono y nitrógeno, oligoelementos y bioactivadores en cantidades oportunas.

Tradicionalmente, tratando las habitualmente llamadas bacterias "lácticas", los sustratos seleccionados usados como fuente de nitrógeno son suero, proteínas séricas de la leche, hidrolizados y peptonas de caseína, caseinatos, etc., mientras que como fuente de carbono, habitualmente se emplean lactosa y glucosa, ya que se pueden metabolizar fácilmente por casi todos los organismos vivos.

Los hidrolizados de proteínas se han usado como sustratos por ejemplo en los documentos WO 2006/073145; WO 2005/0010170; y US 2005/214270.

En los últimos años, también probablemente a causa de una dieta muy poco variada y demasiado rica en proteínas y lípidos, en países de Europa y países occidentales se ha registrado un sensible aumento de la cantidad de personas que padecen patologías de tipo alérgico.

Las reacciones inmunes de tipo IV o mediadas por IgE se llaman "alérgicas", durante las que, después de un primer contacto de sensibilización (que puede suceder en cualquier momento de la vida, también en un momento intrauterino) se producen IgE específicas con un mecanismo mediado por histamina.

Dichas reacciones también pueden estar causadas por dosis extremadamente reducidas de moléculas llamadas "alérgenos", con consecuencias clínicas que pueden cambiar desde simples reacciones cutáneas ligeras a choque anafiláctico y muerte.

Debido a la peligrosidad de estas sustancias para algunas personas, la Comunidad Europea ha adoptado una norma de modo que tiene que mostrarse claramente "el uso en la producción y la presencia en el alimento" en la etiqueta de alimentos que pertenecen a las siguientes clases (Anexo III bis del anterior mandamiento) (art. 6 sub. 10, mandamiento 2000/13/EC modificado por tanto por la instrucción 2003/89/EC):

cereales que contienen gluten (es decir trigo, centeno, cebada, avena, escanda, kamut o sus cepas híbridadas) y productos derivados; crustáceos y productos basados en crustáceos; huevos y productos basados en huevos; pescado y productos basados en pescado; cacahuetes y productos basados en cacahuetes; soja y productos basados en soja; leche y productos basados en leche (incluyendo la lactosa); frutos con cáscara, es decir, almendras (*Amigdalus communis* L.), avellanas (*Corylus avellana*), nueces comunes (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium occidentale*), pacanas [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch], nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*), pistachos (*Pistacia vera*), macadamias (*Macadamia ternifolia*) y productos derivados; apio y productos basados en apio; mostaza y productos basados en mostaza; semillas de sésamo y productos basados en semillas de sésamo; dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones mayores de 10 mg/kg o 10 mg/l expresadas como SO₂.

Como, típicamente para la producción de probióticos, se usan derivados de sustratos basados en leche (como fuente de nitrógeno) y glucosa (como fuente de carbono), que se origina habitualmente a partir del almidón (también almidón de trigo), los probióticos pueden considerarse peligrosos si se administran a sujetos particularmente sensibles, incluso si, como mucho, pudieran contener realmente solo pequeñas trazas de alérgenos (por lo tanto derivados de la leche y/o del gluten).

En el caso de la leche, pueden distinguirse dos causas de reacción adversa a este alimento; la alergia a las proteínas de la leche de vaca (APLV) y la intolerancia a la lactosa.

La leche, junto con el huevo, es el alimento más alergénico; esta característica de la misma se determina por las sustancias proteicas contenidas por la misma, lo que es principalmente alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina y caseínas.

La alergia a las proteínas de la leche de vaca es una patología relativamente frecuente en el primer año de vida. La sintomatología es, en el 50-70 % de los casos, de tipo gastroentérico, pero en el 50-70 % de los casos hay

trastornos cutáneos, en el 20-30 % trastornos respiratorios y en el 5-9 % trastornos sistémicos (anafilaxis). La APLV tiende a atenuarse por sí misma después del primer año de vida y a desaparecer hacia los 10 años y es inusual en los adultos.

5 La intolerancia a la lactosa tiene un transcurso opuesto, que es muy inusual en el primer año de vida y muy frecuente en el adulto, en particular en algunas poblaciones (africanas, asiáticas, amerindias).

10 La leche es un alimento fundamental desde el nacimiento y el recién nacido ya produce la enzima necesaria para la descomposición del azúcar de la leche, la lactosa, en sus componentes simples glucosa y galactosa. Después del primer año de vida, la leche llega a ser un alimento menos importante y la lactasa se reduce espontáneamente, de modo que muchos adultos llegan a ser intolerantes (no alérgicos) a la leche. La enfermedad celíaca es una enfermedad inflamatoria enteropática, crónica, mediada por el sistema inmune, que surge por la ingestión de gluten, una proteína de "almacenamiento" contenida de forma natural en algunos cereales.

15 Esta intolerancia a alimentos afecta a personas genéticamente predispuestas, que tienen un sistema inmune que responde de un modo anormal a la ingestión de fracciones proteicas típicas del gluten del trigo, de la escanda (un tipo de trigo), del kamut y de la espelta (un tipo de trigo), cebada, centeno, triticale (un cruce entre trigo y centeno) y sus derivados. Algunos individuos también presentan intolerancia a las proteínas de la avena.

Técnicamente, el término "gluten" se aplica a la combinación de las proteínas simples prolamínicas (ricas en prolina), llamadas "gliadinas" y glutelínicas (ricas en glutamina), llamadas "gluteninas", de los cereales mencionados anteriormente.

20 En el contexto de la enfermedad celíaca, el término "gluten" se usa a menudo con referencia a todos los tipos de proteínas contenidas en los cereales, aunque entre las diferentes fracciones proteicas que forman el gluten, la gliadina parece ser la más perjudicial.

25 En las personas afectadas por la enfermedad celíaca, se supone que el gluten, también en pequeñas cantidades, es capaz de causar la respuesta anormal del sistema inmune: la transglutaminasa, una enzima que existe en el tejido mucoso intestinal, se une a la gliadina y a través de desamidación la transforma en una molécula capaz de activar las células T (células del sistema inmune capaces de mediar todas las respuestas inmunes hacia antígenos proteicos), con una producción consecuente de inmunoglobulinas IgG e IgA anti-transglutaminasa e IgA anti-entendimiento.

30 En una primera fase, sucede un aumento de las células T activadas intestinales intraepiteliales, aunque con el progreso de la enfermedad el aumento se refiere tanto a los linfocitos como a las células plasmáticas infiltradas de la lámina propia, con una producción de metaloproteinasas responsables del acortamiento de las vellosidades y por lo tanto del daño a la mucosa intestinal.

Hasta ahora no existe la posibilidad de prevenir el desarrollo o tratar la enfermedad celíaca, por lo tanto una dieta libre de gluten, llevada a cabo estrictamente durante toda la vida es la única terapia capaz de asegurar a la gente afectada por la enfermedad celíaca una salud perfecta.

35 Las personas celíacas deben eliminar también las trazas más pequeñas de la harina de los cereales peligrosos, porque la ingesta de gluten, también en cantidades mínimas, puede desencadenar la respuesta autoinmune.

40 Como la proporción de la cantidad de gluten ingerido frente al efecto tóxico inducido a nivel intestinal aún no se ha definido, el término "trazas" tiene una importancia práctica fundamental en el tratamiento de la enfermedad celíaca e implicaciones en el plan de legislación de alimentos, porque se refiere al límite máximo de gluten "aceptable" (umbral) en los productos adecuados para la dieta de una persona celíaca. Todos los expertos en la técnica están de acuerdo en que una dosis de 100 mg por día de gliadina, igual a 200 mg de gluten, es decir, aproximadamente 3 g de pan, es suficiente para causar, en la mayoría de las personas celíacas, el aumento de los linfocitos intraepiteliales intestinales, un signo prematuro de inflamación intestinal persistente. Con referencia al umbral mínimo, los pocos trabajos científicos realizados hasta ahora parecen mostrar que la ingestión de hasta 10 miligramos por día de gliadina (igual a 20 partes por millón de gluten) no es capaz de dañar sensiblemente la mucosa intestinal, pero puede determinar, en una minoría de los casos, la aparición de síntomas gastroentéricos.

50 A nivel legislativo internacional, la antigua norma "*Norma del Codex para Alimentos Libres de Gluten*", aún en vigor, muestra, como contenido máximo de gluten en los productos terapéuticos de la dieta, 0,05 de nitrógeno por 100 g de producto seco (con referencia al almidón de trigo), que corresponde a una fracción de gluten igual a aproximadamente 500 ppm.

55 Sin embargo, está teniendo lugar una revisión correcta y apropiada de la directriz mencionada anteriormente, que parece prever que los alimentos libres de gluten resultantes de ingredientes libres de gluten de forma natural no tienen que contener más de 20 ppm de gluten, mientras que los alimentos libres de gluten, derivados de cereales con gluten, pueden tener un límite máximo de 200 ppm de gluten. En Francia, Gran Bretaña y los Países Bajos, esperando la revisión de las directrices mencionadas anteriormente, consideran, como límite máximo para los productos libres de gluten, 200 ppm.

En el ámbito nacional, la norma actual parece ser más precautoria que la de la comunidad y la internacional, de hecho se establece un límite de "20 partes por millón", tanto para los alimentos fabricados con materias primas libres de forma natural de gluten como para los alimentos purificados de dicha sustancia.

5 La norma prevé que "si en la composición del producto alimenticio o en la de uno o más ingredientes (aromatizantes, aditivos o coadyuvantes) que forman el mismo, están presentes cereales que contienen gluten o sustancias derivadas de los mismos y/o si del procedimiento de producción puede obtenerse una cantidad de gluten en el producto final, determinada analíticamente como mayor de 20 partes por millón, dicho producto tendrá que mostrar en la etiqueta, en el pie de la lista de ingredientes y de un modo bien visible, las palabras "producto que contiene gluten".

10 La exclusión completa del gluten de la dieta sin embargo no es fácil de realizar, considerando que pueden suceder fenómenos de contaminación cruzada de cereales y derivados (almidones, harinas, harina de almidón, etc.) libres de forma natural de gluten, ya a nivel de la industria harinera. Dichos productos se usan después por la industria alimentaria en la preparación de alimentos complejos basados en múltiples ingredientes tecnológicos, aditivos y coadyuvantes de diferente origen y naturaleza.

15 Una investigación reciente ha mostrado que hasta el 6 % de los productos "teóricamente" libres de gluten, en base a los ingredientes presentados, realmente contienen más de 30 mg de gliadina por 100 g de producto final, igual a 600 ppm de gluten.

20 Para el propósito de excluir una posible contaminación con gluten, por lo tanto es necesario considerar, para cada producto alimenticio comercializado, no solamente todos los ingredientes usados y el procesamiento, sino también la cadena de producción de cada ingrediente individual.

25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de ser capaces de producir cultivos bacterianos probióticos libres de sustancias alergénicas debido al uso de sustratos de fermentación basados en leche o cereales o, como alternativa, debido a contaminaciones no intencionadas o cruzadas. De hecho, no obstante es posible que, debido a contaminaciones cruzadas, no intencionadas y accidentales, algunos compuestos usados en el procedimiento de producción lleven trazas de alérgenos.

30 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de ser capaces de proporcionar un procedimiento para la preparación de cultivos bacterianos probióticos que prevea, en cada etapa del procedimiento de producción, incluyendo la fermentación, el uso de sustancias analérgicas. En particular, es deseable localizar y seleccionar sustratos de fermentación, diferentes de la leche y sus derivados y los cereales que contienen gluten, que representen una buena fuente de nitrógeno y carbono.

Por lo tanto, todos los operadores del sector están de acuerdo en que, hasta ahora, sigue existiendo una necesidad muy importante de proporcionar un procedimiento para la preparación de cultivos bacterianos probióticos capaz de usar sustratos alternativos a los usados hasta hoy y simultáneamente, capaz de reducir las contaminaciones cruzadas, no intencionadas y accidentales, en caso de que ocurran.

35 En particular, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un procedimiento para la preparación de cultivos bacterianos probióticos que prevea un doble nivel de seguridad en relación a la ausencia de sustancias alergénicas.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de medios de cultivo capaces de superar los límites de la técnica conocida.

40 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una metodología para la producción de cultivos bacterianos probióticos seguros para administrarlos a toda la población, también a la gente afectada por alergias.

Estos y otros objetivos, que resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los ha logrado el solicitante, que ha mejorado una metodología que incluye un nivel de seguridad doble en relación a la ausencia de alérgenos en los procedimientos de producción de cultivos bacterianos probióticos.

45 En particular, el solicitante ha establecido una metodología de producción en la que se usan sustratos de fermentación analérgicos seleccionados (materias primas analérgicas), capaces de asegurar una fuente apropiada de nitrógeno y carbono a los cultivos probióticos.

50 Un procedimiento para la preparación de cultivos bacterianos probióticos analérgicos, una composición que incluye dicho cultivo y el uso de dicho cultivo para la preparación de los así llamados alimentos "funcionales" o "nutracéuticos" forman el objeto de la presente invención, que tiene las características definidas en las reivindicaciones adjuntas.

En una realización de la invención, las cepas de dicho cultivo bacteriano pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*.

Preferiblemente, del género *Lactobacillus*, han encontrado uso las siguientes especies: *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L.*

casei, *L. casei ssp. paracasei*, *L. casei ssp. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*.

5 Se presentan ejemplos de las cepas usadas de dichas especies en la **Tabla 1** adjunta. Preferiblemente, del género *Bifidobacterium*, han encontrado uso las siguientes especies: *B. longum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. adolescentis* y *B. pseudocatenulatum*.

Se presentan ejemplos de las cepas usadas de dichas especies en la Tabla 1 adjunta. Preferiblemente, del género *Lactococcus* han encontrado uso las siguientes especies: *L. lactis* y *L. lactis ssp. lactis*.

Se presentan ejemplos de las cepas usadas de dichas especies en la Tabla 1 adjunta. Preferiblemente, del género *Streptococcus* han encontrado uso las siguientes especies: *S. thermophilus*.

10 Se presentan ejemplos de las cepas usadas de dichas especies en la Tabla 1 adjunta.

En una realización particularmente preferida de la invención, las bacterias de dicho cultivo bacteriano se seleccionan entre el grupo que incluye las cepas bacterianas probióticas presentadas en la Tabla 1 adjunta.

15 El solicitante ha encontrado útil seleccionar y emplear materias primas analérgicas particulares. En particular, el solicitante ha encontrado, como fuente de nitrógeno, peptonas y/o hidrolizados proteicos de origen vegetal y/o animal, libres de forma natural de gluten y alérgenos de origen lácteo y como una fuente de carbono, glucosa y/o otros mono- o di-sacáridos derivados de la hidrólisis de polisacáridos más complejos típicos de especies vegetales libres de forma natural de gluten y alérgenos de origen lácteo.

20 Las peptonas de origen vegetal se seleccionan entre el grupo que incluye: los tipos de arroz, de patata, de maíz, de castañas, de tapioca, de mandioca, de guisante, de habas y sus mezclas capaces sin embargo de promover el crecimiento bacteriano de fermentación, pero sin producir alérgenos, ni de la leche ni de tipo gluten.

En una primera realización preferida, el procedimiento objeto de la presente invención prevé el uso, como una fuente de nitrógeno, de una o más peptonas y/o hidrolizados proteicos analérgicos y como fuente de carbono, glucosa y/o otros mono- o di-sacáridos derivados de la hidrólisis de polisacáridos complejos (materias primas analérgicas).

25 En una segunda realización preferida, el procedimiento objeto de la presente invención prevé un pre-tratamiento de las materias primas con enzimas adecuadas para la eliminación de trazas, si las hay, de alérgenos derivados de la contaminación cruzada que sucede a lo largo de la cadena de producción y/o distribución.

30 En el contexto de la presente invención, el sustrato de cultivo es un sustrato de cultivo analérgico de origen vegetal y/o animal, libre de forma natural de gluten, alérgenos de origen lácteo y todas las sustancias que pertenecen a la lista del anexo III bis de los mandamientos (materias primas analérgicas) mencionados anteriormente. El uso de las materias primas analérgicas mencionadas anteriormente permite obtener probióticos certificables para su uso en personas alérgicas, ya que se puede asegurar el no uso de sustancias que pertenecen a la lista del anexo III bis de los mandamientos de la comunidad mencionados anteriormente y el uso de ingredientes certificados por el proveedor como libres de dichas sustancias.

35 Entonces, en virtud del hecho de que la ausencia de cualquier sustancia química en una muestra dada no es científicamente demostrable, pero alguien puede determinar de forma simple que la cantidad posiblemente existente es inferior al límite de detección del procedimiento analítico usado (incluso si se usó el procedimiento más sensible y delicado conocido en la técnica), también el uso de un pre-tratamiento enzimático resulta ser una fuente de garantía adicional.

40 Simplemente a modo de ejemplo, a continuación se presentan algunas formulaciones analérgicas de medio para el crecimiento de cultivos bacterianos probióticos.

Los componentes de un medio de cultivo deben proporcionar fuentes de nitrógeno (en este caso peptonas y/o hidrolizados proteicos), fuentes de carbono (en este caso, la glucosa y/o otros mono- o di-sacáridos derivados de la hidrólisis de polisacáridos complejos), bioactivadores del crecimiento y vitaminas (en este caso de extracto de levadura) y sales minerales.

45 Por ejemplo, un medio de cultivo puede contener:

- glucosa preferiblemente seleccionada entre: almidón de maíz, patata, sacarosa de remolacha o sacarosa de caña;
- peptona preferiblemente seleccionada entre: los tipos de arroz, de patata, de maíz, de castaña, de tapioca, de mandioca, de guisante, de habas, de judía o generalmente de legumbres y sus mezclas;
- peptona preferiblemente seleccionada entre: el tipo de carne;

50 - extracto de levadura; sales minerales (tales como, simplemente a modo de ejemplo: acetatos, carbonatos, fosfatos, hidrogenofosfatos, cloruros, citratos, sulfatos y otros); coadyuvante de detergencia (si es necesario, tal como: Tween,

lecitinas y otros) y agua potable.

Una de las formulaciones adecuadas para el cultivo de cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* podría incluir preferiblemente los siguientes ingredientes:

glucosa (de las fuentes enumeradas anteriormente)	10-100 g/l
peptona de arroz	10-50 g/l
peptona de carne	10-50 g/l
extracto de levadura	2-20 g/l
sales minerales	1-10 g/l
coadyuvantes	0-5 ml/l
agua potable	c.s. al volumen deseado

Un ejemplo preferido de un medio para cultivos bacterianos probióticos analérgicos podría ser el siguiente:

glucosa (de almidón de maíz)	20 g/l
peptona de arroz	10 g/l
peptona de carne	10 g/l
extracto de levadura	5 g/l
acetato sódico	5 g/l
citrato amonio	2 g/l
fosfato potásico dibásico	2 g/l
sulfato de magnesio	0,1 g/l
sulfato de manganeso	0,05 g/l
tween 80	1 ml/l
agua potable	c.s. al volumen deseado

- 5 La fermentación se realiza de acuerdo con las enseñanzas conocidas para los expertos en la técnica y en las condiciones experimentales de uso habitual.

El solicitante ha verificado la presencia, o no, de trazas de alérgeno en un cultivo probiótico que ha crecido sobre las materias primas objeto de la presente invención.

- 10 Por ejemplo, en el caso de alérgenos derivados de la leche, la investigación por medios analíticos de β -lactoglobulina y lactosa en los productos, con metodologías específicas y sensibles confirmadas (análisis con kit ELISA específico para la β -lactoglobulina del tipo "kit de cuantificación por ELISA de β -lactoglobulinas bovinas - Bethyl Laboratories", con un límite umbral de 0,05 ppm y análisis con kit quimioenzimático y detección UV-vis para la lactosa del tipo "lactosa/D-glucosa - Boehringer Mannheim, cod. 10986119", con un límite umbral de 7 ppm) da un resultado negativo y por lo tanto, estas sustancias, si las hay, deben estar ciertamente por debajo del umbral de detección.

Al mismo tiempo, la investigación del gluten realizada con la metodología más delicada y hasta ahora, confirmada más sensible (kit de gliadina ELISA RIDASCREEN® - R-Biopharm A, Darmstadt, Alemania, con una sensibilidad igual a 3 ppm) permite confirmar la ausencia de gluten. Se entiende que, incluso si estuviera presente el gluten, su concentración debería estar en cualquier caso por debajo del umbral de detección, concretamente inferior a 3 ppm.

- 20 El pre-tratamiento enzimático sobre las materias primas, a realizar o no en función de los requisitos, es capaz de hidrolizar las trazas de leche y derivados y el gluten y derivados que existan accidentalmente en el medio de cultivo. Dicho tratamiento confiere el nivel de seguridad más elevado para un uso también adecuado para personas alérgicas y particularmente sensibles.

- 25 Esta estrategia de fabricación es adecuada para la producción de probióticos con un grado de seguridad analérgica llamado DSS - Sistema de Doble Seguridad.

El pre-tratamiento enzimático prevé el uso de al menos una enzima proteolítica y/o el uso de al menos una enzima

glucosidasa.

En el contexto de la presente invención, la enzima proteolítica es capaz de realizar una proteólisis. La enzima proteolítica se selecciona entre el grupo que incluye las proteasas y/o las peptidasas. Las proteasas y las peptidasas se seleccionan entre el grupo que incluye: tripsina, quimiotripsina, pancreatina, pepsina, papaína y bromelaína. Preferiblemente, las proteasas y las peptidasas se seleccionan entre pepsina y/o bromelaína. En el contexto de la presente invención, la enzima glucosidasa es capaz de realizar una escisión hidrolítica de un glucósido. La enzima glucosidasa se selecciona entre el grupo que incluye: alfa-glucosidasa y beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa y beta-galactosidasa.

De forma ventajosa, el tratamiento enzimático de las materias primas que forman el caldo de cultivo para los probióticos se realiza con proteasas (alcalasa y bromelaína) y con las glucosidasas.

Las glucosidasas se seleccionan entre el grupo que incluye: lactasa (o β -galactosidasa). En una realización preferida, el pre-tratamiento de las materias primas prevé el uso en una secuencia que incluye tres enzimas: alcalasa, lactasa y bromelaína.

En una realización preferida, la selección de las enzimas y su secuencia es la siguiente:

- alcalasa, que hidroliza prácticamente todas las proteínas y particularmente las de la leche;
- lactasa, que hidroliza la lactosa;
- bromelaína, que hidroliza el gluten.

La secuencia mostrada es una función del pH de hidrólisis óptimo en un gradiente de básico a ácido; de este modo, el medio conserva las propiedades nutritivas. La alcalasa, activa hacia la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina y las caseínas, permite eliminar los residuos alergénicos, si los hay, derivando de contaminaciones cruzadas fortuitas y no intencionadas con derivados de la leche.

Dicho tratamiento prevé la adición a las materias primas disueltas en agua de una cantidad de enzima que varía entre 0,0025 y 0,0500 g/l, correspondiente a 0,001-0,020 UA/l (Unidades Anson por litro). La solución después se lleva a una temperatura entre 45 y 55 °C durante 15-60 minutos, con un pH entre 7 y 8; preferiblemente, un pH controlado de $7,50 \pm 0,20$.

La lactasa, también conocida como β -galactosidasa, se carga para la hidrólisis del enlace glucósido entre la glucosa y la galactosa en el disacárido lactosa.

El tratamiento con lactasa se realiza después de la hidrólisis con proteínas alcalasa tras haber llevado el pH del caldo de cultivo a un valor entre 6 y 7; preferiblemente, un valor de $6,50 \pm 0,20$ con ácidos orgánicos (preferiblemente ácido láctico) añadiendo 250-2.000 ULN/l (Unidades de Lactasa Neutra por litro), correspondiente 0,05 - 0,40 ml de una solución enzimática titulada a 5.000 ULN/g.

La solución se mantiene a 37 ± 5 °C durante un periodo variable de 2-6 horas. Finalmente, la bromelaína es una enzima proteolítica contenida de forma natural en la piña, capaz de hidrolizar de forma eficaz la gliadina en fragmentos no reconocidos por el sistema inmune y por lo tanto no alergénicos.

El tratamiento se realiza añadiendo el medio de fermentación con la enzima a la cantidad de 0,005-0,010 g/l (igual a 110 - 220 UDG/l, Unidades Digestivas de Gelatina por litro), después de la corrección del pH a valores de 5,0-6,0 con ácidos orgánicos (preferiblemente ácido láctico). La temperatura de trabajo debe mantenerse a 37 ± 5 °C durante un tiempo entre 1 y 6 horas.

Después de los tres tratamientos enzimáticos, es necesario restaurar el pH al valor óptimo para la fermentación de las cepas individuales (preferiblemente con NaOH 5 N para basificar, o con ácido láctico para acidificar).

Después, se realiza un tratamiento con calor para la purificación del medio (realizado a temperaturas entre 90 y 145 °C durante tiempos que varían de unos pocos segundos a 45 minutos), que sin embargo desnaturalizará e inactivará las enzimas añadidas, sin riesgos adicionales para el producto final y la gente destinataria que deriven de los residuos de la enzima usada.

Un diseño de producción industrial típico por lo tanto prevé las siguientes etapas:

- a. la selección de las materias primas analérgicas
- b. la disolución de las materias primas en agua
- c. la corrección del pH y la temperatura a valores apropiados para el uso de la enzima proteolítica, preferiblemente alcalasa

- d. la adición de la enzima y su acción durante el tiempo requerido
- e. la corrección del pH y la temperatura a valores apropiados para el uso de la enzima glucolítica, preferiblemente lactasa
- f. la adición de la enzima y su acción durante el tiempo requerido
- 5 g. la corrección del pH y la temperatura a valores apropiados para el uso de la enzima proteolítica, preferiblemente bromelaína
- h. la adición de la enzima y su acción durante el tiempo requerido
- i. la corrección del pH hasta valores adecuados para la fermentación
- j. la purificación a través de pasteurización y/o esterilización del medio de cultivo
- 10 k. la refrigeración a la temperatura de inóculo típica de la cepa probiótica en producción (37 ± 2 °C).
- l. la inoculación de la cepa
- m. la fermentación
- n. la separación de la biomasa y crioprotección
- o. la liofilización.
- 15 La presente invención entonces permite producir cepas probióticas analérgicas y en particular con absoluta ausencia de alérgenos, más preferiblemente de derivados de la leche y el gluten, con una amplia seguridad de uso para todas las clases de poblaciones.
- De forma ventajosa, los cultivos bacterianos probióticos analérgicos preparados de acuerdo con los contenidos de la presente invención pueden usarse de forma eficaz para la preparación de formulaciones farmacéuticas.
- 20 En vista de la elevada cantidad de personas alérgicas a la leche (el 3-5 % de la población con una edad por debajo de los 2 años) y de personas celíacas (el 1 % de la población total) es útil intentar desarrollar bacterias probióticas que puedan administrarse también a estas clases de población.
- La presente invención entonces es útil:
- para los consumidores, para los que la transparencia en el etiquetado es fundamental;
- 25 • para los productores, que de este modo pueden contar con un producto con una garantía total de sus propiedades analérgicas, por lo tanto, que se puede proponer a la población completa que compra.
- En la presente realización, un procedimiento para la preparación de cultivos bacterianos probióticos analérgicos está **caracterizado porque** incluye al menos una etapa en la que las bacterias están en contacto con un medio de cultivo analérgico.
- 30 Preferiblemente, la preparación de dicho cultivo bacteriano probiótico comprende al menos una etapa en la que las bacterias de dicho cultivo, están seleccionadas entre el grupo que incluye los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, se producen a través de un desarrollo en un medio analérgico.
- 35 Preferentemente, las bacterias de dicho cultivo se seleccionan entre el grupo que comprende las siguientes especies bacterianas: *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei ssp. paracasei*, *L. casei ssp. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *B. longum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. adolescentis* y *B. pseudocatenulatum*, *L. lactis* y *L. lactis ssp. Lactis*, *S. thermophilus*
- Preferiblemente, las bacterias de dicho cultivo se seleccionan del grupo que comprende las siguientes especies bacterianas:

1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG P-18383
2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG P-18384
3	<i>Lactobacillus pentosus</i>	LMG P-21019
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21020

5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21021
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21022
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21023

8	<i>Lactobacillus casei ssp. paracasei</i>	LMG P-21380
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LMG P-21381
10	<i>Bifidobacterium longum</i>	LMG P-21382
11	<i>Bifidobacterium breve</i>	LMG P-21383
12	<i>Bifidobacterium lactis</i>	LMG P-21384
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21385
14	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	LMG P-21387
15	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	LMG P-21388
16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21389
17	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16506
18	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16507
19	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSM 16603
20	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 16604
21	<i>Lactobacillus casei ssp. rhamnosus</i>	DSM 16605
22	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DSM 16606
23	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DSM 16607
24	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16590
25	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16591
26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16592
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16593
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 16594
29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 16595
30	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 16596
31	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSM 16597
32	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSM 16598
33	<i>Staphylococcus xylosus</i>	DSM 17102
34	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 17103
35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 17104
36	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 17843
37	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 17844
38	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 17845

39	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18295
40	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18296
41	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18297

42	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18298
43	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18299
44	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18300
45	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18301
46	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18302
47	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 18350
48	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 18351
49	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 18352
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	DSM 18353

Preferiblemente, el sustrato de cultivo analérgico incluye al menos una peptona y/o un hidrolizado proteico.

De forma ventajosa, la peptona y/o el hidrolizado proteico se seleccionan del grupo que incluye: peptona y/o hidrolizado proteico de origen vegetal y/o animal.

- 5 Preferiblemente, la peptona de origen vegetal se seleccionan entre el grupo que incluye: los tipos de arroz, de patata, de maíz, de castañas, de tapioca, de mandioca, de guisante, de habas y/o sus mezclas.

Preferiblemente, la peptona de origen animal se selecciona de las peptonas de carne.

Preferiblemente, el sustrato de cultivo analérgico incluye al menos una sustancia seleccionada de: glucosa y/o mono- o disacáridos derivados de la hidrólisis de polisacáridos complejos.

- 10 Preferiblemente, la glucosa se deriva de almidón de maíz, almidón de patata o de sacarosa de remolacha o sacarosa de caña.

Preferiblemente, el sustrato de cultivo analérgico incluye: glucosa, como se revela anteriormente, al menos una peptona de carne, como se revela anteriormente y al menos una peptona de origen vegetal, como se revela más adelante; preferiblemente peptona de arroz. Preferiblemente, dichas bacterias que están en contacto con dicho sustrato de cultivo analérgico se someten a una etapa de fermentación y a liofilización subsiguiente. Los cultivos bacterianos probióticos obtenidos son cultivos bacterianos probióticos analérgicos que contienen una cantidad de alérgenos por debajo del límite de detección: 3 ppm para el gluten, 7 ppm para la lactosa y 0,05 ppm para las lactoglobulinas.

- 15

- 20 Otra realización preferida se refiere a un cultivo bacteriano probiótico, en el que dicho cultivo bacteriano probiótico está seleccionado entre el grupo de cepas bacterianas probióticas como se revela anteriormente, se obtiene por el procedimiento revelado anteriormente. Otra realización preferida se refiere al uso de al menos un cultivo bacteriano probiótico analérgico para la preparación de un producto alimentario o una formulación farmacéutica deseada para personas particularmente sensibles a las sustancias alérgicas, preferiblemente un gluten y/o un tipo lácteo.

- 25 Otra realización preferida se refiere a un procedimiento para la preparación de un cultivo probiótico bacteriano, en el que dicho cultivo se selecciona del grupo de las cepas bacterianas probióticas mencionadas anteriormente.

Este procedimiento incluye al menos una etapa en la que las bacterias se producen con un sustrato de cultivo analérgico sometido previamente a un pre-tratamiento enzimático con el fin de eliminar trazas de alérgenos, si las hubiera, existiendo por contaminación cruzada o no intencionada.

- 30 Preferiblemente, el pretratamiento enzimático prevé el uso de al menos una enzima proteolítica y/o al menos una enzima de glucósido.

Preferiblemente, la enzima proteolítica se selecciona del grupo que incluye: proteasas y/o peptidasas.

Preferiblemente, las proteasas y/o peptidasas se selecciona entre el grupo que incluye: tripsina, quimiotripsina, pancreatina, pepsina, papaína y bromelaína. Preferiblemente, las proteasas y las peptidasas se seleccionan de pepsina y/o bromelaína. Preferiblemente, la enzima glucosidasa se selecciona entre el grupo que incluye: alfa-glucosidasa y beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa y beta-galactosidasa.

- 5 Preferiblemente, el pretratamiento enzimático incluye el uso de al menos una proteasa y al menos una glucosidasa. Preferiblemente, la proteasa se selecciona de alcalasa y bromelaína y la glucosidasa se selecciona de lactasa o beta-galactosidasa.

Preferiblemente, el pretratamiento enzimático incluye sucesivamente el uso de: una alcalasa, una lactasa y la bromelaína.

- 10 Preferiblemente, la alcalasa y dicho sustrato analérgico se tratan a una temperatura entre 45 y 55, durante un tiempo entre 15 y 60 minutos a un pH incluido entre 7 y 8; preferiblemente, $7,5 \pm 0,20$.

Preferiblemente, la lactasa y dicho sustrato de cultivo analérgico se tratan a una temperatura entre 30 y 40, durante un tiempo entre 2 y 6 horas a un pH incluido entre 6 y 7; preferiblemente, $6,5 \pm 0,20$.

- 15 Preferiblemente, la bromelaína y dicho sustrato de cultivo analérgico se tratan a una temperatura entre 30 y 40, durante un tiempo entre 1 y 6 horas a un pH incluido entre 5 y 6.

Preferiblemente, al final del pretratamiento enzimático se prevé una etapa en la que el pH se restaura a valores adecuados para la fermentación de las cepas individuales, una etapa de tratamiento con calor a una temperatura incluida entre 90 y 145 °C para desnaturalizar e inactivar las enzimas usadas en dicho pretratamiento enzimático y una etapa de fermentación de dichas cepas seleccionadas entre las descritas en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4. Preferiblemente, el sustrato de cultivo analérgico incluye al menos una peptona y/o un hidrolizado proteico.

- 20 Preferiblemente, la peptona y/o el hidrolizado proteico se seleccionan entre el grupo que incluye: peptona y/o hidrolizado proteico de origen vegetal y/o de origen animal. Preferiblemente la peptona de origen vegetal se selecciona entre el grupo que incluye: los tipos de arroz, de patata, de maíz, de castañas, de tapioca, de mandioca, de guisante, de habas y sus mezclas.

- 25 Preferiblemente, la peptona de origen animal se selecciona entre las peptonas de carne.

Preferiblemente, el sustrato de cultivo analérgico incluye al menos una sustancia seleccionada de: glucosa y/o mono o disacárido derivado de la hidrólisis de polisacáridos complejos.

Preferiblemente, la glucosa se deriva de almidón de maíz, almidón de patata o de sacarosa de remolacha o sacarosa de caña.

- 30 Preferiblemente, el sustrato de cultivo analérgico incluye: glucosa, como se revela anteriormente, al menos una peptona de carne, como se revela anteriormente y al menos una peptona de origen vegetal, como se revela más adelante; preferiblemente peptona de arroz.

Preferiblemente, dichas bacterias que entran en contacto con dicho sustrato de cultivo analérgico se someten a una etapa de fermentación y a continuación a etapas de liofilización.

- 35 De forma ventajosa, los cultivos bacterianos probióticos obtenidos son cultivos de bacterias probióticos analérgicos que contienen una cantidad de alérgenos por debajo del límite de detección: 3 ppm para el gluten, 7 ppm para la lactosa y 0,05 ppm para las beta-lactoglobulinas.

Otra realización preferida se refiere a un cultivo bacteriano probiótico analérgico, en el que dicho cultivo bacteriano se selecciona del grupo de las cepas bacterianas probióticas mencionadas anteriormente, que es obtenible por el procedimiento que incluye un tratamiento enzimático.

- 40 Otra realización preferida se refiere al uso de al menos un cultivo bacteriano probiótico analérgico, que es obtenible por el procedimiento que incluye un tratamiento enzimático, para la preparación de un producto alimentario o una formulación farmacéutica deseada para personas particularmente sensibles a la sustancias alérgicas; preferentemente, del tipo del gluten y/o del tipo lácteo.

	Nombre	Autoridad Depositaria Internacional	Número de Acceso	Fecha de Presentación	Depositante
1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	BCCM LMG	LMG P-18383	5.05.1998	ANIDRAL S.R.L.

2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	BCCM LMG	LMG 18384	P-	5.05.1998	ANIDRAL S.R.L.
3	<i>Lactobacillus pentosus</i>	BCCM LMG	LMG 21019	P-	16.10.2001	Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BCCM LMG	LMG 21020	P-	16.10.2001	Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)

	Nombre	Autoridad Depositaria Internacional	Número de Acceso	Fecha de Presentación	Depositante
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BCCM LMG	LMG 21021 P-	16.10.2001	Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BCCM LMG	LMG 21022 P-	16.10.2001	Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BCCM LMG	LMG 21023 P-	16.10.2001	Laboratorio Microbiologico Grana Provolone SRL Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
8	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>paracasei</i>	BCCM LMG	LMG 21380 P-	31.01.2002	ANIDRAL S.R.L.
9	<i>Lactobacillus</i> que pertenece al grupo <i>acidophilus</i>	BCCM LMG	LMG 21381 P-	31.01.2002	ANIDRAL S.R.L.
10	<i>Bifidobacterium longum</i>	BCCM LMG	LMG 21382 P-	31.01.2002	ANIDRAL S.R.L.
11	<i>Bifidobacterium breve</i>	BCCM LMG	LMG 21383 P-	31.01.2002	ANIDRAL S.R.L.
12	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BCCM LMG	LMG 21384 P-	31.01.2002	ANIDRAL S.R.L.
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BCCM LMG	LMG 21385 P-	31.01.2002	MOFIN S.R.L. Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
14	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	BCCM LMG	LMG 21387 P-	15.03.2002	MOFIN S.R.L. Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
15	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	BCCM LMG	LMG 21388 P-	31.01.2002	MOFIN S.R.L. Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	BCCM LMG	LMG 21389 P-	15.03.2002	MOFIN S.R.L. Via P. Custodi 12 I-28100 Novara (Italia)
17	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16506	18.06.2004	ANIDRAL S.R.L.
18	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16507	18.06.2004	ANIDRAL S.R.L.
19	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 16603	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.

20	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 16604	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
21	<i>Lactobacillus casei ssp. rhamnosus</i>	DSMZ	DSM 16605	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
22	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DSMZ	DSM 16606	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
23	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DSMZ	DSM 16607	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.

	Nombre	Autoridad Depositaria Internacional	Número de Acceso	Fecha de Presentación	Depositante
24	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16590	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
25	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16591	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16592	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16593	20.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 16594	21.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 16595	21.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
30	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 16596	21.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
31	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSMZ	DSM 16597	21.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
32	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSMZ	DSM 16598	21.07.2004	ANIDRAL S.R.L.
33	<i>Staphylococcus xylosus</i>	DSMZ	DSM 17102	01.02.2005	ANIDRAL S.R.L.
34	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 17103	01.02.2005	ANIDRAL S.R.L.
35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ	DSM 17104	01.02.2005	ANIDRAL S.R.L.
36	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 17843	21.12.2005	ANIDRAL S.R.L.
37	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 17844	21.12.2005	ANIDRAL S.R.L.
38	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 17845	21.12.2005	ANIDRAL S.R.L.
39	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18295	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.

40	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18296	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.
41	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18297	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.
42	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18298	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.
43	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18299	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.

	Nombre	Autoridad Depositaria Internacional	Número de Acceso	Fecha de Presentación	Depositante
44	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18300	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.
45	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18301	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.
46	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM	DSM 18302	24.05.2006	ANIDRAL S.R.L.
47	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 18350	15.06.2006	ANIDRAL S.R.L.
48	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 18351	15.06.2006	ANIDRAL S.R.L.
49	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM	DSM 18352	15.06.2006	ANIDRAL S.R.L.
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	DSMZ	DSM 18353	15.06.2006	ANIDRAL S.R.L.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de cultivos bacterianos probióticos analérgicos, **caracterizado porque** incluye al menos una etapa en la que las bacterias están en contacto con un medio de cultivo analérgico.
- 5 2. Un procedimiento para la preparación de un cultivo bacteriano probiótico analérgico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en dicha al menos una etapa, las bacterias de dicho cultivo, seleccionadas entre el grupo que incluye los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, se producen a través de un desarrollo en un sustrato analérgico.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las bacterias de dicho cultivo se seleccionan entre el grupo que comprende las siguientes especies bacterianas: *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei ssp. paracasei*, *L. casei ssp. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *B. longum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. adolescentis* y *B. pseudocatenulatum*, *L. lactis* y *L. Lactis ssp. lactis*, *S. thermophilus*.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones desde 1 hasta 3, en el que dichas bacterias se seleccionan entre el grupo que incluye las siguientes cepas bacterianas probióticas:

1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG P-18383
2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG P-18384
3	<i>Lactobacillus pentosus</i>	LMG P-21019
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21020
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21021
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21022
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21023
8	<i>Lactobacillus casei ssp. paracasei</i>	LMG P-21380
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LMG P-21381
10	<i>Bifidobacterium longum</i>	LMG P-21382
11	<i>Bifidobacterium breve</i>	LMG P-21383
12	<i>Bifidobacterium lactis</i>	LMG P-21384
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21385
14	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	LMG P-21387
15	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	LMG P-21388
16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMG P-21389
17	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16506
18	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16507
19	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSM 16603
20	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 16604
21	<i>Lactobacillus casei ssp. rhamnosus</i>	DSM 16605
22	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DSM 16606
23	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DSM 16607
24	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16590
25	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16591

(continuación)

26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16592
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 16593
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 16594
29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 16595
30	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 16596
31	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSM 16597
32	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSM 16598
33	<i>Staphylococcus xylosus</i>	DSM 17102
34	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 17103
35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 17104
36	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 17843
37	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 17844
38	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 17845
39	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18295
40	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18296
41	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18297
42	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18298
43	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18299
44	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18300
45	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18301
46	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 18302
47	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 18350
48	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 18351
49	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 18352
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	DSM 18353

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que el medio de cultivo analérgico incluye al menos una peptona y/o un hidrolizado proteico.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la peptona y/o el hidrolizado proteico se seleccionan entre el grupo que incluye peptona y/o hidrolizado proteico de origen vegetal y/o animal; preferiblemente dicha peptona de origen vegetal se selecciona entre el grupo que incluye: arroz, patata, maíz, castañas, tapioca, mandioca, guisante, habas, legumbres y/o sus mezclas; y dicha peptona de origen animal se selecciona entre las peptonas de carne.

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** ello comprende al menos una etapa en la que las bacterias se producen con un sustrato de cultivo analérgico sometido previamente a un pretratamiento enzimático con el fin de eliminar trazas de alérgenos, si hubiera alguna, que existan por contaminación cruzada o no intencionada.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el pretratamiento enzimático prevé el uso de al menos una enzima proteolítica y/o al menos una enzima glucosidasa, preferiblemente dicha enzima proteolítica se selecciona entre el grupo que incluye: proteasas y/o peptidasas; preferiblemente dichas proteasas y/o peptidasas se

seleccionan del grupo que incluye tripsina, quimiotripsina, pancreatina, pepsina, papaína y bromelaína.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la enzima glucosidasa se selecciona entre el grupo que incluye: alfa-glucosidasa y beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa y beta-galactosidasa.

5 10. El procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el pretratamiento enzimático incluye el uso de al menos una proteasa y al menos una glucosidasa.

11. El procedimiento de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 7 a 10, en el que en el pretratamiento enzimático la proteasa se selecciona entre alcalasa y bromelaína y la glucosidasa se selecciona entre lactasa o beta-galactosidasa.

10 12. El uso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 7 a 11, en el que al final del pre-tratamiento enzimático, se prevén una etapa en la que se restaura el pH a valores adecuados para la fermentación de las cepas individuales, una etapa de tratamiento con calor a una temperatura incluida entre 90 °C y 145 °C para desnaturalizar e inactivar las enzimas usadas en dicho pre-tratamiento enzimático y una etapa de fermentación de dichas cepas seleccionadas entre las descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15 13. Un cultivo bacteriano probiótico analérgico en el pre-tratamiento enzimático obtenible por el procedimiento de acuerdo con de las reivindicaciones 1 a 12, que contiene:

i) una cantidad menor de 3 ppm de gluten, según se determina por el kit ELISA RIDASCREEN® Gliadin,

ii) una cantidad menor de 7 ppm de lactosa, según se determina por análisis con kit quimioenzimático y detección de ultravioleta-visible para la lactosa del tipo kit de "Lactosa/D-glucosa",

20 iii) una cantidad de menos de 0,05 ppm de β -lactoglobulina según se determina por el kit específico para la β -lactoglobulina del tipo kit de cuantificación ELISA de β -lactoglobulinas bovina.

14. Uso de al menos un cultivo bacteriano probiótico analérgico de acuerdo con la reivindicación 13 para la preparación de un producto alimentario o de una formulación farmacéutica deseada para personas particularmente sensibles a sustancias alérgicas del tipo de gluten o del tipo lácteo.