

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 230**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/IB2014/001416**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15015280**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14761689 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3027765**

54 Título: **Producción de materias primas no tóxicas y productos terminados sometidos a prueba por medio de un método basado en bacterias probióticas innovador para determinar la toxicidad hacia las bacterias probióticas**

30 Prioridad:

30.07.2013 IT MI20131280

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

05.03.2020

73 Titular/es:

**PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)
Via Mattei, 3
28100 Novara (NO), IT**

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 746 230 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

- 5 Producción de materias primas no tóxicas y productos terminados sometidos a prueba por medio de un método basado en bacterias probióticas innovador para determinar la toxicidad hacia las bacterias probióticas
- 10 La presente memoria descriptiva divulga un método para la producción de materias primas y de productos terminados destinados a las industrias alimentaria y farmacéutica y carentes de toxicidad, que es detectable por medio de un método innovador – basado en bacterias probióticas – para analizar la toxicidad hacia las bacterias probióticas.
- 15 Los documentos CN 102304482A y CN 102268471A divulgan una cepa de *Bifidobacterium longum* LJM002, que es ultrasensible a acefato y es una cepa de trabajo para detectar el residuo de esta sustancia en alimentos y un método de microorganismos para detectar el residuo de acefato en alimentos.
- 20 Todos los materiales o las sustancias que están en la base de la fabricación y producción de otros productos a través del uso de procedimientos de procesamiento e industriales apropiados que permiten que se obtenga el producto final deseado se consideran materias primas.
- 25 Las materias primas usadas en la producción de productos o complementos alimenticios o dispositivos médicos o productos farmacéuticos incluyen, a modo de ejemplo, aromatizantes, extractos, coformulantes de origen orgánico y/o inorgánico, aditivos tecnológicos, vitaminas, proteínas, aminoácidos, peptonas, polímeros naturales y/o sintéticos y todavía más.
- 30 A modo de un ejemplo ilustrativo y por tanto no exhaustivo, pueden prepararse aromatizantes y/o extractos a partir de plantas y/o su fruto.
- 35 Se conoce bien que las plantas que tienen frutos y el fruto en sí mismo se tratan actualmente, por ejemplo, con sustancias químicas para protegerlos frente a los ataques de microorganismos u hongos o insectos de manera que permiten que el fruto crezca hasta que alcanza la madurez fisiológica y luego se recoge y se consumen.
- 40 De manera similar, se conocen bien los siguientes tratamientos citados, una parte de las sustancias químicas usadas permanece adsorbida sobre la superficie exterior del fruto, denominada comúnmente piel o cáscara. Las sustancias químicas que se adsorben también persisten en los sucesivos lavados del fruto con agua.
- 45 La piel (exocarpio) es la capa externa protectora de un fruto (epidermis, a su vez compuesta de cutícula y tejido esclerenquimático) o un vegetal que puede desprenderse. La capa externa protectora también se denomina de manera indebida cáscara.
- 50 Además, no puede excluirse que una parte de las sustancias químicas adsorbidas sobre la superficie exterior del fruto puede penetrar en el fruto en sí mismo (en la pulpa) como resultado de la absorción de dichas sustancias químicas desde el exterior hacia el interior del fruto.
- 55 Actualmente, se usa parte del fruto recogido para producir extractos y/o aromatizantes vegetales naturales (materias primas) que tienen aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y nutricional.
- 60 Habitualmente, los extractos y/o aromatizantes vegetales naturales se obtienen mediante extracción mecánica y/o química a partir del fruto completo (piel y pulpa) o a partir de la piel y/o pulpa tratadas por separado, por medio del equipo y/o de las técnicas conocidas por el experto en la técnica.
- 65 Por ejemplo, en el caso de aromatizantes y/o extractos y/o compuestos orgánicos obtenidos mediante extracción con disolventes, puede producirse que incluso llevando a cabo varias etapas de lavado con agua y/o disolventes químicos no se logre eliminar completamente todo el disolvente usado; por tanto, incluso una presencia mínima puede provocar toxicidad a las bacterias probióticas.
- Por tanto, es deseable ser capaces de tener un método que tenga alta sensibilidad y capaz de identificar hasta cuando existe una toxicidad residual en una sustancia o una materia prima dada para programar los procedimientos de purificación o lavado o precipitación que van a usarse para presentar la materia prima libre de toxicidad a las bacterias probióticas.
- Lo mismo se aplica con referencia a un extracto de proteínas o con referencia a la preparación de aminoácidos. En este caso también se usan reactivos y/o disolventes químicos que pueden quedar como residuo y provocar toxicidad a las bacterias probióticas.
- El mismo problema también puede presentarse con referencia a materias primas inorgánicas, tales como, por ejemplo dióxido de silicio, usado ampliamente para formular productos terminados.

5 Con referencia tanto a extractos y/o aromatizantes vegetales naturales obtenidos mediante extracción mecánica y/o química y con referencia a las otras materias primas mencionadas anteriormente, preparados por medio de procedimientos de síntesis y/o extracción, no puede ignorarse el hecho de que pueden permanecer, dentro de la materia prima, cantidades mínimas de sustancias o compuestos dotados de una naturaleza "tóxica" que confiere una determinada toxicidad intrínseca a la materia prima por sí misma.

10 Por tanto, con referencia a extractos vegetales naturales y/o con referencia a las otras materias primas mencionadas anteriormente, no puede excluirse la presencia de sustancias tóxicas dentro de ellos en una cantidad variable que puede depender del tipo de cultivo adoptado para el fruto y/o las condiciones de operación adoptadas para llevar a cabo la extracción mecánica y/o química.

En cualquier caso, cualquier sustancia tóxica presente en los extractos y/o aromatizantes vegetales naturales y/o las materias primas en general puede dar lugar a dos tipos de problemas: uno indirecto y uno directo.

15 El primero, o problema indirecto, se refiere a la influencia que la ingestión de dichas sustancias tóxicas puede tener en la alteración de la microflora probiótica intestinal y, por tanto, también en la fisiología del aparato digestivo, hasta el punto de influir en la absorción de vitaminas, péptidos bioactivos y metabolitos, y de manera similar permite la producción de aminas biogénicas dañinas, que se conoce que alteran la permeabilidad intestinal y crean una serie completa de problemas de salud, incluso llegando a la producción de nitrosamina, unas sustancias carcinogénicas bien conocidas, produciéndose dichas aminas biogénicas por cepas que se han beneficiado de esta alteración.

20 A este respecto, debe destacarse que, si la flora probiótica bacteriana se altera como resultado de un aumento en la colonización de bacterias patogénicas coliformes, tales como, por ejemplo *E. coli*, dotadas con propiedades de descarboxilación capaces de transformar un aminoácido en una amina eliminando el grupo carboxilo, se producen cantidades anómalas de aminas biogénicas dañinas.

Además, un desequilibrio en la microflora intestinal parece ser capaz de contribuir a la aparición de diversas patologías: diabetes y enfermedades autoinmunitarias o, como se ha hipotetizado, desempeña un papel en las respuestas inmunitarias locales y sistémicas desequilibradas a determinados alérgenos alimenticios.

30 El segundo, o problema directo, implica los efectos que dichas sustancias tóxicas, todavía capaces de destruir las células de bacterias probióticas, pueden tener en individuos de infancia o en la fase de crecimiento debido a una acción tóxica inmediata y/o acumulada, no sólo contra células bacterianas sino también contra células eucariotas, particularmente sensibles en las fases de diferenciación y crecimiento.

35 Por tanto, permanece una necesidad de ser capaces de producir materias primas y productos terminados de una manera sin duda no tóxica y de tener un método para determinar la toxicidad de un extracto y/o un aromatizante y/o una materia prima en general que es seguro, simple y práctico para su uso, económico y que puede repetirse.

40 En particular, permanece una necesidad de tener un método para determinar la toxicidad hacia las bacterias probióticas de los componentes individuales que constituyen un producto terminado tal como un alimento, un complemento, o un dispositivo médico o un fármaco.

45 El solicitante ha encontrado una manera innovadora de producir materias primas y productos terminados no tóxicos, sometiendo los extractos y/o aromatizantes y/o las materias primas en general a una nueva prueba de toxicidad para determinar su toxicidad hacia las bacterias probióticas.

50 El contenido de la presente invención es un método para producir materias primas y productos terminados no tóxicos gracias a la posibilidad, proporcionada por el solicitante, de ser capaces de determinar la toxicidad hacia las bacterias probióticas presentes en dichas materias primas y productos terminados por medio de un método innovador que de manera similar forma el contenido de la presente invención.

55 El solicitante ha encontrado que la toxicidad determinada con el método de la presente invención depende no sólo de la materia prima usada *per se*, sino también, y sobre todo, del tipo de extracción mecánica y/o química usada para producir dicha materia prima. De hecho, la extracción química de una materia prima puede implicar el uso de disolventes químicos, y algunas etapas de lavado o precipitación que pueden dejar toxicidad residual en la propia materia prima.

60 El método comprende una etapa en la que la cepa bacteriana probiótica (marcador de toxicidad) se pone en contacto con una materia prima que va a someterse a prueba usando una cantidad de materia prima igual a la que se usa normalmente en la formulación.

65 En términos prácticos, se prepara una primera muestra que comprende la cepa bacteriana probiótica (marcador de toxicidad), el sustrato de cultivo óptimo para dicha cepa bacteriana probiótica y la materia prima que va a someterse a prueba. Luego se prepara una segunda muestra (referencia interna) que comprende la misma cepa bacteriana probiótica usada en dicha primera muestra (marcador de toxicidad) y sólo el sustrato de cultivo óptimo (sin la materia

prima que va a someterse a prueba).

La determinación tiene lugar por medio de un recuento bacteriano en placa de dicha primera muestra y dicha segunda muestra, tal como se describe a continuación.

5 La razón entre el recuento bacteriano (número de células contadas sobre la placa) de dicha primera muestra y el recuento bacteriano (número de células sobre la placa) de dicha segunda muestra proporciona un número menor de 1 que, si se expresa como porcentaje, proporciona un recuento de las bacterias que sobrevivieron en contacto con la materia prima y, por tanto, también expresa el % de mortalidad inducida por dicha materia prima en las cepas bacterianas probióticas usadas como marcador.

Una primera realización se refiere a la determinación de la toxicidad de una materia prima, tal como, por ejemplo, un extracto y/o aromatizante vegetal natural y/o una materia prima en general.

15 En este caso, la prueba de toxicidad hacia las bacterias probióticas implica la preparación de dos pruebas en el laboratorio, tal como se describió anteriormente.

En términos prácticos, se prepara una primera muestra que comprende la cepa bacteriana probiótica (marcador de toxicidad), el sustrato de cultivo óptimo para dicha cepa bacteriana probiótica y la materia prima que va a someterse a prueba.

20 Luego se prepara una segunda muestra (referencia interna) que comprende la misma cepa bacteriana probiótica usada en dicha primera muestra (marcador de toxicidad) y sólo el sustrato de cultivo óptimo (sin la materia prima que va a someterse a prueba).

25 La determinación tiene lugar por medio de un recuento bacteriano en placa de dicha primera muestra y dicha segunda muestra, tal como se describe a continuación.

Preferiblemente, se realizan dicha prueba primera y segunda en paralelo en las mismas condiciones de operación.

30 La razón entre el recuento bacteriano (número de células contadas sobre la placa) de dicha primera muestra y el recuento bacteriano (número de células sobre la placa) de dicha segunda muestra proporciona un número menor que 1 que, si se expresa como porcentaje, proporciona un recuento de las bacterias que sobrevivieron en contacto con la materia prima y, por tanto, también expresa el % de mortalidad inducida por dicha materia prima en las cepas bacterianas probióticas usadas como marcador.

35 La diferencia entre el recuento bacteriano realizado en dicha primera prueba y el recuento bacteriano realizado en dicha segunda prueba proporciona un porcentaje de mortalidad bacteriana que proporciona una indicación de la toxicidad hacia las bacterias probióticas asociada con dicha materia prima.

40 El solicitante, por medio de un ejemplo no exhaustivo, sometió a prueba varios aromatizantes y extractos presentes en el mercado, tales como, por ejemplo, aromatizantes de limón y arándano, que se usan también en la preparación de productos terminados. El objetivo de estas pruebas era verificar si dichos alimentos o materias primas (aromatizantes de limón y arándano) poseían una toxicidad intrínseca hacia las bacterias probióticas.

45 Por esta razón, dichas materias primas (aromatizantes de limón y arándano) se pusieron en contacto con cepas dadas de bacterias lácticas o bifidobacterias probióticas en condiciones de operación particulares.

50 Las cepas bacterianas probióticas usadas como marcador de toxicidad en el método de la presente invención pertenecen a las especies seleccionadas de los grupos que comprenden lactobacilos y bifidobacterias. La presente invención contempla el uso de una cepa bacteriana entre las enumeradas en la tabla 1.

Tabla 1

n.º	Nombre	Código Comercial	Institución depositaria	Número de depósito	Fecha de depósito	Depositante
1	<i>Lactobacillus casei</i>	LF1i	CNCM I.P.	I-785	21.07.1988	Anidral Srl
2	<i>Lactobacillus gasserii</i>	LF2i	CNCM I.P.	I-786	21.07.1988	Anidral Srl
3	<i>Lactobacillus crispatus</i>	LF3i	CNCM I.P.	I-787	21.07.1988	Anidral Srl
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF4i	CNCM I.P.	I-788	21.07.1988	Anidral Srl
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF5	CNCM I.P.	I-789	21.07.1988	Anidral Srl
6	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudoplanatarum</i>	LFH i	CNCM I.P.	I-790	21.07.1988	Anidral Srl
7	<i>Streptococcus thermophilus</i> B39		BCCM LMG	LMG P-18383	5.05.1998	Anidral Srl
8	<i>Streptococcus thermophilus</i> T003		BCCM LMG	LMG P-18384	5.05.1998	Anidral Srl
9	<i>Lactobacillus pentosus</i> 9 / 1 ei		BCCM LMG	LMG P-21019	16.10.2001	Mofin Srl
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776 / 1 bi	LP 02	BCCM LMG	LMG P-21020	16.10.2001	Mofin Srl
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> 476LL 20 bi	LP 01	BCCM LMG	LMG P-21021	16.10.2001	Mofin Srl
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> PR ci		BCCM LMG	LMG P-21022	16.10.2001	Mofin Srl
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776 / 2 hi		BCCM LMG	LMG P-21023	16.10.2001	Mofin Srl
14	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>paracasei</i> 181A / 3 aiai	LPC00	BCCM LMG	LMG P-21380	31.01.2002	Anidral Srl
15	<i>Lactobacillus</i> que pertenece al grupo <i>acidophilus</i> 192A / 1 aiai	LA 02	BCCM LMG	LMG P-21381	31.01.2002	Anidral Srl
16	<i>Bifidobacterium longum</i> 175A / 1 aiai		BCCM LMG	LMG P-21382	31.01.2002	Anidral Srl
17	<i>Bifidobacterium breve</i> 195A / 1 aiai		BCCM LMG	LMG P-21383	31.01.2002	Anidral Srl
18	<i>Bifidobacterium lactis</i> 32A / 3 aiai	BS 01	BCCM LMG	LMG P-21384	31.01.2002	Anidral Srl
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/2 gi	COAKTIV	BCCM LMG	LMG P-21385	31.01.2002	Mofin Srl
20	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci		BCCM LMG	LMG P-21388	31.01.2002	Mofin Srl
21	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 hi		BCCM LMG	LMG P-21387	15.03.2002	Mofin Srl
22	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci		BCCM LMG	LMG P-21388	31.01.2002	Mofin Srl
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/4 li		BCCM LMG	LMG P-21389	15.03.2002	Mofin Srl

24	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA08	BCCM LMG	LMG P-26144	03.11.2010	Probiotal SpA
25	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	LPC10	BCCM LMG	LMG P-26143	03.11.2010	Probiotal SpA
26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	GB1	DSMZ	DSM 16506	18.06.2004	Anidral Srl
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	GB5	DSMZ	DSM 16507	18.06.2004	Anidral Srl
28	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y02	DSMZ	DSM 16590	20.07.2004	Anidral Srl
29	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y03	DSMZ	DSM 16591	20.07.2004	Anidral Srl
30	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y04	DSMZ	DSM 16592	20.07.2004	Anidral Srl
31	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y05	DSMZ	DSM 16593	20.07.2004	Anidral Srl
32 = 56	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	BA 03	DSMZ	DSM 16594	21.07.2004	Anidral Srl
33	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	BA 04	DSMZ	DSM 16595	21.07.2004	Anidral Srl
34	<i>Bifidobacterium breve</i>	BR 04	DSMZ	DSM 16596	21.07.2004	Anidral Srl
35	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	BP 01	DSMZ	DSM 16597	21.07.2004	Anidral Srl
36	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	BP 02	DSMZ	DSM 16598	21.07.2004	Anidral Srl
37	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL 03	DSMZ	DSM 16603	20.07.2004	Anidral Srl
38	<i>Bifidobacterium breve</i>	BR 03	DSMZ	DSM 16604	20.07.2004	Anidral Srl
39	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	LR 04	DSMZ	DSM 16605	20.07.2004	Anidral Srl
40	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	LDB 01	DSMZ	DSM 16606	20.07.2004	Anidral Srl
41	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	LDB 02	DSMZ	DSM 16607	20.07.2004	Anidral Srl
42	<i>Staphylococcus xylosum</i>	SX 01	DSMZ	DSM 17102	01.02.2005	Anidral Srl
43 = 57	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	BA 02	DSMZ	DSM 17103	01.02.2005	Anidral Srl
44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP 07	DSMZ	DSM 17104	01.02.2005	Anidral Srl
45	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO8	DSMZ	DSM 17843	21.12.2005	Anidral Srl
46	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO9	DSMZ	DSM 17844	21.12.2005	Anidral Srl
47	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO100	DSMZ	DSM 17845	21.12.2005	Anidral Srl

48	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF06	DSMZ	DSM 18295	24.05.2006	Anidral Srl
49	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF07	DSMZ	DSM 18296	24.05.2006	Anidral Srl
50	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF08	DSMZ	DSM 18297	24.05.2006	Anidral Srl
51	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF09	DSMZ	DSM 18298	24.05.2006	Anidral Srl
52	<i>Lactobacillus gasserii</i>	LGS01	DSMZ	DSM 18299	24.05.2006	Anidral Srl
53	<i>Lactobacillus gasserii</i>	LGS02	DSMZ	DSM 18300	24.05.2006	Anidral Srl
54	<i>Lactobacillus gasserii</i>	LGS03	DSMZ	DSM 18301	24.05.2006	Anidral Srl
55	<i>Lactobacillus gasserii</i>	LGS04	DSMZ	DSM 18302	24.05.2006	Anidral Srl
56 = 32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-3 <i>Bifidobacterium catenulatum</i> <i>sp./pseudocatenulatum</i> EI-31, ID 09-255	BA 03	DSMZ	DSM 18350	15.06.2006	Anidral Srl
57 = 43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-15	BA 02	DSMZ	DSM 18351	15.06.2006	Anidral Srl
58	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-18 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> EI-18, ID 09-256	BA 05	DSMZ	DSM 18352	15.06.2006	Anidral Srl
59	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> EI-20	BC 01	DSMZ	DSM 18353	15.06.2006	Anidral Srl
60	<i>Streptococcus thermophilus</i> FRai	MO1	DSMZ	DSM 18613	13.09.2006	Mofin Srl
61	<i>Streptococcus thermophilus</i> LB2bi	MO2	DSMZ	DSM 18614	13.09.2006	Mofin Srl
62	<i>Streptococcus thermophilus</i> LRci	MO3	DSMZ	DSM 18615	13.09.2006	Mofin Srl
63	<i>Streptococcus thermophilus</i> FP4	MO4	DSMZ	DSM 18616	13.09.2006	Mofin Srl
64	<i>Streptococcus thermophilus</i> ZZ5F8	MO5	DSMZ	DSM 18617	13.09.2006	Mofin Srl
65	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO4	MO6	DSMZ	DSM 18618	13.09.2006	Mofin Srl
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> S1ci	MO7	DSMZ	DSM 18619	13.09.2006	Mofin Srl
67	<i>Streptococcus thermophilus</i> 641bi	MO8	DSMZ	DSM 18620	13.09.2006	Mofin Srl
68	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A / 1ai	MO9	DSMZ	DSM 18621	13.09.2006	Mofin Srl
69	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A / 2ai	MO10	DSMZ	DSM 18622	13.09.2006	Mofin Srl
70	<i>Streptococcus thermophilus</i> IDC11	MO11	DSMZ	DSM 18623	13.09.2006	Mofin Srl

71	<i>Streptococcus thermophilus</i> ML3di	MO14	DSMZ	DSM 18624	13.09.2006	Mofin Srl
72	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO3	MO15	DSMZ	DSM 18625	13.09.2006	Mofin Srl
73	<i>Streptococcus thermophilus</i> G62	GG1	DSMZ	DSM 19057	21.02.2007	Mofin Srl
74	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1192	GG2	DSMZ	DSM 19058	21.02.2007	Mofin Srl
75	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB18	GG3 MO2	DSMZ	DSM 19059	21.02.2007	Mofin Srl
76	<i>Streptococcus thermophilus</i> CCR21	GG4	DSMZ	DSM 19060	21.02.2007	Mofin Srl
77	<i>Streptococcus thermophilus</i> G92	GG5	DSMZ	DSM 19061	21.02.2007	Mofin Srl
78	<i>Streptococcus thermophilus</i> G69	GG6	DSMZ	DSM 19062	21.02.2007	Mofin Srl
79	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 10	DSMZ	DSM 19063	21.02.2007	Anidral Srl
80	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 11	DSMZ	DSM 19064	21.02.2007	Anidral Srl
81	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 12	DSMZ	DSM 19065	21.02.2007	Anidral Srl
82	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 13	DSMZ	DSM 19066	21.02.2007	Anidral Srl
83	<i>Weissella</i> ssp. WSP 01	EX	DSMZ	DSM 19067	21.02.2007	Anidral Srl
84	<i>Weissella</i> ssp. WSP 02	EX	DSMZ	DSM 19068	21.02.2007	Anidral Srl
85	<i>Lactobacillus</i> ssp. WSP 03	EX	DSMZ	DSM 19069	21.02.2007	Anidral Srl
86	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 09	OY	DSMZ	DSM 19070	21.02.2007	Anidral Srl
87	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 10	OY	DSMZ	DSM 19071	21.02.2007	Anidral Srl
88	<i>Lactococcus lactis</i>	NS 01	DSMZ	DSM 19072	21.02.2007	Anidral Srl
89	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF 10	DSMZ	DSM 19187	20.03.2007	Anidral Srl
90	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF 11	DSMZ	DSM 19188	20.03.2007	Anidral Srl
91	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	LR05	DSMZ	DSM 19739	27.09.2007	Anidral Srl
92	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB01	DSMZ	DSM 19818	30.10.2007	Anidral Srl
93	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 01	Lb	DSMZ	DSM 19948	28.11.2007	Anidral Srl
94	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 02	Lb	DSMZ	DSM 19949	28.11.2007	Anidral Srl
95	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 03	Lb	DSMZ	DSM 19950	28.11.2007	Anidral Srl
96	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 04	Lb	DSMZ	DSM 19951	28.11.2007	Anidral Srl

97	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 05	Lb	DSMZ	DSM 19952	28.11.2007	Anidral Srl
98	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	B660	DSMZ	DSM 21444	13.05.2008	Probiotical SpA
99	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA02	DSMZ	DSM 21717	06.08.2008	Probiotical SpA
100	<i>Lactobacillus paracasei</i>	LPC 08	DSMZ	DSM 21718	06.08.2008	Probiotical SpA
101	<i>Lactobacillus pentosus</i>	LPS 01	DSMZ	DSM 21980	14.11.2008	Probiotical SpA
102	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LR 06	DSMZ	DSM 21981	14.11.2008	Probiotical SpA
103	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	DSMZ 20074	DSMZ	DSM 22106	10.12.2008	Probiotical SpA
104	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP1	DSMZ	DSM 22107	10.12.2008	Probiotical SpA
105	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS01	DSMZ	DSM 22775	23.07.2009	Probiotical SpA
106	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS03	DSMZ	DSM 22776	23.07.2009	Probiotical SpA
107	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB01	DSMZ	DSM 22892	28.08.2009	Probiotical SpA
108	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		DSMZ	DSM 22893	28.08.2009	Probiotical SpA
109	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB03	DSMZ	DSM 22894	28.08.2009	Probiotical SpA
110	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BS05	DSMZ	DSM 23032	13.10.2009	Probiotical SpA
111	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA 06	DSMZ	DSM 23033	13.10.2009	Probiotical SpA
112	<i>Lactobacillus brevis</i>	LBR01	DSMZ	DSM 23034	13.10.2009	Probiotical SpA
113	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	BS06	DSMZ	DSM 23224	12.01.2010	Probiotical SpA
114	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL04	DSMZ	DSM 23233	12.01.2010	Probiotical SpA
115	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL05	DSMZ	DSM 23234	12.01.2010	Probiotical SpA
116	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	MB 109	DSMZ	DSM 23731	29.06.2010	Probiotical SpA
117	<i>Bifidobacterium breve</i>	MB 113	DSMZ	DSM 23732	29.06.2010	Probiotical SpA
118	<i>Bifidobacterium lactis</i>	MB 2409	DSMZ	DSM 23733	29.06.2010	Probiotical SpA
119	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE01	DSMZ	DSM 23877	05.08.2010	Probiotical SpA
120	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE02	DSMZ	DSM 23878	05.08.2010	Probiotical SpA
121	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE03	DSMZ	DSM 23879	05.08.2010	Probiotical SpA
122	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE04	DSMZ	DSM 23880	05.08.2010	Probiotical SpA
123	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	LPC09	DSMZ	DSM 24243	23.11.2010	Probiotical SpA

124	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA 07	DSMZ	DSM 24303	23.11.2010	Probiotical SpA
125	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB04	DSMZ	DSM 24437	04.01.2011	Probiotical SpA
126	<i>Lactobacillus crispatus</i>	CRL 1251	DSMZ	DSM 24438	04.01.2011	Probiotical SpA
127	<i>Lactobacillus crispatus</i>	CRL 1266	DSMZ	DSM 24439	04.01.2011	Probiotical SpA
128	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CRL 1289	DSMZ	DSM 24440	04.01.2011	Probiotical SpA
129	<i>Lactobacillus salivarius</i>	CRL 1328	DSMZ	DSM 24441	04.01.2011	Probiotical SpA
130	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CRL 1259	DSMZ	DSM 24512	25.01.2011	Probiotical SpA
131	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CRL 1294	DSMZ	DSM 24513	25.01.2011	Probiotical SpA
132	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS04	DSMZ	DSM 24618	02.03.2011	Probiotical SpA
133	<i>Lactobacillus crispatus</i>	LCR01	DSMZ	DSM 24619	02.03.2011	Probiotical SpA
134	<i>Lactobacillus crispatus</i>	LCR02	DSMZ	DSM 24620	02.03.2011	Probiotical SpA
135	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA09	DSMZ	DSM 24621	02.03.2011	Probiotical SpA
136	<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGS05	DSMZ	DSM 24622	02.03.2011	Probiotical SpA
137	<i>Lactobacillus paracasei</i>	LPC11	DSMZ	DSM 24623	02.03.2011	Probiotical SpA
138	<i>Bifidobacterium infantis</i>	BI 02	DSMZ	DSM 24687	29.03.2011	Probiotical SpA
139	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB 06	DSMZ	DSM 24688	29.03.2011	Probiotical SpA
140	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL 06	DSMZ	DSM 24689	29.03.2011	Probiotical SpA
141	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BS 07	DSMZ	DSM 24690	29.03.2011	Probiotical SpA
142	<i>Bifidobacterium longum</i>	PCB133	DSMZ	DSM 24691	29.03.2011	Probiotical SpA
143	<i>Bifidobacterium breve</i>	B632	DSMZ	DSM 24706	07.04.2011	Probiotical SpA
144	<i>Bifidobacterium breve</i>	B2274	DSMZ	DSM 24707	07.04.2011	Probiotical SpA
145	<i>Bifidobacterium breve</i>	B7840	DSMZ	DSM 24708	07.04.2011	Probiotical SpA
146	<i>Bifidobacterium longum</i>	B1975	DSMZ	DSM 24709	07.04.2011	Probiotical SpA
147	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DLV1	DSMZ	DSM 25138	02.09.2011	Probiotical SpA
148	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE05	DSMZ	DSM 25139	02.09.2011	Probiotical SpA
149	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE06	DSMZ	DSM 25140	02.09.2011	Probiotical SpA
150	<i>Lactobacillus reuteri</i>	RC 14	DSMZ	DSM 25141	02.09.2011	Probiotical SpA
151	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST 10	DSMZ	DSM 25246	19.09.2011	Probiotical SpA
152	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST 11	DSMZ	DSM 25247	19.09.2011	Probiotical SpA

153	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST 12	DSMZ	DSM 25282	20.10.2011	Probiological SpA
154	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DLV8	DSMZ	DSM 25545	12.01.2012	Probiological SpA
155	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 07	DSMZ	DSM 25669	16.02.2012	Probiological SpA
156	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 08	DSMZ	DSM 25670	16.02.2012	Probiological SpA
157	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 09	DSMZ	DSM 25671	16.02.2012	Probiological SpA
158	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 10	DSMZ	DSM 25672	16.02.2012	Probiological SpA
159	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 11	DSMZ	DSM 25673	16.02.2012	Probiological SpA
160	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 12	DSMZ	DSM 25674	16.02.2012	Probiological SpA
161	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL13	DSMZ	DSM 25675	16.02.2012	Probiological SpA
162	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 14	DSMZ	DSM 25676	16.02.2012	Probiological SpA
163	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 15	DSMZ	DSM 25677	16.02.2012	Probiological SpA
164	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 16	DSMZ	DSM 25678	16.02.2012	Probiological SpA
165	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 17	DSMZ	DSM 25679	16.02.2012	Probiological SpA
166	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	DLLJO 01	DSMZ	DSM 25680	16.02.2012	Probiological SpA
167	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DLLR 07	DSMZ	DSM 25681	16.02.2012	Probiological SpA
168	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DLLR 08	DSMZ	DSM 25682	16.02.2012	Probiological SpA
169	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DLLRE 07	DSMZ	DSM 25683	16.02.2012	Probiological SpA
170	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DLLRE 08	DSMZ	DSM 25684	16.02.2012	Probiological SpA
171	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DLLRE 09	DSMZ	DSM 25685	16.02.2012	Probiological SpA
172	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 18	DSMZ	DSM 25708	24.02.2012	Probiological SpA
173	<i>Bifidobacterium infantis</i>	BI 03	DSMZ	DSM 25709	24.02.2012	Probiological SpA
174	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP 09	DSMZ	DSM 25710	24.02.2012	Probiological SpA
175	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 19	DSMZ	DSM 25717	01.03.2012	Probiological SpA
176	<i>Bifidobacterium longum</i>	DLBL 20	DSMZ	DSM 25718	01.03.2012	Probiological SpA
177	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS 05	DSMZ	DSM 26036	06.06.2012	Probiological SpA
178	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS 06	DSMZ	DSM 26037	06.06.2012	Probiological SpA
179	<i>Lactobacillus pentosus</i>	LPS 02	DSMZ	DSM 26038	06.06.2012	Probiological SpA
180	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	BPS 01	DSMZ	DSM 26456	02.10.2012	Probiological SpA

181	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF15	DSMZ	DSM 26955	01.03.2013	Probiological SpA
182	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF16	DSMZ	DSM 26956	01.03.2013	Probiological SpA
183	<i>Lactobacillus casei</i>	LC03	DSMZ	DSM 27537	24.07.2013	Probiological SpA
184	<i>Lactobacillus crispatus</i>	LCR03	DSMZ	DSM 27538	24.07.2013	Probiological SpA
185	<i>Lactobacillus jensenii</i>	LJE01	DSMZ	DSM 27539	24.07.2013	Probiological SpA

Las pruebas realizadas en dichos alimentos o materias primas (aromatizantes de limón y arándano) mostraron una toxicidad aguda hacia las cepas bacterianas probióticas usadas como marcadores de toxicidad. En términos prácticos, se sometieron a prueba dos extractos de limón (materia prima) y dos extractos de arándano (materia prima) de diferentes proveedores. Fue posible verificar que un primer extracto de limón y uno segundo de arándano provocaron una toxicidad aguda, el 57% y el 58% de mortalidad, respectivamente, hacia las cepas bacterianas probióticas usadas que tenían una carga teórica inicial de 6×10^9 UFC/g. Las pruebas se realizaron usando la cepa bacteriana probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA02 LMG P-21381 depositada por la compañía Anidral Srl el 31.01.2002, y la cepa bacteriana probiótica *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BS01 LMG P-21384 depositada por la compañía Anidral Srl el 31.01.2002.

En este punto, el solicitante repitió las pruebas anteriores usando, en lugar de los aromatizantes de arándano y limón presentes en el mercado, aromatizantes obtenidos sólo a partir de la pulpa del fruto (limón y arándano) mediante prensado suave. En términos prácticos, en el caso tanto del limón como del arándano, la piel se separó de la pulpa de antemano y sólo la última se sometió a extracción mecánica en condiciones suaves, usando equipos y métodos conocidos por el experto en la técnica. En este caso, con los extractos/materias primas obtenidos de la extracción de la pulpa en condiciones suaves, se encontró que la toxicidad hacia las bacterias probióticas era inexistente; de hecho, usando una carga inicial de la cepa bacteriana probiótica igual a $6,7 \times 10^9$ UFC/g, se obtuvieron $6,5 \times 10^9$ UFC/g con zumo de arándano y $6,4 \times 10^9$ UFC/g con zumo de limón, por tanto valores mucho mejores que en el caso previo con muy baja toxicidad y una mortalidad cercana a cero.

Otras materias primas se sometieron a prueba de la misma manera que los extractos de limón y arándano, tal como se describe a continuación.

El solicitante sometió a prueba varios productos terminados presentes en el mercado con el objetivo de determinar el grado de toxicidad hacia las bacterias probióticas e identificar, entre las materias primas usadas en dichos productos terminados, cuáles de las materias primas usadas contribuyeron más a la toxicidad.

En una realización preferida, se determinó la toxicidad de una materia prima hacia las bacterias probióticas, siendo la materia prima por ejemplo un extracto y/o un aromatizante que está dentro de una formulación de un producto terminado que tiene, por ejemplo, un total de 5 componentes.

En este caso, la prueba de toxicidad implica la preparación de varias pruebas en el laboratorio igual al número de componentes - en este caso a modo de ejemplo existen 5 componentes, más las referencias analíticas.

Para mostrar la potencialidad de la presente invención, el solicitante sometió a prueba una serie de muestras de extracto de arándano europeo que va a usarse en la preparación de un producto terminado, por ejemplo P1.

Se determinó la toxicidad de la materia prima, el extracto de arándano europeo (lote L1, lote L2, de cuatro proveedores diferentes) que puede estar presente junto con otros componentes/ingredientes dentro de un producto terminado (P1).

En este caso, se prepararon dos pruebas. En una primera prueba, se preparó una mezcla que consistía en una cepa bacteriana probiótica, por ejemplo LS01 (usada como el marcador de toxicidad). Esta primer prueba representa la referencia analítica interna - Ref. 1. El recuento bacteriano teórico esperado fue igual a 25 DLM/dosis (referencia interna).

En una segunda prueba, se preparó una mezcla que contenía la cepa bacteriana probiótica LS01 (usada como el marcador de toxicidad) junto con un primer extracto de arándano europeo - L1 y L2, en dicho producto terminado, de diferentes proveedores.

Dichos recuentos bacterianos primero y segundo se realizaron en paralelo en las mismas condiciones de operación y con las mismas cantidades que las presentes en dicho producto terminado.

Posteriormente, se determinaron el recuento bacteriano real de dicha primera prueba -Ref. 1 y el recuento bacteriano de dicha segunda prueba. El recuento bacteriano se llevó a cabo adoptando las mismas condiciones de operación.

Proveedor V: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Var.

Proveedor V: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Var.

Proveedor K: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Kem.

Proveedor K: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Kem.

Proveedor P: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Pac.

Proveedor P: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Pac.

Proveedor N: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Nut.

5

Proveedor N: lote 1 (L1) y lote 2 (L2) -arándano europeo Nut.

Los diversos suministros (lotes) de la materia prima, el arándano europeo, se introdujeron en la mezcla para la prueba de toxicidad basándose en su contenido de proantocianidina (al menos el 1,5% (HPLC)), para asegurar la misma concentración de ese componente en el producto terminado P1.

10

Tabla 2

Mezcla que va a someterse a prueba	Lote	DLM de la carga/dosis	% de mortalidad frente a la Ref. 1
Cepa bacteriana LS01 (carga real -Ref. 1)		25	
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Var. [Proveedor V]	L1	1,2	95
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Var. [Proveedor V]	L2	0,9	96
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Kem. [Proveedor K]	L1	0,8	97
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Kem. [Proveedor K]	L2	2	91
Cepa bacteriana LS01 (carga real -Ref. 1)		22	
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Pac. [Proveedor P]	L1	20	9
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Pac. [Proveedor P]	L2	20	9
Cepa bacteriana LS01 (carga real -Ref. 1)		20	
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Nut. [Proveedor N]	L1	14	30
Mezcla: cepa bacteriana LS01 + extracto de arándano europeo Nut. [Proveedor N]	L2	9	55

15 La pruebas de la tabla 2 también se repitieron con las cepas bacterianas probióticas indicadas en la tabla 1 con los números 9, 33, 39, 46, 54, 59, 73, 84, 95, 101, 116, 130, 138, 143, 169 y 185, y los resultados obtenidos fueron muy similares a los mostrados en la tabla 2.

20 La diferencia entre el recuento bacteriano realizado en dicha primera prueba -Ref.1 y el recuento bacteriano realizado en dicha segunda prueba proporciona un porcentaje de mortalidad de la cepa bacteriana probiótica LS01, que proporciona una indicación de la toxicidad de dicho extracto de arándano europeo hacia dicha cepa.

25 La carga celular viable obtenida a partir del recuento bacteriano, tal como se determina en dicha primera prueba y en dicha segunda prueba, hace posible establecer si la materia prima sometida a prueba ejerce un efecto tóxico sobre las células de la cepa bacteriana probiótica LS01 presente en dicho producto terminado P1.

La disminución del porcentaje en el recuento bacteriano en comparación con la referencia -Ref.1 se expresa como el % de mortalidad inducida por la materia prima sometida a la prueba de toxicidad de la presente invención.

30 El solicitante aplicó además el método descrito anteriormente a extractos de limón y arándano presentes en un producto terminado, obteniendo resultados comparables a los obtenidos anteriormente con el arándano europeo.

35 La tabla 2 muestra que existen extractos, por ejemplo el extracto de arándano europeo, que se usa comúnmente para formular productos terminados – pero la misma consideración también se aplica con referencia a otras materias primas – que confieren toxicidad a los productos terminados y, por consiguiente, también al cuerpo de individuos que usan dichos productos terminados.

Por tanto, con la presente invención es posible desarrollar formulaciones de productos terminados tales como

complementos alimenticios o dispositivos médicos o productos farmacéuticos exentos de toxicidad o con toxicidad enormemente reducida, ya que es posible identificar si las materias primas usadas confieren toxicidad hacia las bacterias probióticas.

5 En el contexto de la presente invención, una disminución del porcentaje en la carga bacteriana en comparación con la referencia interna [(Recuento bacteriano de la muestra de prueba)/(Recuento bacteriano de la referencia interna)] = % de mortalidad inducida por la materia prima, comprendido desde el 1 hasta el 5% significa que no hay mortalidad; un valor comprendido desde más del 5 hasta el 15% significa una mortalidad baja, todavía aceptable; un valor comprendido desde más del 15 hasta el 25% significa mortalidad media-alta, mientras que más allá del 25 % se enfrenta a mortalidad aguda.

15 El método de la presente invención tiene una aplicación válida, por ejemplo, en la prueba para determinar la presencia de excipientes o materias primas tóxicos usados en las formulaciones de complementos y dispositivos médicos (productos terminados tales como, por ejemplo, aromatizante de naranja, extracto de cártamo, zanahoria negra, arándano etc.).

El método de la presente invención se ilustra a continuación a modo de ejemplo y por tanto no se limita el alcance de la presente invención.

20 En una realización preferida, en el caso de un producto terminado que contiene, por ejemplo, los siguientes componentes A, B, C (formulación completa A+B+C), el método de la presente invención puede usarse para determinar si el producto terminado como un conjunto (A+B+C) ejerce toxicidad hacia las cepas bacterianas probióticas.

25 En este caso, la prueba de la toxicidad hacia las bacterias probióticas implica la preparación de dos pruebas en el laboratorio.

30 En términos prácticos, se prepara una primera muestra que comprende la cepa bacteriana probiótica (marcador de toxicidad), el sustrato de cultivo óptimo para dicha cepa bacteriana probiótica y la materia prima que va a someterse a prueba, en este caso la formulación A+B+C.

35 Luego se prepara una segunda muestra (referencia interna) que comprende la misma cepa bacteriana probiótica usada en dicha primera muestra (marcador de toxicidad) y sólo el sustrato de cultivo óptimo (sin la materia prima que va a someterse a prueba).

La determinación tiene lugar por medio de un recuento bacteriano en placa de dicha primera muestra y dicha segunda muestra.

40 Preferiblemente, se realizan dichas pruebas primera y segunda en paralelo en las mismas condiciones de operación.

45 Si la razón entre el recuento bacteriano (número de células contadas sobre la placa) de dicha primera muestra y el recuento bacteriano (número de células contadas sobre la placa) de dicha segunda muestra proporciona un número menor de 1, por ejemplo 0,55 (o el 55%), significa que el recuento de las bacterias que han sobrevivido en contacto con la materia prima es del 55% y, por tanto, el % de mortalidad inducida por A+B+C en la cepa bacteriana probiótica usada como marcador es del 45%.

50 Si, de manera precisa, emerge una toxicidad hacia la cepa bacteriana probiótica usada como marcador, la siguiente etapa es ir y determinar cuál de los componentes A, B y C que constituyen el producto terminado (A+B+C), ejerce la toxicidad detectada.

En este caso, el método implica la preparación de tres pruebas (prueba 1, prueba 2 y prueba 3) tal como se especifica a continuación.

55 Por ejemplo, la prueba 1 se realiza sobre la materia prima A e implica la preparación de las siguientes muestras:

(i) Se prepara una primera muestra que comprende la cepa bacteriana probiótica (marcador de toxicidad), el sustrato de cultivo óptimo para dicha cepa bacteriana probiótica y la materia prima que va a someterse a prueba, en este caso A.

60 (ii) Se prepara una segunda muestra (referencia interna) que comprende la misma cepa bacteriana probiótica usada en dicha primera muestra (marcador de toxicidad) y sólo el sustrato de cultivo óptimo (sin la materia prima que va a someterse a prueba).

(iii) Se realiza un recuento bacteriano en placa sobre dicha primera muestra y dicha segunda muestra.

65 (iv) Se determina el porcentaje de mortalidad.

De manera análoga, se preparan la prueba 2 con la materia prima B y la prueba 3 con la materia prima C con el mismo método. De esta manera, es posible identificar cuál, entre los componentes A, B y C presentes en la formulación A+B+C, es el componente que ejerce toxicidad hacia las cepas bacterianas probióticas. Las pruebas de toxicidad se realizan en las mismas condiciones de operación y a las concentraciones indicadas en el enfoque secuencial de producto terminado.

Para el recuento en placa se sigue el método, descrito a continuación a modo de ejemplo no limitativo de un método de prueba, que comprende un recuento microbiológico tradicional con resuspensión inicial de la muestra, diluciones en serie en un diluyente adecuado, la siembra en placa sobre medio agarizado y un recuento de colonias después de la incubación en condiciones óptimas. Los excipientes/materias primas que determinan una mortalidad en placa comparable con la de la muestra de referencia deben considerarse conformes (toxicidad reducida o ninguna toxicidad).

Tal como se indicó anteriormente, se realiza un recuento total, diferencial y/o selectivo (en un medio agarizado) de bacterias lácticas y bifidobacterias para uso probiótico, presentes solas o en mezcla en la muestra que va a someterse a una determinación de la concentración de células vivas, viables.

La formulación del medio de cultivo es tal como para asegurar el crecimiento de todas las diversas especies de bacterias probióticas que pertenecen a los grupos microbianos mencionados anteriormente y para permitir, si es necesario, que se discriminen añadiendo agentes selectivos (generalmente antibióticos y/o azúcares) o uno diferencial (generalmente indicadores de cambio de color de pH y/o redox).

El método proporciona para el uso del medio agarizado LAPTg, cuya formulación consiste sólo en la presencia de dos fuentes de nitrógeno diferentes, un azúcar como una fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de vitaminas del grupo B y factores de crecimiento. La ausencia de sales orgánicas e inorgánicas y sustancias con acción selectiva permite un crecimiento floreciente de todas las diversas especies de bacterias probióticas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Añadiendo un agente selectivo y/o diferencial al agar LAPTg, es posible realizar recuentos diferenciados de los probióticos presentes en una mezcla compleja. Los agentes selectivos (generalmente antibióticos y/o azúcares) o uno diferencial (generalmente indicadores de cambio de color de pH y/o redox) se seleccionan caso por caso sobre la base de las características genotípicas y fenotípicas específicas de las cepas que constituyen la mezcla.

Si la muestra que va a analizarse consiste en una mezcla de dos o más cepas de lactobacilos y bifidobacterias, es recomendable acompañar el recuento selectivo en LAPTg con una evaluación cualitativa de las cepas que constituyen la mezcla usando medio HHD. Para detalles adicionales, se hace referencia a los siguientes artículos científicos:

- 40 - Molecular Cloning a Laboratory Manual (Sambrook, Fritsch, Maniatis);
- Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents. M. Danielsen A. Wind. 2002;
- 45 - Antibiotic Susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from Human Gastrointestinal tract, S. Delgado A.B. Florez B. Mayo de 2005;
- Norma ISO 6887-1:2000
- Preparation of LAPTg medium: FONT DE VALDEZ, G, y coll. : Influence of the recovery medium on the viability of injured freeze-dried lactic acid bacteria *Milchwissenschaft* 40 (9) 518-520 (1985).
- 50 - Norma UNI EN ISO 6887-1:2000 "Buffered Peptone Water"
- A differential medium for the enumeration of homofermentative y heterofermentative lactic acid bacteria. LC. McDonald R.F. McFeeters, M.A. Daeschel y HP Felming. *Applied and Environmental Microbiology*. Junio de 1987: 1382-1384.

Iniciales y abreviaturas:

- 60 - concentración de células vivas, viables = n.º de células/unidades (g o ml) capaces de crecer en el medio de cultivo y formar colonias distintas (UFC/g o ml)
- UFC/g o ml = unidad formadora de colonias, es decir la unidad de medida de la concentración de células vivas, viables
- 65 - CIM = concentración inhibitoria mínima

El método proporciona para el uso del medio agarizado LAPTg, cuya formulación consiste sólo en la presencia de dos fuentes de nitrógeno diferentes, un azúcar como una fuente de carbono y extracto de levadura como una fuente de vitaminas del grupo B y factores de crecimiento. La ausencia de sales orgánicas e inorgánicas y sustancias con acción selectiva permite un crecimiento floreciente de todas las diversas especies de bacterias probióticas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Añadiendo un agente selectivo y/o diferencial al agar LAPTg, es posible realizar recuentos diferenciados de los probióticos presentes en una mezcla compleja. Los agentes selectivos (generalmente antibióticos y/o azúcares) o uno diferencial (generalmente indicadores de cambio de color de pH y/o redox) se seleccionan caso por caso sobre la base de las características genotípicas y fenotípicas específicas de las cepas que constituyen la mezcla (véase 8.2). Si la muestra que va a analizarse consiste en una mezcla de dos o más cepas de lactobacilos y bifidobacterias, es recomendable acompañar el recuento selectivo en LAPTg con una evaluación cualitativa de las cepas que constituyen la mezcla usando medio HHD.

15 Materiales y reactivos:

Medio LAPTg, medio basal:

- Bacto peptona (hidrolizado enzimático de proteína animal) 15 g
- Triptona (hidrolizado pancreático de caseína) 10 g
- Extracto de levadura 10 g
- Tween 80 1 ml
- Agar 15 g
- Agua destilada c.s.p. hasta 900 ml

30 Nota: los pesos indicados anteriormente se entienden que tienen precisión del $\pm 5\%$

Disolver los componentes en el agua destilada, excepto el agar. Comprobar el pH y corregir, si es necesario, hasta $6,55 \pm 0,05$, luego añadir el agar y disolver en un baño de agua. Administrar el medio mientras que todavía está caliente en vasos de precipitados Bibby, y esterilizar en un autoclave a 121°C durante 15 minutos; después de la esterilización, el pH debe ser de $6,5 \pm 0,5$ a $25^\circ\text{C} \pm 1$.

Medio completo:

En el momento del uso, después de la disolución (8.1), añadir un volumen de una disolución de glucosa al 10%, esterilizada mediante filtración al medio basal, para tener una concentración de glucosa final de 10 g/litro.

Medio HHD:

- | | | |
|----|----------------------------|----------|
| 45 | - Fructosa | 2,50 g |
| | - KH_2PO_4 | 2,50 g |
| | - Bacto triptona | 10,00 g |
| 50 | - Peptona de soja | 1,50 g |
| | - Casaminoácidos | 3,00 g |
| | - Extracto de levadura | 10,00 g |
| 55 | - Tween 80 | 1,00 g |
| | - Verde de bromocresol | 20,00 ml |
| 60 | - Agar | 20,00 g |
| | - Agua destilada | 1000 ml |

pH final = $6,90 + 0,10$.

Etanol, filtros de jeringa de $0,45 \mu\text{m}$ estériles de un solo uso Minisart, diluyentes para reconstituir las muestras:

Reconstitución de los cultivos bacterianos líquidos y preparación de diluciones decimales en serie – solución salina de peptona

- 5
- Bacto peptona 1,0 g
 - cloruro de sodio (NaCl) 8,5 g
 - agua destilada c.s.p. hasta 1000 ml

10 Reconstitución de cultivos bacterianos anhidros (liofilizados) y productos terminados con probióticos en forma libre (no microencapsulados).

Cultivos bacterianos liofilizados no preparados en dosis o unidades

15 Tampón fosfato pH 6,8

- cloruro de sodio (NaCl) 5,00 g
- KH_2PO_4 3,78 g
- Na_2HPO_4 4,77 g
- agua destilada c.s.p. hasta 1000 ml

25 Sobres, cápsulas, píldoras, comprimidos, supositorios y subtapones de frascos:

Tampón fosfato pH 6,8

- 30
- cloruro de sodio (NaCl) 5,00 g
 - KH_2PO_4 3,78 g
 - Na_2HPO_4 4,77 g
- 35 - agua destilada c.s.p. hasta 1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada, calentar si es necesario. Comprobar que el pH es de $6,8 \pm 0,10$. Administrar los diluyentes en vasos de precipitados Bibby, esterilizar en un autoclave a 121°C durante 15 minutos, y almacenar en oscuridad a una temperatura de $4\text{-}5^\circ\text{C}$ durante no más de un mes.

40 Si los productos terminados contienen aceites y/o sustancias lipídicas, será necesario añadir Tween 80 al 1% al tampón a pH 6,8 (5.5.2.1).

45 Kit anaerobio (AnaeroGen - Oxoid): se une químicamente oxígeno, produciendo CO_2 ; las jeringas pequeñas no estériles de 10 ml también pueden comprarse en farmacias; disolución de L-cisteína-HCl al 5%_{fin}: pesar 5 g de clorhidrato de L-cisteína 1-hidratado (BDH 370553) y llevar a 100 ml con agua MQ; luego filtrar en un tubo Falcon estéril con un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ y almacenar a $+4^\circ\text{C} \pm 2$ durante hasta 1 año (la disolución tendrá que añadirse al medio LAPTg para obtener una concentración final del 0,05%).

50 Procedimiento.

8.1 Disolver el medio LAPTg (5.1) en una cantidad suficiente para el número de placas que van a prepararse (véase la nota en el párrafo 8.5.5), considerando que para cada placa son necesarios aproximadamente 12 ± 1 ml de medio. Si se planea realizar un recuento en las mismas diluciones de la muestra no sólo en el medio LAPTg como tal, sino también en el mismo complementado con uno o más agentes selectivos (N), considerar el (n.º de placas) multiplicado por N. Dejar el medio en un baño de agua termostático a una temperatura de $45^\circ\text{C} \pm 0,5$ durante al menos 3 horas;

60 8.2 Lista de agentes selectivos y preparación respectiva

8.2.1 Antibióticos

➤ VANCOMICINA

65 disolución madre 1 mg/ml (esterilizada mediante filtración $0,45 \mu\text{m}$)

ES 2 746 230 T3

	diluyente	agua
5	concentración de uso	1 µg/ml
	selección positiva	lactobacilos heterofermentadores obligatorios y facultativos (por ejemplo, <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , etc.).
10	selección negativa	cepas sensibles tales como lactobacilos homofermentadores (por ejemplo, grupo <i>L. acidophilus</i>) y bifidobacterias.
	Almacenamiento: alícuotas de 1,5 ml a +4°C durante 15 días o a -20°C durante hasta 4 meses.	
	➤ CLORANFENICOL	
15	disolución madre	10 mg/ml (esterilizada mediante filtración 0,45 µm)
	diluyente	etanol
20	concentración de uso	7 µg/ml
	selección positiva	cepas con CIM > 4 µg/ml (por ejemplo, LPC 00)
	selección negativa	cepas con mayor sensibilidad (CIM < 2 µg/ml).
25	Almacenamiento: alícuotas de 2 ml a -20°C durante hasta 4 meses.	
	➤ CLINDAMICINA + CIPROFLOXACINA	
30	disolución madre	1 mg/ml de clindamicina + 10 mg/ml de ciprofloxacina (esterilizada mediante filtración 0,45 µm)
	diluyente concentrado).	agua (en caso de mala disolución de la ciprofloxacina, añadir 1-2 gotas de ácido láctico concentrado).
35	concentración de uso	0,1 µg/ml de clindamicina y 10 µg/ml de ciprofloxacina
	selección positiva	grupo <i>L. acidophilus</i>
40	selección negativa	<i>L. rhamosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. delbrueckii</i> , bifidobacterias, lactococos y <i>Streptococcus thermophilus</i> .
	Almacenamiento: alícuotas de 1,5 ml a -20°C durante hasta 6 meses para ciprofloxacina (clindamicina n.d.).	
45	➤ CEFUROXIMA	
	disolución madre	1 mg/ml (esterilizada mediante filtración 0,45 µm)
	diluyente	agua
50	concentración de uso	0,1 µg/ml
	selección positiva	cepas con CIM > 1 (por ejemplo, <i>B. longum</i> PCB 133)
55	selección negativa	<i>Streptococcus thermophilus</i> (por ejemplo, YO 8) y otras cepas con CIM ≤ 0,016
	Almacenamiento: alícuotas de 1,5 ml a -20°C durante hasta 2 años.	
	➤ CEFOXITINA	
60	disolución madre	10 mg/ml (esterilizada mediante filtración 0,45 µm)
	diluyente	agua

ES 2 746 230 T3

- concentración de uso 100 µg/ml
- selección positiva cepas con CIM > 256 (por ejemplo, LGG, LPC 08, LC 01)
- 5 selección negativa LP 01, LP 02, grupo *L. acidophilus* y otras cepas sensibles con CIM < 24
- Almacenamiento: alícuotas de 1,5 ml a -20°C durante hasta 2 años
- MUPIROCINA
- 10 disolución madre 10 mg/ml (esterilizada mediante filtración 0,45 µm)
- diluyente agua
- 15 concentración de uso 50 µg/ml
- selección positiva *Bifidobacterias*
- selección negativa *Lactobacilos*.
- 20 Almacenamiento: alícuotas de 1,5 ml a -20°C durante hasta 6 meses
- CIPROFLOXACINA (selección positiva LP02 en mezcla con LF10).
- 25 disolución madre 10 mg/ml (esterilizada mediante filtración 0,45 µm)
- diluyente agua (en caso de mala disolución de la ciprofloxacina, añadir 1-2 gotas de ácido láctico concentrado)
- 30 concentración de uso 5 µg/ml
- selección positiva *LP02*
- selección negativa *LF10*.
- 35 Almacenamiento: alícuotas de 1,5 ml a -20°C durante hasta 6 meses
- 8.2.2 Otras condiciones selectivas.
- 40 8.3 Si la muestra que va a analizarse consiste en una mezcla de dos o más cepas de lactobacilos y/o bifidobacterias, es recomendable acompañar el recuento selectivo en LAPTg con una evaluación cualitativa de las cepas que constituyen la mezcla usando medio HHD. Disolver el medio mencionado anteriormente y dejarlo en un baño termostatzado tal como se describió para el medio LAPTg. Luego distribuir el medio en cantidades de 12 ± 1 ml en placas Petri y dejar solidificar;
- 45 8.4 Si se planea usar uno o más agentes selectivos, añadir la disolución de antibióticos u otro agente selectivo necesario para discriminar las cepas que constituyen la muestra a una alícuota (por ejemplo, 100 ml para aproximadamente 8 placas) del medio LAPTg disuelto, a la concentración final indicada, en un frasco estéril;
- 50 8.5 Preparar diluciones decimales sucesivas de la muestra (sección la de la norma ISO 6887-1:2000 párr. 9.2.)
- 8.5.1 Usar una pipeta estéril para transferir 1 ml de la dilución primaria, o 1 ml directamente del cultivo de muestra si es líquido, en un tubo de ensayo que contiene 9 ml de diluyente estéril;
- 55 8.5.2 no introducir la pipeta más profundo de 1 cm en la suspensión inicial;
- 8.5.3 cambiar la pipeta después de cada dilución;
- 8.5.4 homogeneizar por completo la dilución con un agitador mecánico, agitar con vórtex el tubo 3 veces durante un tiempo de no menos de 5 segundos, para obtener la dilución 10^{-2} ;
- 60 8.5.5 repetir estas etapas usando la dilución 10^{-2} y diluir adicionalmente hasta obtener una concentración de microorganismos que, cuando se cultive sobre una placa, dé un número significativo de colonias; debe indicarse que sembrar 2 diluciones decimales sucesivas (por ejemplo: 10^{-8} , 10^{-9}) debe permitir encontrar dos diluciones contiguas que contengan un número de células comprendido de desde 10 hasta 300. Si no existe una idea clara sobre el
- 65

ES 2 746 230 T3

número de células contenidas en la muestra, será necesario sembrar más de 2 diluciones decimales sucesivas (por ejemplo: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) y luego considerar sólo las que dan lugar a un número de colonias comprendido de desde 10 hasta 300.

5 8.6 distribuir 1 ml, extraído de las diluciones de la muestra que se consideren adecuadas (8.5.5), sobre las placas Petri;

10 8.7 añadir el medio LAPTg sobre la primera serie de placas y LAPTg complementado con el agente selectivo sobre la segunda serie, en cantidades de 12 ± 1 ml; debe indicarse que el tiempo transcurrido entre la reconstitución de la muestra y el momento en el que la dilución en serie entra en contacto con el medio de cultivo sobre la placa Petri (8.6) no debe exceder de 30 minutos

15 8.8 mezclar de manera uniforme el medio y la muestra, primero con movimientos de rotación, y luego con unos de translación horizontal y vertical;

8.9 dejar solidificar durante 15-20 minutos;

20 8.10 en el caso de muestras que consisten en una mezcla de dos o más cepas de lactobacilos y bifidobacterias y/o para las que se recomienda usar el medio HHD, añadir 100 μ l de las diluciones apropiadas a las placas preparadas de HHD (8.3) y distribuir la muestra de manera uniforme con una espátula;

8.11 incubar las placas bocabajo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 h en condiciones anaerobias (Gas-Pak + kit anaerobio). En cuanto a cómo usar el sistema anaerobio, seguir las instrucciones incluidas con el kit.

25 Cálculo de los resultados: verificar la presencia de colonias observándolas bajo la lente del visor de placas y contar exclusivamente las placas que contienen un número de colonias comprendido de desde 10 hasta 300. El resultado se expresará como UFC, es decir unidades formadores de colonias. Expresar el resultado usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

30 $(n_1 + 0,1 n_2) d$

en la que:

35 ΣC es la suma de las colonias contadas sobre todas las placas

n_1 es el número de placas contadas en la primera dilución

n_2 es el número de placas contadas en la segunda dilución

40 d es la dilución de la que se obtuvieron los primeros recuentos

Ejemplo:

45 Placas de dilución 10^{-8} : 250

Placas de dilución 10^{-9} : 23

Resultado:

$$250 + 23$$

$$\text{-----} = 248 \cdot 10^{-8} \text{ UFC/g}$$

50 $(1 + 0,1) 10^{-8}$

Redondear el resultado obtenido a dos dígitos significativos. Los resultados del ejemplo mostrado serán por tanto de $250 \cdot 10^{-8}$ UFC/g o ml en el caso de muestras líquidas (para el detalle de la expresión de resultados basándose en el tipo específico). En el caso de muestras extendidas en HHD, examinar de manera visual las diferentes morfologías de las colonias cultivadas que identifican las diversas cepas de lactobacilos y bifidobacterias presentes en la mezcla.

Después de realizar el recuento y examinar las colonias cultivadas en placa (etapa 9), se tiene: en el caso de

muestras de una sola cepa, el recuento obtenido de las placas con LAPTg tal como se representa la carga total de la carga probiótica que constituye la muestra.

En el caso de muestras que consisten en una mezcla de dos o más cepas de lactobacilos y bifidobacterias:

5 a) el recuento obtenido de la serie de placas preparadas con el medio LAPTg como tal representa la carga total de las bacterias probióticas en la muestra sometida a análisis;

10 b) el recuento obtenido de la serie de placas preparadas con el medio LAPTg complementado con el agente selectivo representa la carga de la(s) cepa(s) que fueron capaces de replicarse en presencia de esa sustancia específica añadida al medio como agente selectivo.

15 c) a partir del recuento con respecto a las cepas probióticas individuales, obtenido con el medio selectivo, es posible derivar el recuento de la(s) cepa(s) restante(s) que no se desarrollaron en presencia del agente selectivo calculando la diferencia con el recuento total (letra a) en LAPTg como tal.

d) la siembra en medio HHD hace posible discriminar de manera visual las diferentes cepas presentes en la muestra en mezcla y enumerados de manera selectiva en medio LAPTg.

20 El solicitante sometió a prueba las siguientes materias primas con el método de la presente invención en varias pruebas usando las cepas bacterianas probióticas indicadas en la tabla 1 con los números 17, 22, 41, 60, 74, 98, 121, 145, 174 y 182 como marcadores de toxicidad.

25 Los datos experimentales muestran que en muchos casos se encontró de manera inesperada toxicidad que siempre estaba presente a diversos niveles, junto con un % de mortalidad sustancial.

Prueba del aloe: mortalidad encontrada igual al 5%.

30 Prueba del ácido cítrico: mortalidad encontrada igual al 2%.

Prueba de la arabinogalactana: mortalidad encontrada igual al 6%.

Prueba del aromatizante de frambuesa: mortalidad encontrada igual al 2%.

35 Prueba del aromatizante de frambuesa: mortalidad encontrada igual al 26%.

Prueba del arándano: mortalidad encontrada igual al 5%.

40 Prueba del dióxido de silicio: mortalidad encontrada igual al 50%.

Prueba del dióxido de silicio: mortalidad encontrada igual al 28%.

Prueba del dióxido de silicio: mortalidad encontrada igual al 23%.

45 Prueba de la goma tara: mortalidad encontrada igual al 14%.

Prueba de la vitamina B1, B2 y B6: mortalidad encontrada igual al 33%.

50 Prueba de la zeolita: mortalidad encontrada igual al 2%.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la toxicidad de una materia prima alimenticia o farmacéutica que comprende una primera etapa en la que una materia prima alimenticia o farmacéutica se pone en contacto con una carga bacteriana preestablecida de una cepa bacteriana probiótica usada como marcador de toxicidad y una segunda etapa de determinación de la reducción de dicha carga bacteriana debido a la toxicidad ejercida por dicha materia prima alimenticia o farmacéutica hacia dicha cepa bacteriana probiótica, en el que dicha primera etapa comprende preparar:
- 5
- 10 - una primera muestra de prueba que comprende el marcador de la cepa bacteriana probiótica a una concentración preestablecida, preferiblemente a una concentración comprendida de desde 1×10^6 hasta 1×10^9 UFC/g, el sustrato de cultivo óptimo para el crecimiento de dicha cepa bacteriana probiótica y la materia prima alimenticia o farmacéutica que va a someterse a prueba, y
- 15 - una segunda muestra de prueba (referencia interna) que comprende la misma cepa bacteriana probiótica de dicha primera muestra a la misma concentración preestablecida y el sustrato de cultivo óptimo para el crecimiento de dicha cepa bacteriana probiótica y en el que dicha segunda etapa comprende realizar un recuento bacteriano en dichas muestras de prueba primera y segunda para proporcionar un recuento de las bacterias que sobrevivieron en contacto con la materia prima y para expresar el % de mortalidad inducida por dicha materia prima en la cepa probiótica usada como marcador, en el que la cepa bacteriana probiótica usada como marcador de toxicidad se selecciona de.
- 20

Tabla 1

n.º	Nombre	Institución depositaria	Número de depósito	Fecha de depósito	Depositante
1	<i>Lactobacillus casei</i>	CNCM I.P.	I-785	21.07.1988	Anidral Srl
2	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CNCM I.P.	I-786	21.07.1988	Anidral Srl
3	<i>Lactobacillus crispatus</i>	CNCM I.P.	I-787	21.07.1988	Anidral Srl
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CNCM I.P.	I-788	21.07.1988	Anidral Srl
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CNCM I.P.	I-789	21.07.1988	Anidral Srl
6	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i>	CNCM I.P.	I-790	21.07.1988	Anidral Srl
7	<i>Streptococcus thermophilus</i> B39	BCCM LMG	LMG P-18383	5.05.1998	Anidral Srl
8	<i>Streptococcus thermophilus</i> T003	BCCM LMG	LMG P-18384	5.05.1998	Anidral Srl
9	<i>Lactobacillus pentosus</i> 9/1 ei	BCCM LMG	LMG P-21019	16.10.2001	Mofin Srl
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776 / 1 bi	BCCM LMG	LMG P-21020	16.10.2001	Mofin Srl
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> 476LL 20 bi	BCCM LMG	LMG P-21021	16.10.2001	Mofin Srl
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> PR ci	BCCM LMG	LMG P-21022	16.10.2001	Mofin Srl
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776 / 2 hi	BCCM LMG	LMG P-21023	16.10.2001	Mofin Srl
14	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>paracasei</i> 181A / 3 aiai	BCCM LMG	LMG P-21380	31.01.2002	Anidral Srl
15	<i>Lactobacillus</i> que pertenece al grupo <i>acidophilus</i> 192A / 1 aiai	BCCM LMG	LMG P-21381	31.01.2002	Anidral Srl
16	<i>Bifidobacterium longum</i> 175A / 1 aiai	BCCM LMG	LMG P-21382	31.01.2002	Anidral Srl
17	<i>Bifidobacterium breve</i> 195A / 1 aici	BCCM LMG	LMG P-21383	31.01.2002	Anidral Srl

ES 2 746 230 T3

18	<i>Bifidobacterium lactis</i> 32A / 3 aiai	BCCM LMG	LMG P-21384	31.01.2002	Anidral Srl
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/2 gi	BCCM LMG	LMG P-21385	31.01.2002	Mofin Srl
20	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci	BCCM LMG	LMG P-21388	31.01.2002	Mofin Srl
21	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 hi	BCCM LMG	LMG P-21387	15.03.2002	Mofin Srl
22	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci	BCCM LMG	LMG P-21388	31.01.2002	Mofin Srl
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/4 li	BCCM LMG	LMG P-21389	15.03.2002	Mofin Srl
24	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BCCM LMG	LMG P-26144	03.11.2010	Probiotical SpA
25	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	BCCM LMG	LMG P-26143	03.11.2010	Probiotical SpA
26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16506	18.06.2004	Anidral Srl
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16507	18.06.2004	Anidral Srl
28	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16590	20.07.2004	Anidral Srl
29	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16591	20.07.2004	Anidral Srl
30	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16592	20.07.2004	Anidral Srl
31	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 16593	20.07.2004	Anidral Srl
32 = 56	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 16594	21.07.2004	Anidral Srl
33	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 16595	21.07.2004	Anidral Srl
34	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 16596	21.07.2004	Anidral Srl
35	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSMZ	DSM 16597	21.07.2004	Anidral Srl
36	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSMZ	DSM 16598	21.07.2004	Anidral Srl
37	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 16603	20.07.2004	Anidral Srl
38	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 16604	20.07.2004	Anidral Srl
39	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	DSMZ	DSM 16605	20.07.2004	Anidral Srl
40	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	DSMZ	DSM 16606	20.07.2004	Anidral Srl
41	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	DSMZ	DSM 16607	20.07.2004	Anidral Srl
42	<i>Staphylococcus xylosum</i>	DSMZ	DSM 17102	01.02.2005	Anidral Srl
43 = 57	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 17103	01.02.2005	Anidral Srl
44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ	DSM 17104	01.02.2005	Anidral Srl
45	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 17843	21.12.2005	Anidral Srl

ES 2 746 230 T3

46	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 17844	21.12.2005	Anidral Srl
47	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 17845	21.12.2005	Anidral Srl
48	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18295	24.05.2006	Anidral Srl
49	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18296	24.05.2006	Anidral Srl
50	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18297	24.05.2006	Anidral Srl
51	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 18298	24.05.2006	Anidral Srl
52	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18299	24.05.2006	Anidral Srl
53	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18300	24.05.2006	Anidral Srl
54	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18301	24.05.2006	Anidral Srl
55	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18302	24.05.2006	Anidral Srl
56 = 32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-3 <i>Bifidobacterium catenulatum</i> <i>sp./pseudocatenulatum</i> EI-3I, ID 09-255	DSMZ	DSM 18350	15.06.2006	Anidral Srl
57 = 43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-15	DSMZ	DSM 18351	15.06.2006	Anidral Srl
58	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-18 <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i> EI-18, ID 09-256	DSMZ	DSM 18352	15.06.2006	Anidral Srl
59	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> EI-20	DSMZ	DSM 18353	15.06.2006	Anidral Srl
60	<i>Streptococcus thermophilus</i> FRai	DSMZ	DSM 18613	13.09.2006	Mofin Srl
61	<i>Streptococcus thermophilus</i> LB2bi	DSMZ	DSM 18614	13.09.2006	Mofin Srl
62	<i>Streptococcus thermophilus</i> LRci	DSMZ	DSM 18615	13.09.2006	Mofin Srl
63	<i>Streptococcus thermophilus</i> FP4	DSMZ	DSM 18616	13.09.2006	Mofin Srl
64	<i>Streptococcus thermophilus</i> ZZ5F8	DSMZ	DSM 18617	13.09.2006	Mofin Srl
65	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO4	DSMZ	DSM 18618	13.09.2006	Mofin Srl
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> S1ci	DSMZ	DSM 18619	13.09.2006	Mofin Srl
67	<i>Streptococcus thermophilus</i> 641bi	DSMZ	DSM 18620	13.09.2006	Mofin Srl
68	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A / 1ai	DSMZ	DSM 18621	13.09.2006	Mofin Srl
69	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A / 2ai	DSMZ	DSM 18622	13.09.2006	Mofin Srl
70	<i>Streptococcus thermophilus</i> IDC11	DSMZ	DSM 18623	13.09.2006	Mofin Srl
71	<i>Streptococcus thermophilus</i> ML3di	DSMZ	DSM 18624	13.09.2006	Mofin Srl

ES 2 746 230 T3

72	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO3	DSMZ	DSM 18625	13.09.2006	Mofin Srl
73	<i>Streptococcus thermophilus</i> G62	DSMZ	DSM 19057	21.02.2007	Mofin Srl
74	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1192	DSMZ	DSM 19058	21.02.2007	Mofin Srl
75	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB18	DSMZ	DSM 19059	21.02.2007	Mofin Srl
76	<i>Streptococcus thermophilus</i> CCR21	DSMZ	DSM 19060	21.02.2007	Mofin Srl
77	<i>Streptococcus thermophilus</i> G92	DSMZ	DSM 19061	21.02.2007	Mofin Srl
78	<i>Streptococcus thermophilus</i> G69	DSMZ	DSM 19062	21.02.2007	Mofin Srl
79	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 19063	21.02.2007	Anidral Srl
80	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 19064	21.02.2007	Anidral Srl
81	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 19065	21.02.2007	Anidral Srl
82	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 19066	21.02.2007	Anidral Srl
83	<i>Weissella</i> ssp. WSP 01	DSMZ	DSM 19067	21.02.2007	Anidral Srl
84	<i>Weissella</i> ssp. WSP 02	DSMZ	DSM 19068	21.02.2007	Anidral Srl
85	<i>Lactobacillus</i> ssp. WSP 03	DSMZ	DSM 19069	21.02.2007	Anidral Srl
86	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 09	DSMZ	DSM 19070	21.02.2007	Anidral Srl
87	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 10	DSMZ	DSM 19071	21.02.2007	Anidral Srl
88	<i>Lactococcus lactis</i>	DSMZ	DSM 19072	21.02.2007	Anidral Srl
89	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 19187	20.03.2007	Anidral Srl
90	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 19188	20.03.2007	Anidral Srl
91	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	DSMZ	DSM 19739	27.09.2007	Anidral Srl
92	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 19818	30.10.2007	Anidral Srl
93	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 01	DSMZ	DSM 19948	28.11.2007	Anidral Srl
94	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 02	DSMZ	DSM 19949	28.11.2007	Anidral Srl
95	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 03	DSMZ	DSM 19950	28.11.2007	Anidral Srl
96	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 04	DSMZ	DSM 19951	28.11.2007	Anidral Srl
97	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 05	DSMZ	DSM 19952	28.11.2007	Anidral Srl
98	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSMZ	DSM 21444	13.05.2008	Probiotical SpA
99	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSMZ	DSM 21717	06.08.2008	Probiotical SpA

ES 2 746 230 T3

100	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSMZ	DSM 21718	06.08.2008	Probiotical SpA
101	<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSMZ	DSM 21980	14.11.2008	Probiotical SpA
102	<i>Lactobacillus rahmnosus</i>	DSMZ	DSM 21981	14.11.2008	Probiotical SpA
103	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	DSMZ	DSM 22106	10.12.2008	Probiotical SpA
104	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ	DSM 22107	10.12.2008	Probiotical SpA
105	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 22775	23.07.2009	Probiotical SpA
106	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 22776	23.07.2009	Probiotical SpA
107	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 22892	28.08.2009	Probiotical SpA
108	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 22893	28.08.2009	Probiotical SpA
109	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 22894	28.08.2009	Probiotical SpA
110	<i>Bifidobacterium lactis</i>	DSMZ	DSM 23032	13.10.2009	Probiotical SpA
111	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSMZ	DSM 23033	13.10.2009	Probiotical SpA
112	<i>Lactobacillus brevis</i>	DSMZ	DSM 23034	13.10.2009	Probiotical SpA
113	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	DSMZ	DSM 23224	12.01.2010	Probiotical SpA
114	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 23233	12.01.2010	Probiotical SpA
115	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 23234	12.01.2010	Probiotical SpA
116	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 23731	29.06.2010	Probiotical SpA
117	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 23732	29.06.2010	Probiotical SpA
118	<i>Bifidobacterium lactis</i>	DSMZ	DSM 23733	29.06.2010	Probiotical SpA
119	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 23877	05.08.2010	Probiotical SpA
120	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 23878	05.08.2010	Probiotical SpA
121	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 23879	05.08.2010	Probiotical SpA
122	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 23880	05.08.2010	Probiotical SpA
123	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	DSMZ	DSM 24243	23.11.2010	Probiotical SpA
124	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSMZ	DSM 24303	23.11.2010	Probiotical SpA
125	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 24437	04.01.2011	Probiotical SpA
126	<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ	DSM 24438	04.01.2011	Probiotical SpA
127	<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ	DSM 24439	04.01.2011	Probiotical SpA
128	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSMZ	DSM 24440	04.01.2011	Probiotical SpA
129	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 24441	04.01.2011	Probiotical SpA
130	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 24512	25.01.2011	Probiotical SpA
131	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSMZ	DSM 24513	25.01.2011	Probiotical SpA
132	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 24618	02.03.2011	Probiotical SpA
133	<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ	DSM 24619	02.03.2011	Probiotical SpA
134	<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ	DSM 24620	02.03.2011	Probiotical SpA
135	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSMZ	DSM 24621	02.03.2011	Probiotical SpA
136	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 24622	02.03.2011	Probiotical SpA
137	<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSMZ	DSM 24623	02.03.2011	Probiotical SpA

ES 2 746 230 T3

138	<i>Bifidobacterium infantis</i>	DSMZ	DSM 24687	29.03.2011	Probiotical SpA
139	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 24688	29.03.2011	Probiotical SpA
140	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 24689	29.03.2011	Probiotical SpA
141	<i>Bifidobacterium lactis</i>	DSMZ	DSM 24690	29.03.2011	Probiotical SpA
142	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 24691	29.03.2011	Probiotical SpA
143	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 24706	07.04.2011	Probiotical SpA
144	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 24707	07.04.2011	Probiotical SpA
145	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 24708	07.04.2011	Probiotical SpA
146	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 24709	07.04.2011	Probiotical SpA
147	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 25138	02.09.2011	Probiotical SpA
148	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 25139	02.09.2011	Probiotical SpA
149	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 25140	02.09.2011	Probiotical SpA
150	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 25141	02.09.2011	Probiotical SpA
151	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 25246	19.09.2011	Probiotical SpA
152	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 25247	19.09.2011	Probiotical SpA
153	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 25282	20.10.2011	Probiotical SpA
154	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 25545	12.01.2012	Probiotical SpA
155	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25669	16.02.2012	Probiotical SpA
156	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25670	16.02.2012	Probiotical SpA
157	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25671	16.02.2012	Probiotical SpA
158	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25672	16.02.2012	Probiotical SpA
159	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25673	16.02.2012	Probiotical SpA
160	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25674	16.02.2012	Probiotical SpA
161	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25675	16.02.2012	Probiotical SpA
162	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25676	16.02.2012	Probiotical SpA
163	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25677	16.02.2012	Probiotical SpA
164	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25678	16.02.2012	Probiotical SpA
165	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25679	16.02.2012	Probiotical SpA
166	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	DSMZ	DSM 25680	16.02.2012	Probiotical SpA
167	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DSMZ	DSM 25681	16.02.2012	Probiotical SpA
168	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	DSMZ	DSM 25682	16.02.2012	Probiotical SpA
169	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 25683	16.02.2012	Probiotical SpA
170	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 25684	16.02.2012	Probiotical SpA
171	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 25685	16.02.2012	Probiotical SpA
172	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25708	24.02.2012	Probiotical SpA
173	<i>Bifidobacterium infantis</i>	DSMZ	DSM 25709	24.02.2012	Probiotical SpA
174	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ	DSM 25710	24.02.2012	Probiotical SpA
175	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25717	01.03.2012	Probiotical SpA
176	<i>Bifidobacterium longum</i>	DSMZ	DSM 25718	01.03.2012	Probiotical SpA
177	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 26036	06.06.2012	Probiotical SpA
178	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 26037	06.06.2012	Probiotical SpA

179	<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSMZ	DSM 26038	06.06.2012	Probiotical SpA
180	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	DSMZ	DSM 26456	02.10.2012	Probiotical SpA
181	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 26955	01.03.2013	Probiotical SpA
182	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 26956	01.03.2013	Probiotical SpA
183	<i>Lactobacillus casei</i>	DSMZ	DSM 27537	24.07.2013	Probiotical SpA
184	<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSMZ	DSM 27538	24.07.2013	Probiotical SpA
185	<i>Lactobacillus jensenii</i>	DSMZ	DSM 27539	24.07.2013	Probiotical SpA

2. Método según la reivindicación 1, en el que la cepa bacteriana probiótica usada como marcador de toxicidad se selecciona de.

9	<i>Lactobacillus pentosus</i> 9/1 ei	BCCM LMG	LMG P-21019	16.10.2001	Mofin Srl
15	<i>Lactobacillus</i> que pertenece al grupo <i>acidophilus</i> 192A / 1 aiai	BCCM LMG	LMG P-21381	31.01.2002	Anidral Srl
17	<i>Bifidobacterium breve</i> 195A / 1 aici	BCCM LMG	LMG P-21383	31.01.2002	Anidral Srl
18	<i>Bifidobacterium lactis</i> 32A / 3 aiai	BCCM LMG	LMG P-21384	31.01.2002	Anidral Srl
22	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci	BCCM LMG	LMG P-21388	31.01.2002	Mofin Srl
33	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSMZ	DSM 16595	21.07.2004	Anidral Srl
39	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	DSMZ	DSM 16605	20.07.2004	Anidral Srl
41	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	DSMZ	DSM 16607	20.07.2004	Anidral Srl
46	<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ	DSM 17844	21.12.2005	Anidral Srl
54	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 18301	24.05.2006	Anidral Srl
59	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> EI-20	DSMZ	DSM 18353	15.06.2006	Anidral Srl
60	<i>Streptococcus thermophilus</i> FRai	DSMZ	DSM 18613	13.09.2006	Mofin Srl
73	<i>Streptococcus thermophilus</i> G62	DSMZ	DSM 19057	21.02.2007	Mofin Srl
74	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1192	DSMZ	DSM 19058	21.02.2007	Mofin Srl
84	<i>Weissella</i> ssp. WSP 02	DSMZ	DSM 19068	21.02.2007	Anidral Srl
95	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LD 03	DSMZ	DSM 19950	28.11.2007	Anidral Srl
98	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	DSMZ	DSM 21444	13.05.2008	Probiotical SpA
101	<i>Lactobacillus pentosus</i>	DSMZ	DSM 21980	14.11.2008	Probiotical SpA
105	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSMZ	DSM 22775	23.07.2009	Probiotical SpA
116	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ	DSM 23731	29.06.2010	Probiotical SpA
121	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 23879	05.08.2010	Probiotical SpA

130	<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSMZ	DSM 24512	25.01.2011	Probiotical SpA
138	<i>Bifidobacterium infantis</i>	DSMZ	DSM 24687	29.03.2011	Probiotical SpA
143	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 24706	07.04.2011	Probiotical SpA
145	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSMZ	DSM 24708	07.04.2011	Probiotical SpA
169	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ	DSM 25683	16.02.2012	Probiotical SpA
174	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ	DSM 25710	24.02.2012	Probiotical SpA
182	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ	DSM 26956	01.03.2013	Probiotical SpA
185	<i>Lactobacillus jensenii</i>	DSMZ	DSM 27539	24.07.2013	Probiotical SpA

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho recuento bacteriano se realiza con un método que comprende una etapa de resuspensión de la muestra inicial, una etapa de preparación de diluciones en serie en un diluyente adecuado, una etapa de siembra en placa en un medio agarizado y una etapa de recuento de las colonias después de la incubación en condiciones óptimas.
4. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina la razón entre el recuento bacteriano (número de células contadas sobre la placa) de dicha primera muestra de prueba y el recuento bacteriano (número de células contadas sobre la placa) de dicha segunda muestra de prueba (referencia interna).
5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las cepas bacterianas probióticas usadas como marcador de toxicidad hacia las bacterias probióticas se seleccionan de lactobacilos y bifidobacterias.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha materia prima alimenticia o farmacéutica se selecciona del grupo que comprende aromatizantes, extractos, coformulantes de origen orgánico y/o inorgánico, vitaminas, proteínas, aminoácidos, peptonas, polímeros naturales y/o sintéticos.
7. Método para producir productos alimenticios o complementos alimenticios o dispositivos médicos o productos farmacéuticos que comprenden materias primas que no son tóxicas hacia las bacterias probióticas seleccionadas tal como se definen en la reivindicación 1, comprendiendo dicho método el método para determinar la toxicidad de una materia prima alimenticia o farmacéutica según una o más de las reivindicaciones precedentes 1-6.