

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 391**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
A21D 13/04 (2006.01)
A21D 13/06 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/24 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2007 E 07805691 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **15.04.2009 EP 2046944**

54 Título: **Mezcla de bacterias del ácido láctico para la preparación de productos de panadería sin gluten**

30 Prioridad:

17.07.2006 IT RM20060369

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2013

73 Titular/es:

**GIULIANI S.P.A. (100.0%)
VIA P. PALAGI 2
20129 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**GIULIANI, GIAMMARIA;
BENEDUSI, ANNA;
DI CAGNO, RAFFAELLA;
DE ANGELIS, MARIA;
LUISI, ANTONELLA y
GOBBETTI, MARCO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 391 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

Mezcla de bacterias del ácido láctico para la preparación de productos de panadería sin gluten

La presente invención se refiere a una mezcla de bacterias del ácido láctico para la preparación de productos de panadería sin gluten. Particularmente, la invención se refiere al uso de "levadura natural" a base de bacterias del ácido láctico seleccionadas como "agente de fermentación" para la producción de pan sin gluten para ser utilizado por pacientes celíacos. El uso de las bacterias del ácido láctico seleccionadas y el protocolo de producción propuesto permiten una mejora de las características nutricionales organolépticas y de conservación en comparación con el pan sin gluten obtenido utilizando levadura de cerveza o fermentación química.

La epidemiología de la intolerancia al gluten o enfermedad celíaca está en continuo crecimiento. Los últimos estudios referidos a la población europea y de los Estados Unidos indican una incidencia de 1/100 individuos (Revers, 2005. *Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? Gastroenterology* 128:47 - 51). Según los conocimientos actuales el único remedio terapéutico eficaz contra esta intolerancia alimentaria es mantener rigurosamente una dieta completamente carente de gluten (sin gluten) durante toda la vida (Hamer, 2005. *Celiac Disease: Background and biochemical aspects. Biotechnol Advanc* 23:401 - 408).

Los pacientes celíacos sometidos a un régimen dietético estricto (tolerancia cero) recuperan, en muchos casos, la morfología normal de las vellosidades y criptas intestinales (Hamer, 2005. *Biotechnol Advanc* 23:401 - 408).

Como se publicó en la Norma del Código adoptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) los alimentos sin gluten se definen de la siguiente manera: (i) se preparan a partir de ingredientes que originalmente no contienen trigo (todas las especies del género *Triticum*), espelta, kamut, centeno, cebada, avena o sus variedades cruzadas y con concentraciones de gluten inferiores a 20 ppm, (ii) se preparan utilizando ingredientes extraídos de trigo, espelta, centeno, cebada, avena o sus variedades cruzadas y se convierten en ingredientes sin gluten con una concentración de gluten que no superior a 200 ppm, y (iii) se preparan a partir de una mezcla de los ingredientes (i) y (ii) con una concentración de gluten no superior a 200 ppm. Una gran variedad de productos sin gluten están disponibles comercialmente: pan, pizza, galletas y pastas alimenticias. (Gallagher et al 2004. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Ski Technol* 15:143 - 152). Generalmente la calidad del pan sin gluten, en términos de características sensoriales y reológicas, es menor que la del pan preparado con harina de trigo o de centeno (Gallagher et al 2004. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Ski Technol* 15:143 - 152). La ausencia de gluten y, por lo tanto, las propiedades estructurales difícilmente reemplazables, y la aplicación de protocolos de producción adaptados para ingredientes no convencionales, determinan principalmente la inferior calidad (Gallagher et al., 2004. *Tendencias de la Alimentación Ski Technol* 15:143 - 152). Los informes de la literatura más recientes muestran diversos estudios realizados con el fin de mejorar las propiedades reológicas y de conservación. En particular, se describe el uso de féculas producidas de diferentes maneras, (Gallagher et al., 2002. Novel rices starches in gluten free bread. *Proceedings of the International Association of Cereal Chemists Conference*. 24-26; Demiate et al, 2000. Relationship between baking behaviour of modified cassava starches and starch chemical structure by FTIR spectroscopy. *Carbohydr Polym* 42:149 - 158), las gomas y otros hidrocoloides (por ejemplo hidroxipropil metil celulosa, carragenatos, xantanos) (Kang et al, 1997. *Kor Jour Food Ski Technol* 29:700 - 704; Schwarzlaff et al., 1996. Guar and locust bean gums as partial replacers of all-purpose flour in bread: an objective and sensory evaluation. *J Food Qual* 19:217 - 229), proteínas de soja (Ranhorta et al., 1975. Preparation and fortification of soy-fortified gluten-free bread. *J Food Sci* 40:62 - 64) y la leche en polvo y el arroz (Gallagher et al, 2003. The effect of dairy and powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *Eur. Food Res. Technol* 218:44 - 48), que en diversas formulaciones pueden contribuir a mejorar la estructura y la vida útil de los productos sin gluten. Puesto que se ha demostrado que los pacientes celíacos están sometidos a una absorción menor de fibras, minerales y de otros nutrientes, en comparación con los individuos sometidos a un régimen alimenticio normal (Grehn et al., 2001. Dietary habits of Swedish adult celiac patients treated by to gluten-free diet for 10 years. *Scand J Nutr* 45:178 - 182; Mariani et al., 1998. The gluten-free diet: a nutritional risk factor for adolescents with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 27:519 - 523), se ha considerado también el enriquecimiento de productos sin gluten con fibras de distintos orígenes (por ejemplo inulina) por diversos grupos de investigación (Gibson and Roberfroid, 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nut* 125:1401 - 1412; Taylor and Parker, 2002. Quinoa. *Pseudocereals and less common cereals, wheat properties and utilisation potential* 93-122; Tosi et al., 1996. Utilisation of whole amaranthus (*Amarantus cruentus*) flour in the manufacture of biscuits for celiacs. *Alimentaria* 34:49 - 51). La tecnología de los productos sin gluten se basa principalmente la utilización de productos de fermentación químicos o levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) (Gallagher et al., 2004. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Ski Technol* 15:143 - 152). Según los actuales conocimientos es conocida la solicitud de patente WO02065842, relativa a un iniciador para la producción de pan y productos de panadería, en particular sin gluten, en donde dicho iniciador se basa en *Lactobacillus fermentum*. Además, es conocido un estudio (datos de Arendt no publicados en Katina et al., 2005.

Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci. Technol* 16:104 - 112) en donde se describe el uso de "levadura natural" como agente fermentación biológico y natural para la producción de pan sin gluten, a base de arroz, soja, trigo sarraceno y xantanos, con el fin de impulsar la sabor y aroma, y prolongar la vida útil. Los resultados obtenidos han demostrado que es posible tecnológicamente el uso de "levadura natural" también en los productos sin gluten y, en particular, la conservación y el sabor mejoran en comparación con los mismos productos obtenidos con levadura de cerveza o con fermentos químicos. La "levadura natural", un cóctel de bacterias del ácido láctico y levaduras que proceden de materias primas, se utiliza con frecuencia en la tecnología de productos de panadería fermentados. Diversos estudios realizados en la última década (Gobbetti et al., 2005. Bacteria Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol* 16:57 - 69) demuestran que el proceso de acidificación y la actividad peptidasa ejercida por las bacterias del ácido láctico de la levadura natural son adecuadas para mejorar el sabor, las características reológicas, nutricionales y de conservación de los productos de panadería. Estudios recientes (Di Cagno et al., 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol* 68:623 - 633; Di Cagno et al, 2004. A sourdough bread made from wheat and non-toxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue. *Appl Environ Microbiol* 70:1088 - 1096; De Angelis et al. 2005. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyse gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochim Biophys Acta-Moleculare Basis of Disease* 1762:80 - 93) demostraron que las bacterias del ácido láctico de "levadura natural", cuando se seleccionan según su actividad proteolítica, son capaces de degradar notablemente las fracciones de gluten responsables de la patología celíaca. Di Cagno et al. (*Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 2, Febrero 2004, páginas 1088-1096) y De Angelis et al. (*Journal of Cereal Science*, Academic Press Ltd., XX, vol. 43, no. 3, Mayo 2006, páginas.301-314) describen cepas de bacterias del ácido láctico para fermentar harinas sin gluten, tales como *Lactobacillus brevis* 14G y *L. sanfranciscensis* 7A. Gerez et al (*Letter in Applied Microbiology*, vol 42. No. 5 Mayo 2006, páginas 459-464) describe un método de selección para identificar cepas de lactobacilos y pediococcus que descompongan el gluten. En este contexto, algunos estudios (Storsrud et al., 2003. Gluten contamination in oat products and products naturally free from gluten. *Eur. Food Res Technol* 217:281 - 485) llevados a cabo en productos comercialmente disponibles en Europa del Norte-demonstraron que un porcentaje importante (aproximadamente 30%) de productos sin gluten puede resultar contaminados por trazas de gluten (100-300 ppm), lo cual puede constituir un posible riesgo para los individuos sujetos a esta intolerancia.

En base a la literatura referida y a los datos anteriormente descritos y, algunos problemas parecen ser prioritarios en relación con la calidad de los productos sin gluten: (i) mejorar la calidad sensorial, ya que resultan demasiado diferentes de los productos convencionales; (ii) aumentar el valor nutricional con el fin de reducir la deficiencia de absorción de los pacientes celíacos; (iii) reducir los riesgos de contaminación con gluten que posiblemente ocurran en la experimentación o durante el proceso de transformación, y (iv) prolongar la conservación.

A la luz de lo anterior es por lo tanto evidente la necesidad de proporcionar materiales y métodos para la preparación de productos de panadería que no exhiban las desventajas ya conocidas.

Los autores de la presente invención han descubierto ahora una "levadura natural" que consiste en una mezcla seleccionada de bacterias del ácido láctico y presentan un protocolo de producción adecuado para mejorar las características de sabor y nutricionales, que pueden considerarse instrumentos tecnológicos adecuados para resolver los problemas prioritarios de la calidad del pan sin gluten.

Las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la presente invención pertenecen al género *Lactobacillus* y han sido aisladas previamente de "levadura natural" para la producción del pan típico del centro y sur de Italia. La selección se ha llevado a cabo entre 55 panes diferenciados en base a las actividades proteolítica, acidificante, y de fitasa y de manera más general en base a la capacidad para determinar características sensoriales óptimas.

Las bacterias del ácido láctico de acuerdo con la presente invención, se han depositado el 11 de julio de 2006 en centro de recogida cualificado DSMZ, que asigna para cada bacteria los siguientes números de depósito de acuerdo con la equivalencia siguiente:

Lactobacillus sanfranciscensis LS40 = DSM 18426

L. sanfranciscensis LS41 = DSM 18427

Lactobacillus rossiae LR15 = DSM 18428

50 *Lactobacillus rossiae* Ci35 = DSM 18429

Lactobacillus plantarum CF1 = DSM 18430

Lactobacillus curvatus 1Hd = DSM 18431

Lactobacillus farciminis 2XA3 = DSM 18432

Sin embargo, tras el envío a DSMZ se ha comunicado a la agencia que realmente las denominaciones correctas de *Lactobacillus dcurvatus* 1 Hd y *Lactobacillus farciminis* 2XA3 son *Lactobacillus brevis* 1Hd y *Pediococcus pentosaceus* 2XA3.

5 Por lo tanto, en el resto de la descripción, las bacterias de la invención *Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, *L. sanfranciscensis* LS41, *Lactobacillus rossiae* LR15, *Lactobacillus rossiae* Ci35, *Lactobacillus plantarum* CF1, *Lactobacillus brevis* 1Hd, *Pediococcus pentosaceus* 2XA3 se denominarán de ahora en adelante respectivamente *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427), *Lactobacillus rossiae* (DSM 18428), *Lactobacillus rossiae* (DSM 18429), *Lactobacillus plantarum* (DSM 18430), *Lactobacillus brevis* (DSM 18431), *Pediococcus pentosaceus* (DSM 18432).

10 En particular, se ha seleccionado la siguiente mezcla para utilizarla en forma de "levadura natural": *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427) y *Lactobacillus plantarum* (DSM 18430). La Figura 1 muestra las secuencias parciales de los genes del ARNr 16S de *L. sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427) y *L. plantarum* (DSM 18430), obtenidas por amplificación por PCR utilizando el cebador LpigF / LIPR

15 (TACGGGAGGCAGCAGTAG / CATGGTGTGACGGGCGGT, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 respectivamente).

Un protocolo de propagación de "levadura natural" implica la propagación de la misma durante 8-24 h en una masa que consiste en ingredientes sin gluten y su utilización sucesiva ha sido estandarizada y optimizada, con diversos porcentajes de acuerdo con las características deseadas, como iniciador natural o ingrediente para una fermentación corta (aproximadamente 1-3 horas) antes de la cocción del pan.

20 El proceso de fermentación que utiliza "levadura natural" de acuerdo con la presente invención permite (i) una posible detoxificación (aproximadamente 300 ppm) del gluten presente como un contaminante en los ingredientes sin gluten, (ii) aumentar en 3-10 veces, dependiendo de la dosis y el tipo de utilización, la concentración de aminoácidos libres si se compara con el uso de levadura de cerveza como agente para la fermentación, mejorando así el valor nutricional del pan, (iii) se caracteriza por una actividad fitasa aproximadamente 10 veces mayor que si se utiliza levadura de cerveza como agente para la fermentación, aumentando por lo tanto la biodisponibilidad de las sales minerales en el pan como se demuestra en referencia a Ca²⁺ y Zn²⁺ utilizando espectrofotometría de absorción atómica; (iv) permite mejorar las propiedades sensoriales, en comparación con el uso de levadura de cerveza como agente para la fermentación, al conferir un sabor y aroma típicos de pan tradicional, y (v) determina una mejor vida útil del pan evitando el uso de agentes conservantes químicos. Además, la mezcla de cepas de acuerdo con la presente invención muestra un tipo de actividad peptidasa y una potencia de acidificación mucho mayor que la obtenida con *L. fermentum* utilizado en la técnica anterior. Las actividades enzimáticas de la mezcla de acuerdo con la presente invención tienen la ventaja nutricional de favorecer una mayor liberación de aminoácidos, aumentando así la disponibilidad nutricional de los mismos; liberan una mayor cantidad de precursores de compuestos volátiles generados durante el proceso de cocción y son responsables del aroma típico del pan; y contribuyen en la detoxificación de posibles trazas de gluten, como contaminante de producto sin gluten.

35 *Lactobacillus rossiae* (DSM 18429), y (DSM18428), *Lactobacillus brevis* (DSM 18431) y *Pediococcus pentosaceus* (DSM 18432) se pueden utilizar en diversas formulaciones que difieren, al compararlas con la mezcla anterior, principalmente desde el punto de vista sensorial.

40 Por tanto, es un objeto específico de la presente invención una mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico para la fermentación de harinas sin gluten que comprende o consiste en por lo menos dos, preferiblemente por lo menos tres cepas de bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 18426), *Lactobacillus rossiae* (DSM 18429), *Lactobacillus plantarum* (DSM 18430), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427), *Pediococcus pentosaceus* (DSM 18432), *L. rossiae* (DSM 18428) y *Lactobacillus brevis* (DSM 18431).

45 Según las realizaciones preferidas, se pueden utilizar las mezclas siguientes, en proporción igual entre especies o cepas, que comprende o que consiste en *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 18426), *Lactobacillus rossiae* (DSM 18429) y *Lactobacillus plantarum* (DSM 18430), *L. sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427) y *L. plantarum* (DSM 18430), *Pediococcus pentosaceus* (DSM 18432), *L. rossiae* (DSM 18428) y *L. plantarum* (DSM 18430), *Lactobacillus brevis* (DSM 18431), *L. rossiae* (DSM 18429) y *L. plantarum* (DSM 18430), o *L. sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427) y *L. rossiae* (DSM 18429).

50 Según la realización preferida, se pueden utilizar las siguientes mezclas, con la misma proporción entre especies y cepas, que comprenden o consisten en *Lactobacillus rossiae* (DSM 18426) *Lactobacillus rossiae* (DSM 18429) y *Lactobacillus plantarum* (DSM 18430); *L. sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427) y *L. plantarum* (DSM 18430); *Pediococcus pentosaceus* (DSM 18432), *L. rossiae* (DSM 18428) y *L. plantarum* (DSM 18430); *Lactobacillus brevis* (DSM 18431), *L. rossiae* (DSM 18429) y *L. plantarum* (DSM 18430); o *L. sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427) y *L. rossiae* (DSM 18429).

La mezcla de microorganismos según la presente invención se puede utilizar para fermentar harinas sin gluten como, por ejemplo, harinas de maíz, arroz, trigo sarraceno, fécula de tapioca, girasol, lino, teff, sorgo, quinoa, patata, mandioca, amaranto y el mijo. Por ejemplo una composición de harina sin gluten puede comprender 10-30% de fécula de maíz, preferiblemente 12%, 2-10% de fécula de tapioca, preferiblemente 4%, 20-60% de harina de arroz, preferiblemente 32% y 1-10 de harina de trigo sarraceno, preferiblemente 6 %, en donde que dichos porcentajes se expresan como % en peso respecto al peso total de la composición de harina. Para las mezclas que se van utilizar en la preparación de productos de panadería sin gluten se añaden otros ingredientes, como la goma de guar, xantanos, glicerina, inulina, sorbitol hidrolizado, proteína de soja, lecitina de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, azúcar, sal, suero de leche y leche descremada en polvo utilizados en distintos porcentajes (0,5-3,0%) dependiendo del tipo de producto.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una levadura iniciadora (también llamada "levadura natural" de acuerdo con la presente invención en el apartado de experimentación) para productos de panadería sin gluten que comprende las etapas siguientes:

a) propagación del cultivo de la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico como se ha definido anteriormente;

b) mezclar la composición de harina tal y como se ha definido anteriormente en una concentración del 50-65% con 35-50% de agua, conteniendo la mezcla de cepas de bacterias tal como se define en la etapa a) con una densidad de células de aproximadamente 10^8 ufc / g;

c) fermentación durante 8-24 horas a 20-30° C.

Además, el procedimiento puede comprender una etapa d) de secado o congelación de iniciador obtenido en el paso c).

Además la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de productos de panadería sin gluten que comprende las etapas siguientes:

a) amasar la mezcla de harina definida anteriormente en una proporción del 40-60%, preferiblemente 44%, en 10-30% de agua, preferiblemente 26 %, conteniendo 1-3% de levadura de cerveza y 0,1-1, 2% de sal y el inóculo iniciador fresco, obtenible de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, y que comprende la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico definida anteriormente en una cantidad de 5 a 30%, preferiblemente 30% (cuando el porcentaje es menor del 30%, las cantidades de harina y el agua se incrementan proporcionalmente), o seco, como ingrediente sin actividad fermentadora, o congelado con actividad fermentadora, siendo dichos porcentajes, porcentajes en peso con respecto al peso total de la masa;

b) dejar fermentar durante aproximadamente 1-3 horas a 30° C;

c) cocer durante 50 minutos a 22° C.

Otro objeto de la presente invención es una mezcla iniciadora que se obtiene utilizando el procedimiento definido anteriormente. Además, la presente invención se refiere a productos horneados que se pueden obtener utilizando el procedimiento definido anteriormente y que comprende la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico definida anteriormente. Además, la presente invención se refiere a productos de panadería obtenibles utilizando el procedimiento definido anteriormente, como, por ejemplo, pan, y que comprende la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico definida anteriormente

La presente invención se describirá ahora a modo de ilustración y no limitativa, de acuerdo con realizaciones preferidas de la misma, con particular referencia a los dibujos adjuntos:

Figura 1 muestra las secuencias parciales de los genes del 16S rRNA de *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. sanfranciscensis* (DSM 18427) y *Lactobacillus plantarum* (DSM 18430) (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, respectivamente);

Figura 2 muestra el análisis SDS-PAGE de polipéptidos de albúmina y globulina liberados por cepas que pertenecen a las especies *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 18426), *Lactobacillus brevis* (DSM 18431) y *Lactobacillus rossiae* (DSM18428) y (DSM 18429). Cada cepa es representativa de un perfil de hidrólisis. St, estándar, A/G, proteínas no hidrolizadas.

Figura 3 muestra la actividad amino peptidasa de tipo N (a), prolina iminopeptidasa (b), dipeptidasa (c), tripeptidasa (d), prolidasa (e) y prolina (f) de cepas que pertenecen a la especie *Lactobacillus sanfranciscensis*, en los sustratos sintéticos Leu- p-NA, For-p-NA, Leu-Leu, Leu-Leu-Leu, Val-Pro y For-Gly La actividad enzimática se expresa como unidad de actividad (u), que es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol/min de p-nitroanilida o 1 μ mol/min de aminoácido para actividad di-y tri-peptidasa.

Figura 4 muestra ΔpH (diferencia entre los valores de pH inicial y final) (a) y μ_{max} (mayor velocidad de acidificación) (b) de masas fermentadas durante 7 horas a 30° C con cepas pertenecientes a la especie *Lactobacillus sanfranciscensis*.

5 Figura 5 muestra ΔpH (diferencia entre los valores de pH inicial y final) (a) μ_{max} (mayor velocidad de acidificación) (b) de masas fermentadas durante 12 horas a 3° C con formulaciones de las bacterias del ácido láctico seleccionadas.

Figura 6 muestra la concentración de aminoácidos libres totales de las masas fermentadas durante 12 h a 30° C con las formulaciones de bacterias del ácido láctico seleccionadas.

10 Figura 7 muestra el perfil de aminoácidos libre tal como se determina mediante el Analizador de Aminoácidos Biochrom 30 de la masa fermentada durante 12 horas a 30° C con la formulación n° 2 de bacterias del ácido láctico seleccionadas.

15 Figura 8 muestra el protocolo de producción de pan sin gluten por medio de la utilización de "levadura natural" a base de las bacterias del ácido láctico seleccionadas. En la figura, la referencia a la mezcla de harina en términos cuantitativos y cualitativos es puramente indicativa y en la segunda fermentación se considera la adición de otros ingredientes, como se ha especificado anteriormente.

Figura 9 muestra el análisis de los componentes principales (PCA) de los datos obtenidos a partir del análisis sensorial de panes sin gluten obtenidos usando "levadura natural" fresca (formulaciones n°. 1, 2, 4 y 5) en comparación con la levadura de cerveza fermentada control (C).

Ejemplo 1: Selección y análisis de cepas según la presente invención

20 Se propagaron cincuenta y cinco cepas de bacterias del ácido láctico pertenecientes a la Collezione di colture del Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata dell'Università degli Studi di Bari, previamente aisladas de "levaduras naturales", a 30 °C durante 24 h en MRS (RMM) modificado, que contienen, además de los ingredientes normales, 5% de maltosa y 10% de agua de levadura - pH final 5,6. En la Tabla 1 tenemos la lista de especies de bacterias del ácido láctico aisladas a partir de "levadura natural" y utilizadas en la presente invención.

Tabla 1

Especies	Capas
Lactobacillus sanfransiscensis	(DSM 18426), LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15, (DSM 18427)
Lactobacillus rossiae	(DSM 18429), (DSM 18428), LR19, LR13, LR22, LR24, LR25, LR8, LR18, LR20
Lactobacillus plantarum	DC400, (DSM 18430), DB200, 20196, 2MF8, 3DM, G10C3
Lactobacillus brevis	(DSM 18431), 5Z, CR13, AM7, 1D, 2Hb
Lactobacillus pentosus	8CF, 12H5, 12H6, 14H9
Lactobacillus alimentarius	2B
Lactobacillus fermentum	2S1, D13
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	2752, 2756, 2766
Lactobacillus paracasei	12H8, 12H1, 1Hb, 4H3
Lactobacillus curvatus	14H10, 13H5
Pediococcus pentosaceus	(DSM 18432)
Lactobacillus helveticus	B26W
Lactobacillus delbrueckii	B15Z
Lactobacillus gasseri	B24W, B30W
Lactobacillus amylovorus	L. amylovorus

Las bacterias del ácido láctico preferidas según la invención *L. sanfransiscensis* (DSM 18426), *L. sanfransiscensis* (DSM 18427) y *L. plantarum* (DSM 18430) se han caracterizado por la secuencia, como se ilustra en la figura 1.

5 (1) Actividad proteolítica

La selección basada en la actividad proteolítica se ha llevado a cabo utilizando células cultivadas durante 24 h, recogidas por centrifugación (10.000 g X 10 min, 4° C, lavadas dos veces en tampón fosfato 50 mM, pH 7,0 y suspendidas de nuevo en el mismo tampón de densidad óptica 2,5 (A_{620nm}), correspondiente a una densidad celular de 108 ufc / ml. La actividad proteinasa se ha probado en albúminas y globulinas extraídas de harina de trigo (Weiss, et al., 1993. Electrophoretic characterisation of wheat grain allergens from different cultivars involved in baker's asthma, *Electrophoresis* 14:805 - 816). La mezcla de reacción, que contiene 0,9 ml de la fracción de albúmina-globulina (ca. 4 mg / ml de proteína) y 0,1 ml de suspensión celular, se incubada a 30° C durante 48 h en agitación (150 rpm). La electroforesis monodimensional SDS-PAGE se lleva a cabo según el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680 - 685). La actividades aminopeptidasa de tipo N (PepN) y prolina iminopeptidase (pEPL), se han determinado utilizando sustratos sintéticos, respectivamente, *Leu-p-NA* y *For-p-NA*. La mezcla de reacción comprende: 0,9 ml de tampón fosfato- K 50 mM, pH 7,0 donde se disolvió el sustrato sintético (concentración final 2 mM) y 100µl de suspensión celular. La actividad enzimática, expresada como unidad de actividad (U) 1 corresponde a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol / min de *p-nitroanilida* (Gobbetti et al., 1996. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfransiscensis* CB1: purification and characterisation of a proteinase, dipeptidase, and aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3220 - 3226). Se determinaron prolidasa (PepQ) y prolinasa (PepR) como describen Di Cagno y colaboradores, (Di Cagno et al.,2004. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and starter with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1088 - 1096), en Val-Pro y For-Gly respectivamente. Se determinaron dipeptidasa (Pepv) y tripeptidasa (PepT) de acuerdo con el método Cd-ninidrine (Gobbetti et al., 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratric response surface methodology, *Enzyme Microbial*

Technol 25:795 - 809) utilizando respectivamente Leu-Leu y Leu-Leu-Leu. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de aminoácido/min.

(2) Capacidad de acidificación

5 Se ha llevado a cabo la selección basada en la capacidad de acidificación con 100 g de masa (rendimiento de masa 160) utilizando 62,51 g de una mezcla de harinas, como maíz nativo, maíz blanco, harina de arroz y harina de trigo sarraceno, en una proporción en peso de 15, 15, 65 y 5%, y 37,5 ml de agua que contiene una suspensión celular de bacterias del ácido láctico individuales con una densidad celular final de 10^8 ufc / g de masa. La cinética de acidificación de la masa se ha detectado en la línea midiendo el pH (pH-metro 507, Crison, Italia). Los datos se han procesado utilizando la ecuación de Gompertz modificada por Zwietering y colaboradores (Zwietering et al., 1990. Modelling of bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56: 1875-1881).

(3) Detoxificación del Gluten

15 Se han llevado a cabo pruebas de detoxificación del gluten en 100 g de masa (rendimiento de masa 160) utilizando 62,51 g de mezcla de harina, como maíz nativo, maíz blanco, harina de arroz y harina de trigo sarraceno, en una proporción de 15, 15, 65 y 5%, y 37,5 ml de agua que contiene suspensiones celulares de las bacterias del ácido láctico seleccionadas para una mayor actividad proteolítica (*Lactobacillus sanfranciscensis* (DSM 18426), (DSM 18427), *Lactobacillus rossiae* (DSM 18429), (DSM 18428), *Pediococcus pentosaceus* (DSM 18432) y *Lactobacillus brevis* (DSM 18431)) con una densidad celular final de 10^8 ufc/g de masa. Se añade una cantidad de gluten de 500 o 1000 ppm a la masa. Se producen dos masas control que contienen, respectivamente, 500 y 1000 ppm de gluten, y 0,15 g de NaN_3 (p / p), sin inóculo bacteriano y acidificadas químicamente a pH 3,6. Las masas se incuban a 30° C durante 5, 24 y 48 h. Al final de la fermentación, se utiliza la prueba ELISA para la cuantificación del gluten (Transia Plate, Difchamb).

(4) Caracterización de las masas fermentadas

25 Se han utilizado las bacterias del ácido láctico seleccionadas en cinco formulaciones diferentes empleadas en la producción de masa a base de una mezcla de harina que consiste en maíz nativo, maíz blanco, harina de arroz y harina de trigo sarraceno (Tabla 2).

Tabla 2

Formulación "Levadura natural"	Especies
1	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> (DSM 18426) <i>Lactobacillus rossiae</i> (DSM 18429) <i>Lactobacillus plantarum</i> (DSM 18430)
2	<i>L. sanfranciscensis</i> (DSM 18426) <i>L. sanfranciscensis</i> (DSM 18427) <i>L. plantarum</i> (DSM 18430)
3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (DSM 18432) <i>L. rossiae</i> (DSM 18428) <i>L.s plantarum</i> (DSM 18430)
4	<i>Lactobacillus brevis</i> (DSM 18431) <i>L. rossiae</i> (DSM 18429) <i>L. plantarum</i> (DSM 18430)
5	<i>L. sanfranciscensis</i> (DSM 18426) <i>L. sanfranciscensis</i> (DSM 18427) <i>L. rossiae</i> (DSM 18429)

30 Las masas producidas como se indica anteriormente se han incubado durante 24 horas a 30° C. Se utilizó como control una masa sin inóculo bacteriano, fermentada utilizando levadura de cerveza (1,5%) durante 2 h a 30° C. La caracterización de las masas fermentadas con las diferentes formulaciones y el control correspondiente incluye: (i) la cinética de acidificación (Zwietering et al, 1990. Modelling of bacterial growth curves. *Appl Environ Microbiol* 56: 1875-1881), (ii) la determinación de ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético D-y L-) producidos durante la fermentación por medio de kits enzimáticos (DHFF CHAMB Italia Srl, Italia) (iii) la densidad de células por recuento en placa de agar mMRS (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), (iv) la actividad fitasa mediante detección de

ortofosfato inorgánico liberado, utilizando el método descrito por Fiske y Subbarow (Fiske y Subbarow, 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375) y Shimizu 1992. Purification and characterisation of phytase from *Bacillus subtilis* (Natto) n-77. *Biosci. Biochem.* 56:1266 - 1269), y (v) la determinación del contenido total de aminoácidos por medio del "Analizador de Aminoácidos Biochrom 30" (Biochrom Ltd, Cambridge, Reino Unido), usando una columna de intercambio catiónico (alimentos oxidados con Na, 20 cm x 4,6 mm).

(5) Producción de pan sin gluten

Las diferentes formulaciones de "levadura natural" seleccionadas se han utilizado para la producción de pan sin gluten considerando diversas soluciones tecnológicas. Después de fermentar durante 24 h, se utilizan como (i) iniciador fresco natural mediante inoculación a 5-30% de la masa base consistente en los ingredientes antes indicados o similares (ii) ingrediente (15%) teniendo en cuenta el secado preliminar. La levadura de cerveza (1%) y NaCl (0,3%) se añaden a las masas y se incuban a 30° C durante 2 h antes de la cocción (50 min a 220 °C) en un horno de laboratorio. Se produce un pan control usando masa fermentada con levadura de cerveza (2%) a 30 °C durante 2 h. Se llevaron a cabo las siguientes determinaciones en los panes producidos: (i) análisis del contenido de elementos minerales biodisponibles mediante extracción con agua y posterior determinación por espectrofotometría de absorción atómica, (ii) análisis sensorial mediante la prueba llevada a cabo por un panel de 6 catadores no entrenados (Haglund et al ., 1998. Sensory evaluation of wholemeal bread from ecologically and conventionally grown wheat. *J. Cereal Sci.* 27:199 - 207) y utilizando para cada atributo una escala continua de intensidad creciente en el intervalo de valores de 0 a 100; (iii) análisis del volumen específico y de la dureza de acuerdo con los métodos oficiales AACC 10 a 10 y AACC 74-09 (Approved Association Cereal Chemistry, X Edition, Ed. AACC, St. Paul, Minnesota EE.UU.) y (iv) ensayo de la vida útil mediante la producción de pan a escala industrial, envasado en atmósfera modificada (40% N₂ y 60% de CO₂) y almacenamiento consecutivo durante 6 meses en ausencia de compuestos químicos conservantes.

Resultados

(1) Actividad proteínasa.

La actividad proteínasa, determinada utilizando las albúminas y globulinas como sustrato de hidrólisis, evidencia perfiles de hidrólisis heterogéneos. En la Figura 2 se indican los perfiles de *L. sanfranciscensis* (DSM 18426), *L. brevis* (DSM 18431) y *L. rossiae* (DSM 18428) y (DSM 18429), que son representativos de las actividades proteínasa más notables. Tal actividad enzimática que puede ser complementaria a la de las enzimas endógenas de la harina utilizadas en la producción de alimentos sin gluten constituye el paso inicial en el proceso de degradación de la proteína. Se ensayó la actividad peptidasa en sustratos sintéticos relativamente específicos. En la Figura 3 se indican los resultados relativos a las cepas pertenecientes a las especies *L. sanfranciscensis*. Es posible observar que para todas las actividades enzimáticas consideradas a excepción de la actividad de tipo tripeptidasa, las cepas (DSM 18426) y (DSM 18427) tienen una actividad notablemente mayor que otras cepas. De acuerdo con el mismo criterio se llevó a cabo la selección de cepas que pertenecen a otras especies. La disponibilidad de una Colección de Cultivos para la detección y el gran número de actividades enzimáticas ensayadas constituyen la premisa para obtener cepas seleccionadas generalmente no disponibles. Se seleccionaron *L. sanfranciscensis* (DSM 18426) y (DSM 18427), *L. rossiae* (DSM 18429) y (DSM 18428), *L. brevis* (DSM 18431) y *P. pentosaceus* (DSM 18432) en base a las actividades proteínasa y peptidasa. En particular, una comparativa de las actividades tipo peptidasa de determinadas especies y cepas con las dos cepas de *Lactobacillus fermentum* utilizadas en la selección inicial, indica siempre una mayor actividad peptidasa (40-80% en promedio) para todos los sustratos ensayados.

Las actividades enzimáticas en base a las cuales se ha llevado a cabo la selección puede tener un valor múltiple: (i) para favorecer una mayor liberación de aminoácidos, aumentando así las disponibilidades nutricionales; (ii) para liberar una mayor cantidad de precursores de los compuestos volátiles generados durante el proceso de cocción y responsables del aroma típico pan, y (iii) para contribuir a la detoxificación de posibles trazas de gluten, como contaminante de los productos sin gluten.

(2) Poder de acidificación

El poder de acidificación de los aislados de bacterias del ácido láctico se ha determinado directamente en las masas ácidas fermentadas con un único microorganismo durante 7 horas a 30°C. En la Figura 4 se indican los resultados relativos a las cepas pertenecientes a la especie *L. sanfranciscensis*. Es posible observar que las cepas (DSM 18426), y en particular (DSM 18427) se han caracterizado también por un poder de acidificación bueno, expresado en términos de Δ pH y μ max. La selección de cepas pertenecientes a otras especies se llevó a cabo según el mismo criterio. En particular, se seleccionó *L. plantarum* (DSM 18430) en base a la potencia de acidificación caracterizada por valores de Δ pH superiores a 2,3. Todas las especies o cepas seleccionadas muestran mayor poder de acidificación y velocidad que las determinadas para las dos cepas de *L. fermentum* consideradas en la selección.

55

(3) Detoxificación del Gluten

Se utilizó el conjunto de bacterias del ácido láctico seleccionado en base a la actividad proteolítica inicial de (*L. sanfranciscensis* (18426) y (DSM 18427), *L. rossiae* (DSM 18429) y (DSM 18428), *L. brevis* (DSM 18431) y *P. pentosaceus* (DSM 18432)), para la detoxificación de 500 o 1000 ppm de gluten añadido deliberadamente a las masas sin gluten con el fin de simular la contaminación. Después de 48 h de incubación de las masas se observó una disminución de aproximadamente 40% en presencia de las dos concentraciones de gluten. Tiempos de incubación más cortos, es decir 24 h, muestran porcentajes de detoxificación similares, mientras que una incubación de 5 h no permite una disminución sustancial de las concentraciones de gluten. La combinación de *L. sanfranciscensis* (DSM 18426) y (DSM 18427) y *L. plantarum* (DSM 18430) muestra una actividad de hidrólisis del gluten similar a la de un conjunto que consista en un número mayor de aislados. La misma combinación de bacterias del ácido láctico era adecuada para reducir a un umbral de 20 ppm una concentración inicial de gluten de aproximadamente 300 ppm, que es un valor de contaminación razonable para materiales de partida sin gluten. Una actividad frente al gluten similar puede permitir un uso más seguro de ingredientes sin gluten que implique una descontaminación biológica del gluten durante el proceso de fermentación.

(4) Caracterización de las masas fermentadas

En la Tabla 2, se indican las formulaciones de la "levadura natural" basadas en una selección de bacterias del ácido láctico. Se utilizó cada una de las formulaciones para la fermentación de las masas durante 12 h a 30°C. Se utilizó como control una masa fermentada con levadura de cerveza durante 2 horas a 30°C. Todas las masas producidas después de 12 h de fermentación, alcanzaron siempre valores de Δ pH superiores a 2,4 (pH final de la masa aproximado 3,4) (Figura 4), lo que indica para todas las formulaciones la capacidad de provocar una acidificación notable. En particular, la masa obtenida mediante la combinación nº 5 (*L. sanfranciscensis* (DSM 18426) y (DSM 18427), y *L. rossiae* (DSM 18429)) muestra el valor de Δ pH mayor de 2,6 aproximadamente, mientras la combinación nº 3 (*P. pentosaceus* (DSM 18432), *L. plantarum* (DSM 18430) y *L. rossiae* (DSM 18428)) muestra el valor de Δ pH más bajo igual de 2,45 aproximadamente. En términos de velocidad de acidificación máxima (μ max) las masas obtenidas usando las combinaciones nº 3, 4 (*L. brevis* (DSM 18431), *L. plantarum* (DSM 18430) y *L. rossiae* (DSM 18429)) y 5 muestran el valor de Δ pH más alto de 1,3 h⁻¹ aproximadamente. La potencia de acidificación representa uno de los parámetros a tener en cuenta a la hora de mejorar las características organolépticas del producto fermentado, aunque no siempre la mayor potencia de acidificación va acompañada de una textura y/o aroma del pan buenos, en particular en el caso de la utilización de harina sin gluten. En todas las masas, con la excepción de la masa control, se detectó la presencia de ácido orgánico, en particular, las variaciones fueron las siguientes: L-ácido láctico de 21 a 82 mM, D-ácido láctico 51 a 75 mM y ácido acético de 10 a 30 mM (La Tabla 3 muestra las concentraciones de ácido láctico L y D, ácido acético y el cociente de fermentación de las masas fermentadas durante 12 h a 30°C con formulaciones de las bacterias del ácido láctico seleccionadas).

Tabla 3

Masa	Ácido láctico -L (mM)	Ácido láctico -D (mM)	Ácido acético (mM)	Cociente de fermentación ^c
1	58,0	72,0	25,0	5,2
2	82,0	75,0	30,0	5,2
3	55,0	57,0	10,0	11,2
4	27,0	51,0	20,0	3,9
5	21,0	59,0	25,0	3,2
Control ^{to}	nnd ^b	2,00	0,10	20

^a Masa fermentada a 30 °C durante 2 h con levadura de cerveza

^b nd, no determinado

^c Cociente de fermentación, relación molar entre ácido láctico y ácido acético.

Las concentraciones detectadas de los tres ácidos y la relación de ácido láctico y acético reflejan el perfil metabólico de las bacterias del ácido láctico presentes en la combinación. La proporción de ácido orgánico corresponde a la que se encuentra normalmente en las masas ácidas (igual a 4:1), con la excepción de la masa obtenida con la combinación nº. 3. La concentración de ácidos orgánicos, puede proporcionar información útil sobre la contribución que en términos de aroma se obtendría de bacterias del ácido láctico en el producto terminado. Generalmente, el valor de la relación molar entre ácido láctico y acético, que define el cociente de fermentación, debe tender a valores

muy bajos con el fin de proporcionar la mejor contribución. Todas las masas producidas, con la excepción de la combinación nº 3, muestran un cociente de fermentación óptimo. La densidad celular de las masas producidas después de fermentar durante 12 h es de 9,1 a 9,47 Log₁₀ ufc/g de masa. Con el fin de estimar la contribución que el uso de la levadura natural puede proporcionar desde un punto de vista nutricional como la biodisponibilidad mineral en el pan, las masas obtenidas con las cinco combinaciones indicadas se han caracterizado por su actividad fitasa. En la Tabla 4, se indican los valores de actividad fitasa de las masas fermentadas durante 12 h a 30°C con las formulaciones de bacterias del ácido láctico seleccionadas, expresada como absorbancia a 700 nm.

Tabla 4

Masa	Actividad fitasa
1	0,008
2	0,053
3	0,040
4	0,061
5	0,048
Control 1a	0,002
Control 2b	0,003
Control 3c	0,002

10

^aControl 1: masa sin inóculo bacteriano fermentada durante 2 h a 30°C con 1% de levadura de cerveza.

^bControl 2: masa sin inóculo bacteriano fermentada durante 2 h a 30°C con 0,5% de levadura de cerveza.

^cControl 3: masa sin inóculo bacteriano fermentada durante 2 h a 30°C con 0,25% de levadura de cerveza .

15

Con la excepción de la formulación 1, todas las demás (en particular las combinaciones 2 y 4) muestran valores de actividad fitasa aproximadamente 30 veces mayores que la masa control. En la Figura 5 se indica la concentración total de aminoácidos libres, que para las 5 formulaciones de "levadura natural" va de 726,54 a 2415,97 mg/kg de masa. La concentración para la masa control fermentada con levadura de cerveza fue 420,07 (mg / kg). La fermentación durante un tiempo prolongado (24 h) con la formulación 2 dio como resultado una concentración de aminoácidos libres doble a la obtenida después de 12 h de incubación, lo que indica la posibilidad de aumentar el valor nutricional y la digestibilidad del pan fermentado con "levadura natural". En el perfil de aminoácidos de la masa obtenida con la combinación nº 2, hay que destacar la producción de los aminoácidos Arg (178,38 mg / kg), Leu (134,09 mg / kg), Glu (82,45 mg / kg) y Pro (87,30 mg / kg) (Figura 6).

20

(5) Producción de pan sin gluten

25

Se utilizaron las distintas formulaciones de "levadura natural" basadas en las bacterias del ácido láctico seleccionadas para la producción de pan sin gluten según el protocolo biotecnológico indicado en la Figura 8. Las dos alternativas propuestas corresponden a soluciones tecnológicas diferentes. El uso de "levadura natural" fresca como iniciadora del proceso de fermentación (2 horas a 30°C) representa una tecnología tradicional, no cara y que requiere el "refresco" diario de la "levadura natural". Una variante de la utilización de "levadura natural" como tal puede ser la congelación de la misma, con el fin de permitir una conservación más prolongada y el uso sucesivo después de la reactivación. La desecación de la "levadura natural" y el uso directo de la misma como ingrediente permite la fácil conservación, aunque no se encuentre activa en el período de fermentación final (2 horas a 30° C). En cuanto al uso de la levadura de cerveza como agente de fermentación, el uso de 30% de "levadura natural" fresca permite que se obtenga una actividad fitasa aproximadamente 10-30 veces superior durante el proceso de fermentación, dando como resultado un aumento de 21 y 48% aproximadamente del contenido de Ca²⁺ y Zn²⁺ biodisponible respectivamente, y el contenido de aminoácidos libres se incrementa 10 veces aproximadamente. Dependiendo de la proporción de "levadura natural" utilizada, que variará según las características deseadas, sobre todo las sensoriales, los incrementos anteriormente indicados son susceptibles de variación. Así mismo el uso de "levadura natural" congelada, después de la reactivación, muestra las mismas prestaciones que la fresca. Todos los panes obtenidos con las diferentes formulaciones de "levadura natural" basadas en las bacterias del ácido láctico seleccionadas se caracterizan por valores de volumen específico y dureza similares o ligeramente mejores en comparación con el pan control producido sólo con levadura de cerveza. Los panes producidos, se han sometido a análisis sensorial. Los parámetros sensoriales evaluados fueron: elasticidad, color, aroma ácido, sabor ácido, dulzor, sequedad y aroma. Cada parámetro se evaluó según un nivel de intensidad creciente en un intervalo de valores de 0 a 100. Para una evaluación cualitativa del perfil sensorial de cada pan, se trataron los datos obtenidos mediante análisis estadístico de los componentes principales (PCA). Los dos componentes principales indicados en la Figura 9 explican el 73% de la varianza total de la muestra. El eje horizontal (Factor 1) indica la distribución de la tipología

45

de pan, como una función de la evaluación sensorial completa, el eje vertical (Factor 2) expresa la distribución del pan en función de cada parámetro sensorial considerado. Como es evidente a partir de la distribución del pan en el plano definido por los dos componentes principales (Figura 9a), se deduce que las tipologías del pan producido usando "levadura natural" fresca muestran resultados sensoriales muy similares. De la figura 9b resulta claramente evidente que las características sensoriales típicas y apreciadas de aroma, sabor y color se distribuyen en la parte del plano donde se encuentran los panes producidos con "levadura natural", lo que confirma el papel y la contribución de la "levadura natural" en términos de aroma y sabor. Finalmente el pan producido con la formulación 2, se produce a escala industrial, se envasa en atmósfera modificada (40% de N² y 60% de CO²) y se somete a conservación durante 6 meses. Durante todo el período de conservación no se observó el fenómeno de contaminación microbiana (enmohecimiento y pan "pegajoso") sin compuestos químicos conservantes añadidos (por ejemplo, propionato de Ca).

LISTA DE SECUENCIAS

- 15 <110> Giuliani S.p.A.
- <120> Mezcla de bacterias lácticas para la preparación de productos si gluten
- <130> PCT 26904
- 20 <150> RM2006A000369
- <151> 17-08-2006
- <160> 5
- 25 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 18
- 30 <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> Cebador de amplificación LpigF
- 35 <400> 1
- tacgggaggc agcagtag 18
- <210> 2
- <211> 18
- 40 <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> Cebador de amplificación LiPR
- 45 <400> 2
- catggtgtga cgggcggt 18
- <210> 3
- <211> 719
- 50 <212> ADN
- <213> Lactobacillus sanfranciscensis
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 55 <222> (28)..(28)
- <223> "n" es a o c o g o t/u
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 60 <222> (624)..(624)
- <223> "n" es a o c o g o t/u

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (634)..(634)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 5
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (651)..(651)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 10
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (653)..(653)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 15
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (674)..(674)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 20
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (677)..(677)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 25
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (697)..(697)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 30
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (699)..(699)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 35
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (717)..(717)
 <223> "n" es a o c o g o t/u
 40
 <400> 3
 agtccccatt gattccttagt gcttgcanta agatgatttt ggatccgact gagtggcgaa 60
 ctggtgagta acacgtgggt aacctgccca gaagaagggg ataacacctg gaaacagatg 120
 ctaataccgt ataacaaca gaaccacatg gttcctgttt gaaagctggc ctttgtgcta 180
 gtgcttctgg atggaccgc ggcgtattag ctagttgggtg agataatagc tcaccaaggc 240
 aatgatacgt agcagacctg agagggtaat ctgccacaat gggactgaga cacggcccat 300
 actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg acgaaagtct gatggagcaa 360
 cgccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc gtaaaactct gttgtagag aagaacagcc 420
 gtgagagcaa ctgctcacgg tatgacggta tctaaccaga aagtcacggc taactacgtg 480
 ccagcagccg cggtaatcag taggtggcaa acgttgtccg gatttattgg gcgtaaaggg 540
 agcgcagggc gtttattaag tctgatgtga aagccttcgg cttaaccga aaagtgcac 600
 ggaaactgat aaacttgagt gcanaaaagg atantggaac ttcattgtgta ncngtgaaaa 660
 tgcgtaaata tttnaangaa caccagtggc gaaggcngnt atctggtctg taactgnaa 719

- <210> 4
 <211> 743
 <212> ADN
 5 <213> Lactobacillus sanfranciscensis
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6)..(6)
 10 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (32)..(32)
 15 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (552)..(552)
 20 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (565)..(565)
 25 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (595)..(595)
 30 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (598)..(598) o t/u
 35 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (645)..(645)
 40 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (646)..(646)
 45 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (647)..(647)
 50 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (675)..(675)
 55 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (688)..(688)
 60 <223> "n" es a, c, g, o t/u
- <220>
 <221> característica miscelánea

	<222> (705)..(705)	
	<223> "n" es a, c, g, o t/u	
	<220>	
5	<221> característica miscelánea	
	<222> (712)..(712)	
	<223> "n" es a, c, g, o t/u	
	<220>	
10	<221> característica miscelánea	
	<222> (727)..(727)	
	<223> "n" es a, c, g, o t/u	
	<220>	
15	<221> característica miscelánea	
	<222> (734)..(734)	
	<223> "n" es a, c, g, o t/u	
	<220>	
20	<221> característica miscelánea	
	<222> (735)..(735)	
	<223> "n" es a, c, g, o t/u	
	<220>	
25	<221> característica miscelánea	
	<222> (736)..(736)	
	<223> "n" es a, c, g, o t/u	
	<220>	
30	<221> característica miscelánea	
	<222> (738)..(738)	
	<223> "n" es a, c, g, o t/u	
	<400> 4	
	gacgantccc cattgattct tagtgcttgc antaagatga ttttgatcc gactgagtgg	60
	cgaactggtg agtaacacgt gggtaacctg cccagaagaa ggggataaca cctggaaca	120
	gatgctaata ccgtataaca acaagaacca catggttctt gtttgaaagc tggcctttgt	180
	gctagtgctt ctggatggac ccgcggcgta ttagctagtt ggtgagataa tagctacca	240
	aggcaatgat acgtagcaga cctgagaggg taatctgcca caatgggact gagacacggc	300
	ccatactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgaaa gtctgatgga	360
	gcaacgccgc gtgagtgaag aagggttctg gctcgtaaaa ctctgttgtt agagaagaac	420
	agccgtgaga gcaactgctc acggtatgac ggtatctaac cagaaagtca cggctaacta	480
	cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaaactgtg tccggattta ttggcgtaa	540
	aaggagcgc angcggttta ttaantctga tgtgaaagcc ttcgcttaac ccganaantg	600
	catcgaact gataaacttg aatgcaaaaa gggggggggg ggggnntgt gtaccgtaa	660
	attcctaat attnaaagg aacaccantg gcgaaggcgg ctatntggtc tntaaaaaa	720
35	aaacacnccc cctnntncg ggg	743
	<210> 5	
	<211> 749	
	<212> ADN	
40	<213> Lactobacillus plantarum	
	<400> 5	

ES 2 395 391 T3

tttcttccca atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg	60
gctcgtaaaa ctctgttggt aaagaagaac atatctgaga gtaactgttc aggtattgac	120
ggattttaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg	180
gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agcgcgagca ggcggttttt taagtctgat	240
gtgaaagcct tcggctcaac cgaagaagtg catcggaaac tgggaaactt gagtgcagaa	300
gaggacagtg gaactccatg tgtagcgggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt	360
ggcgaaggcg gctgtctggt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagtatg ggtagcaaac	420
aggattagat accctggtag tccataccgt aaacgatgaa tgctaagtgt tggagggttt	480
ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta agcattccgc ctggggagta cggccgcaag	540
gctgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc	600
gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt gacatactat gcaaactaa gagattagac	660
gttccctttc ggggacatgg atacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag	720
atgttggtt aagtcccgca acgagcgca	749

REIVINDICACIONES

1. Mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico para fermentar harinas sin gluten que comprende o consiste en por lo menos dos, preferiblemente por lo menos tres, cepas de bacterias del ácido láctico seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 18426, *Lactobacillus rossiae* DSM 18429, *Lactobacillus plantarum* DSM 18430, *L. sanfranciscensis* DSM 18427, *Pediococcus pentosaceus* DSM 18432, *L. rossiae* DSM 18428 y *Lactobacillus brevis* DSM 18431.
2. Mezcla según la reivindicación 1, que comprende o consiste en *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 18426, *Lactobacillus rossiae* DSM 18429 y *Lactobacillus plantarum* DSM 18430.
3. Mezcla según la reivindicación 1, que comprende o consiste en *L. sanfranciscensis* DSM 18426, *L. sanfranciscensis* DSM 18427 y *L. plantarum* DSM 18430.
4. Mezcla según la reivindicación 1, que comprende o consiste en *Pediococcus pentosaceus* DSM 18432, *L. rossiae* DSM 18428 y *L. plantarum* DSM 18430.
5. Mezcla según la reivindicación 1, que comprende o consiste en *Lactobacillus brevis* DSM 18431, *L. rossiae* DSM 18429 y *L. plantarum* DSM 18430.
6. Mezcla según la reivindicación 1, que comprende o consiste en *L. sanfranciscensis* DSM 18426, *L. sanfranciscensis* DSM 18427 y *L. rossiae* DSM 18429.
7. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que las cepas están en la misma proporción con una densidad celular de 10^8 ufc/g aproximadamente al comienzo de la fermentación.
8. Mezcla según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la que las harinas sin gluten se seleccionan entre el grupo que consiste en harinas de maíz, arroz, trigo sarraceno, fécula de tapioca, girasol, lino, teff, sorgo, quinoa, patata, mandioca, amaranto, mijo .
9. Procedimiento para la preparación de un iniciador para productos de panadería sin gluten que comprende las etapas siguientes:
- a) propagación del cultivo de la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico como se define según cada una de las reivindicaciones 1 a 8;
- b) mezclar 50-64% de una composición de harina que comprende o consiste en 10-30% de fécula de arroz, preferiblemente 12%, 2-10% de fécula de tapioca, preferiblemente 4%, 20-60% de harina de arroz, preferiblemente 32%, 1-10% de harina de trigo sarraceno, preferiblemente 6%, donde dichas proporciones se expresan como % en peso respecto del peso total de la composición de harina, y 35-50% de agua que contiene el cultivo de la cepa bacteriana de la etapa a) teniendo una densidad celular de 10^8 ufc/g con la misma proporción entre especies y cepas, donde los porcentajes de la composición de harina y agua que contiene el cultivo de cepas bacterianas son porcentajes en peso respecto al peso de la masa total;
- c) fermentación durante 8-24 horas a 20-30°C.
10. Procedimiento según la reivindicación 9 que comprende además una etapa d) de secado o congelación del iniciador obtenido en la etapa c).
11. Procedimiento para la preparación de productos de panadería sin gluten que comprende las etapas siguientes:
- a) amasar 40-60%, preferiblemente 44%, de una composición de harina que comprende o consiste en 10-30% de fécula de maíz, preferiblemente 12%, 2-10% de fécula de tapioca, preferiblemente 4%, 20-60% de harina de arroz, preferiblemente 32%, 1-10% de harina de trigo sarraceno, preferiblemente 6%, en el que dichos porcentajes se expresan como % en peso respecto al peso total de la composición de harina, 10-30% de agua, preferiblemente 26%, que contiene 1-3% de levadura de cerveza, preferiblemente 2% y 0,1-1,2% de sal y un inóculo iniciador fresco, obtenible utilizando el procedimiento definido según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 y que comprende la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico tal y como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en una cantidad de 5 a 30%, preferiblemente 30%, o seco, como ingrediente sin actividad de fermentación, o congelado con actividad fermentadora, siendo dichos porcentajes en peso referidos al peso total de la masa;
- b) dejar fermentar durante 1-3 horas aproximadamente a 30° C;
- c) cocer durante 50 minutos a 220° C.

12. Composición iniciadora obtenible utilizando el procedimiento definido según las reivindicaciones 9 o 10 y que comprende la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico definida según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

13. Productos de panadería obtenibles utilizando el procedimiento definido según la reivindicación 11 y que comprende la mezcla de cepas de bacterias del ácido láctico definida según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

Lactobacillus sanfranciscensis (DSM18426) (SEQ ID NO:3)

1 agtccccatt gattcttagt gcttgcanta agatgatttt ggatccgact gagtggcgaa
 61 ctggtgagta acacgtgggt aacctgccca gaagaagggg ataacacctg gaaacagatg
 121 ctaataccgt ataacaacaa gaaccacatg gttcttggtt gaaagctggc ctttggctta
 181 gtgcttctgg atggaccgc ggcgtattag ctagtgggtg agataatagc tcaccaaggc
 241 aatgatacgt agcagacctg agagggaat ctgccacaat gggactgaga caggcccat
 301 actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg acgaaagtct gatggagcaa
 361 cgccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc gtaaaactct gttgtagag aagaacagcc
 421 gtgagagcaa ctgctcacgg tatgacggta tctaaccaga aagtacgggc taactacgtg
 481 ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa acgtgtccg gatttattgg gcgtaaaggg
 541 agcgcagcgg gtttattaag tctgatgtga aagccttcgg cttaaccgga aaagtgcac
 601 ggaactgat aaacttgagt gcanaaaagg atantggaac ttcagtgtga ncngtgaaaa
 661 tgcgtaaata tttnaangaa caccagtggc gaaggcngnt atctggtctg taactgnaa

Lactobacillus sanfranciscensis (DSM 18427) (SEQ ID NO:4)

1 gacgantccc cattgattct tagtgcttgc antaagatga ttttggatcc gactgagtgg
 61 cgaactggtg agtaacaegt gggtaacctg cccagaagaa ggggataaca cctggaaca
 121 gatgctaata ccgtataaca acaagaacca catggttctt gtttgaagc tggcctttgt
 181 gctagtgtct ctggatggac ccgcgcgta ttagctagtt ggtgagataa tagctacca
 241 aggcaatgat acgtagcaga cctgagaggg taatctgcca caatgggact gagacacggc
 301 ccatactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccaca atggacgaaa gtctgatgga
 361 gcaacgcgcg gtgagtgaag aagggttctg gctcgtaaaa ctctgttgtt agagaagaac
 421 agccgtgaga gcaactgctc acggtatgac ggtatctaac cagaaagtca cggctaacta
 481 cgtgcccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaaacggtt tccggattta ttgggcgtaa
 541 aagggagcgc ancggttta ttaantctga tgtgaaagcc ttcgcttaac ccganaantg
 601 catcgaaact gataaacttg aatgcaaaaa gggggggggg ggggnntgt gtaccgttaa
 661 attcctaat atttnaaagg aacaccantg gcgaaggcgg ctatntggtc tntaaaaaaa
 721 aaacacnccc cctnntncc ggg

Lactobacillus plantarum (DSM18430) (SEQ ID NO:5)

TTTCTCCCAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAA
 CTCTGTGTGTTAAAGAAGAATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGGATTGACGGTATTAAACCAGAAAGCCA
 CCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGITGTCGGATTATTGGCGTAA
 AGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC
 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
 AGAACACCGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA
 ACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTT
 CAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAA
 TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCTACGGGAAGAACCCTACAGGT
 CTTGACATACTATGCAAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGG
 TTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA

Fig. 1

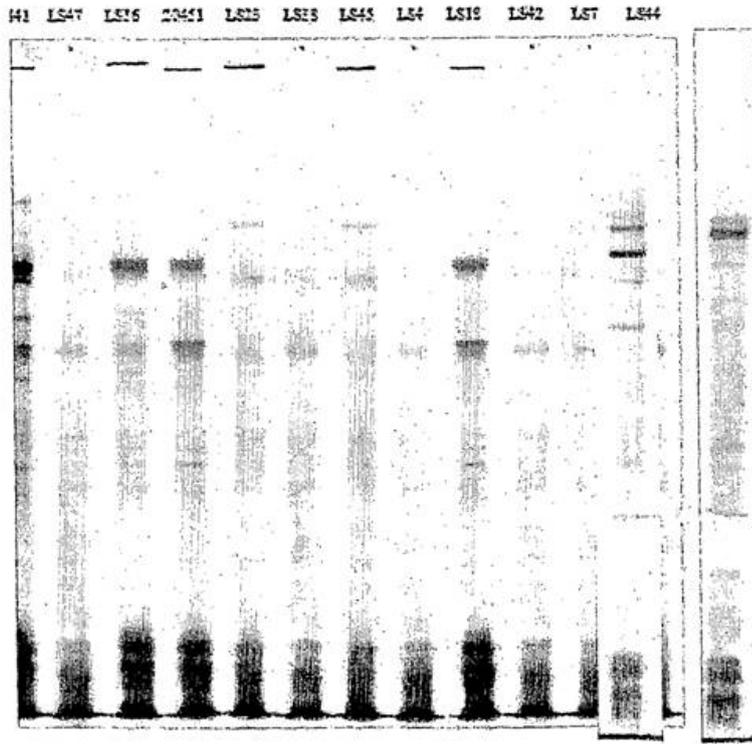


Fig. 2

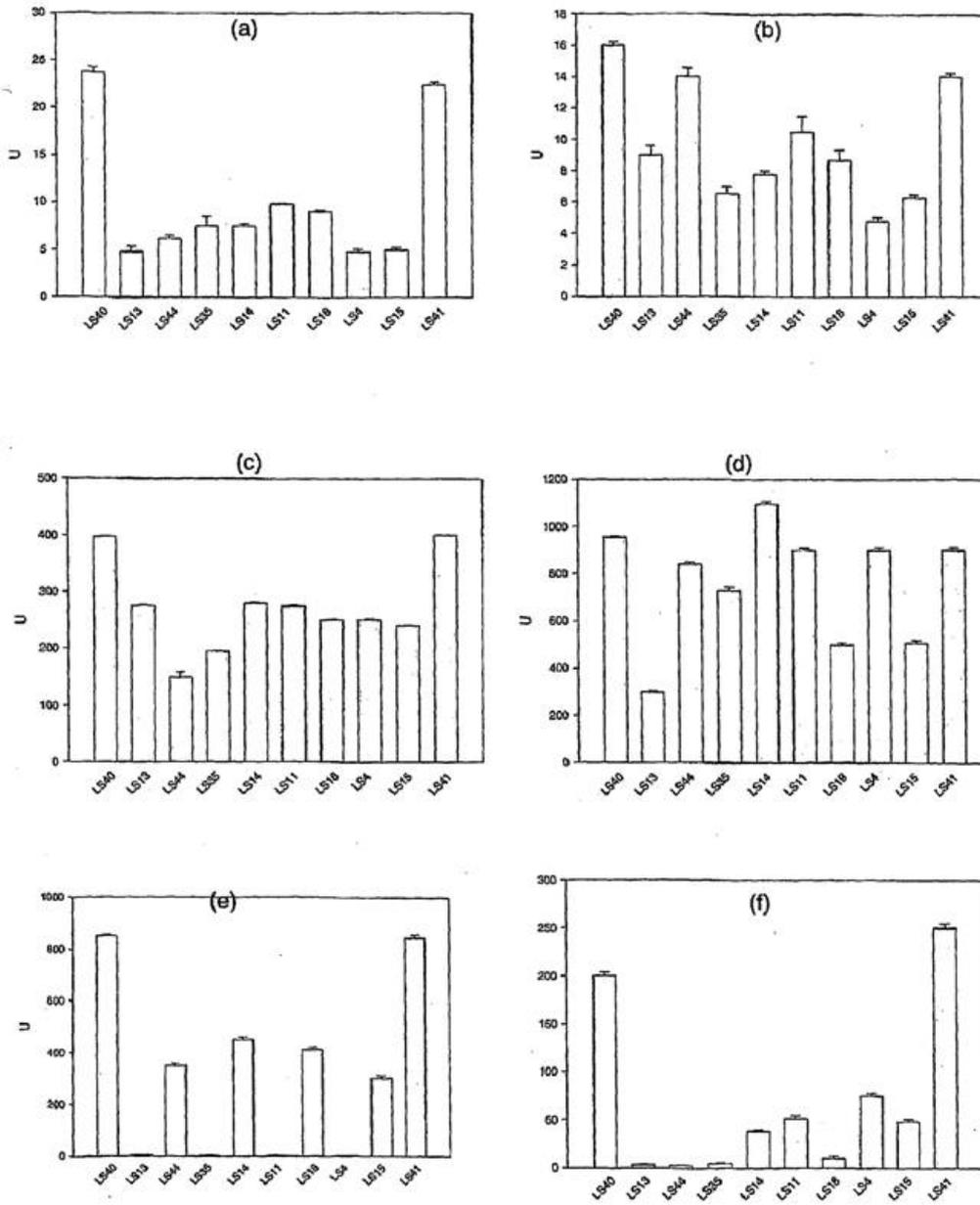


Fig. 3

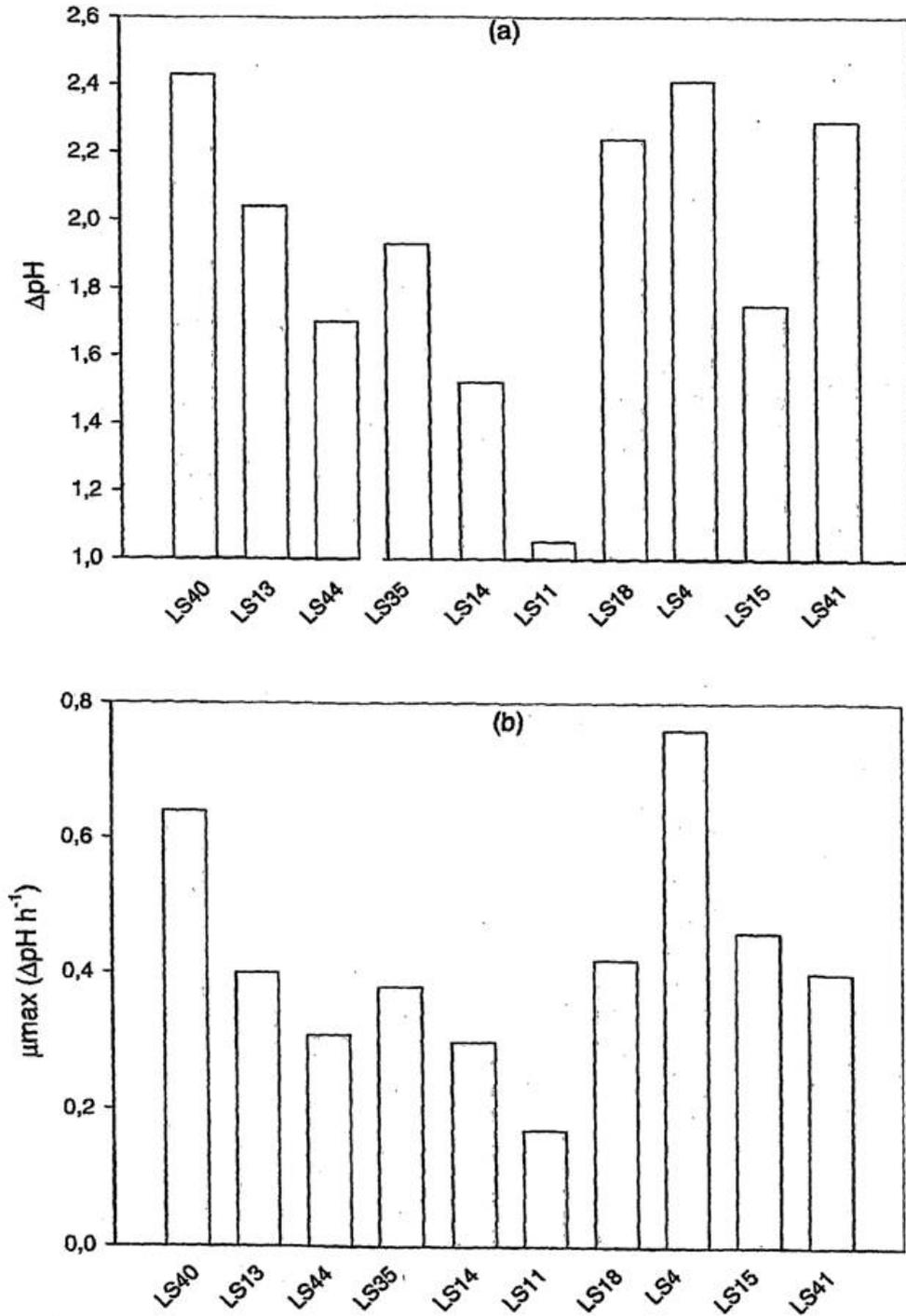


Fig. 4

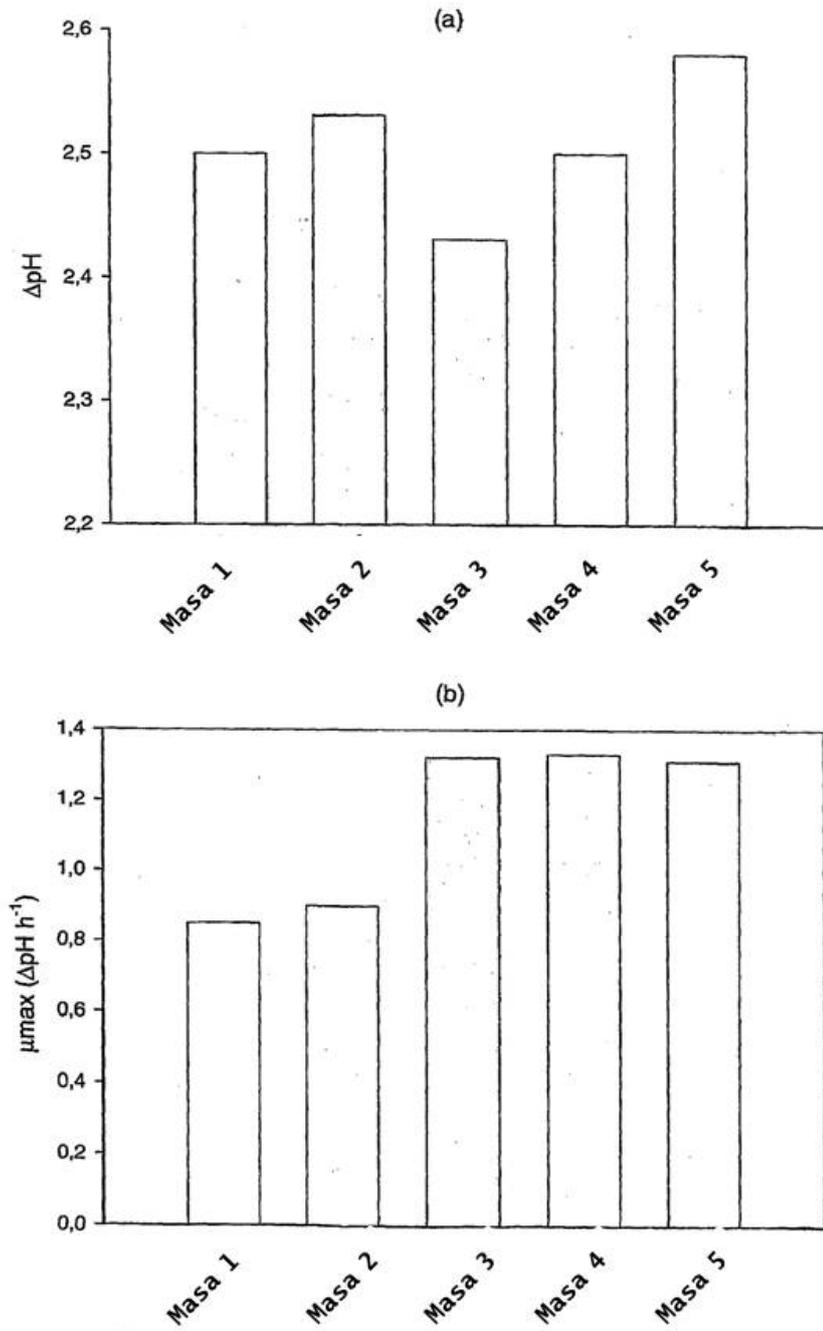


Fig. 5

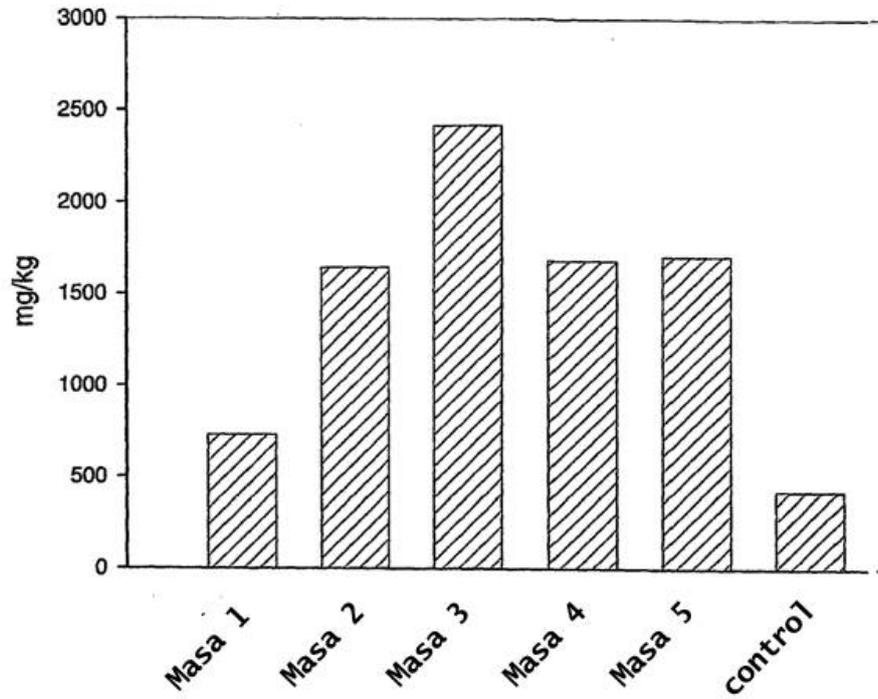


Fig. 6

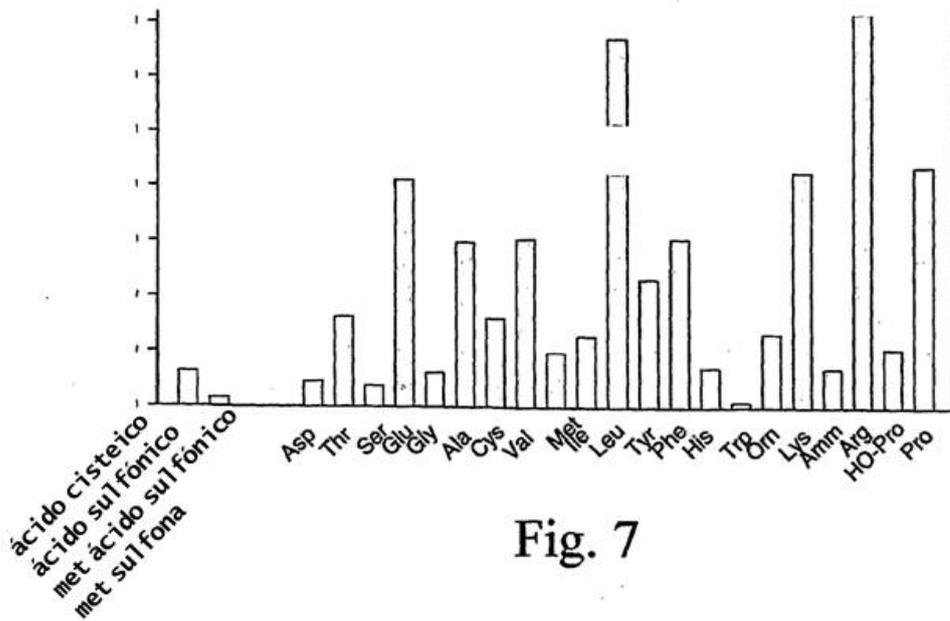


Fig. 7

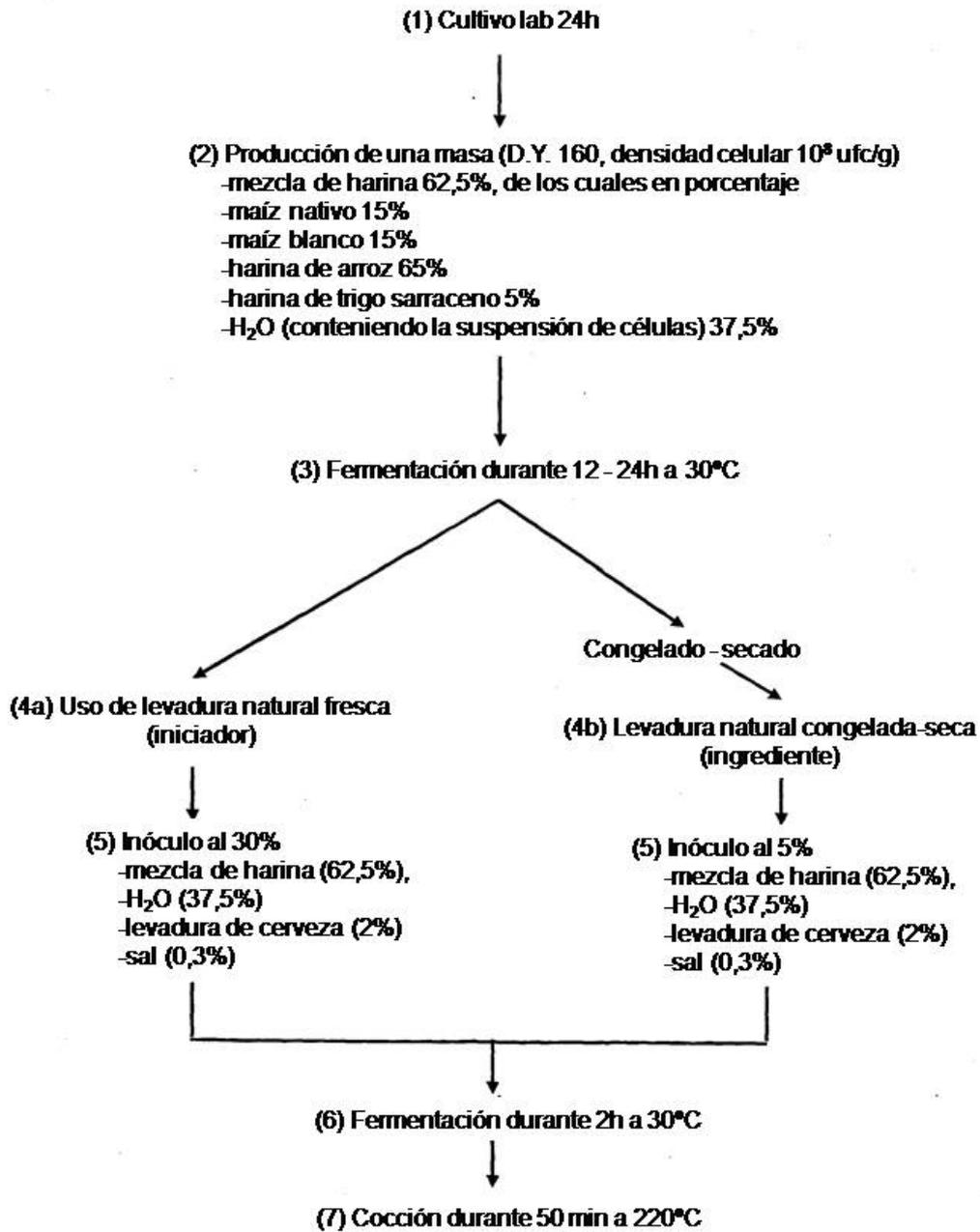


Fig. 8

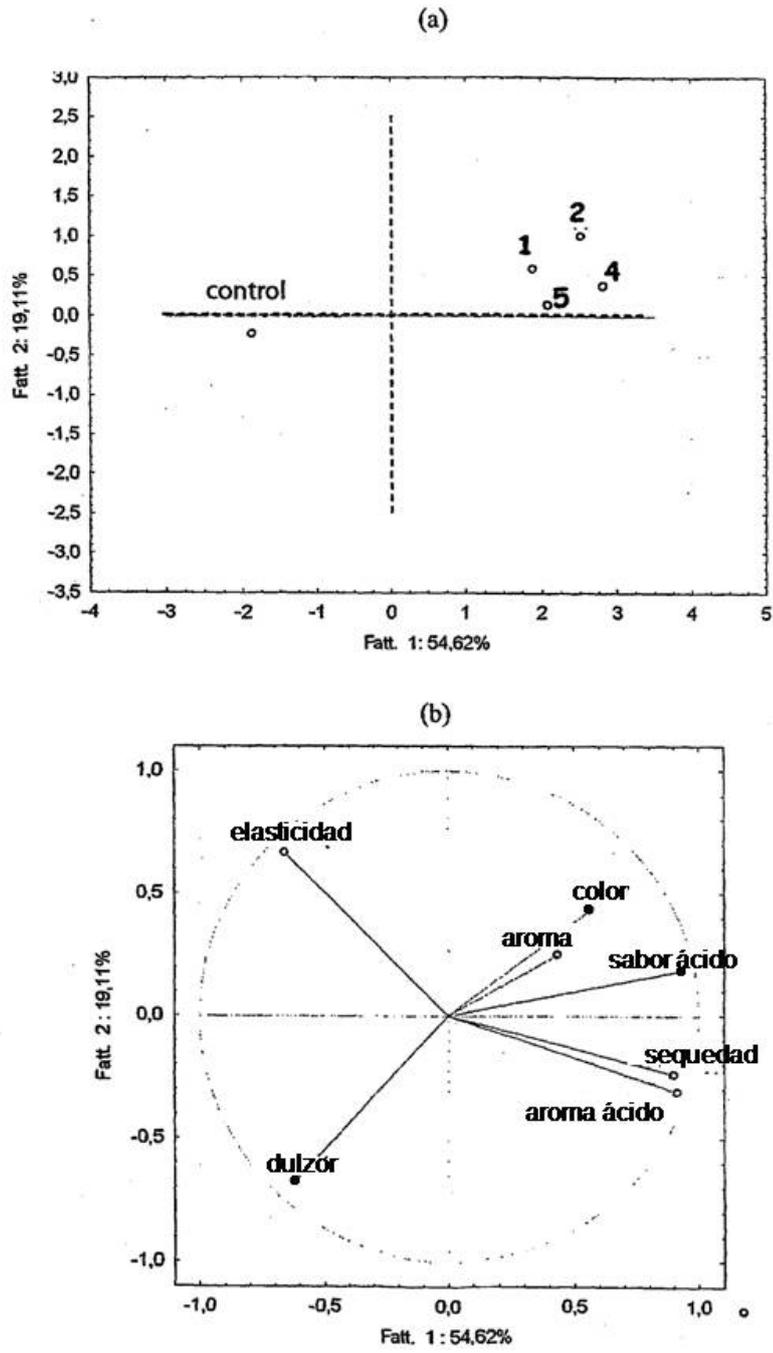


Fig. 9

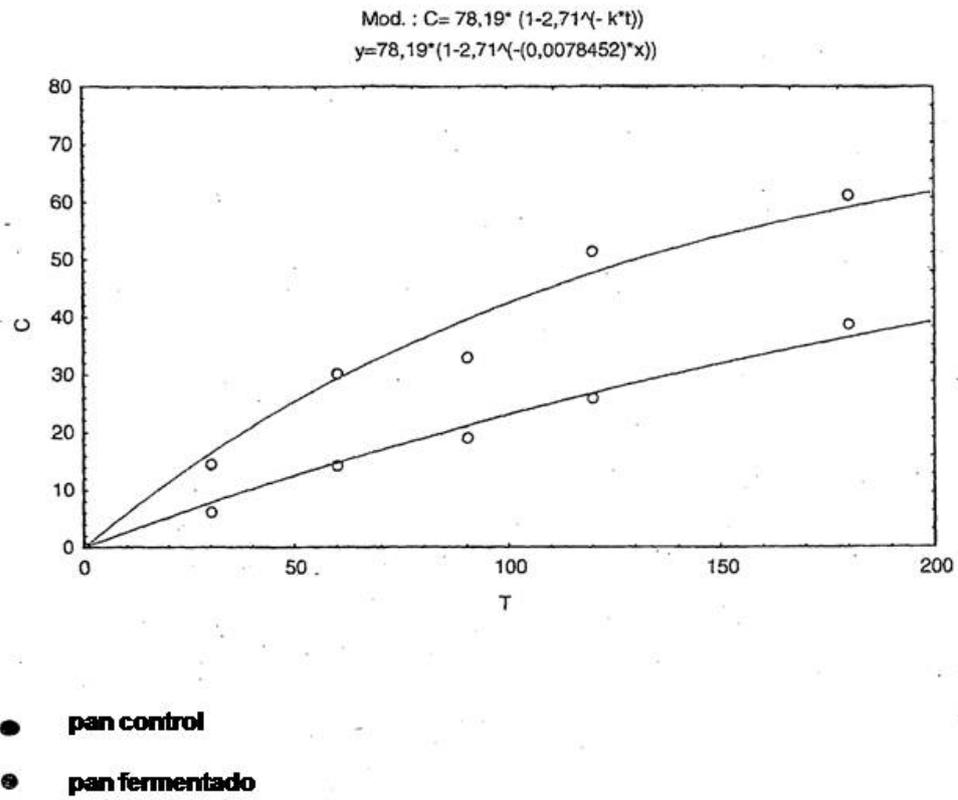


Fig. 10