

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 490**

51 Int. Cl.:

**A21D 8/04** (2006.01)

**A21D 13/06** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

**C12R 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09807504 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 2373173**

54 Título: **Proceso de biotecnología microbiana para degradar completamente el gluten en harinas**

30 Prioridad:

**23.12.2008 IT RM20080690**

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

**06.05.2013**

73 Titular/es:

**GIULIANI S.P.A. (100.0%)**

**Via P. Palagi 2  
20129 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GIULIANI, GIAMMARIA;  
BENEDUSI, ANNA;  
DL CAGNO, RAFFAELLA;  
RIZZELLO, CARLO GIUSEPPE;  
DE ANGELIS, MARIA;  
GOBBETTI, MARCO y  
CASSONE, ANGELA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 402 490 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

Proceso de biotecnología microbiana para degradar completamente el gluten en harinas.

La presente invención trata de una biotecnología microbiana para degradar completamente gluten en harinas. Particularmente, el proceso según la invención implica el uso de bacterias lácticas y proteasas fúngicas seleccionadas usadas rutinariamente para la fabricación de productos horneados fermentados, bajo condiciones de fermentación líquida para la degradación completa del gluten (concentración de gluten residual más bajo de 20 ppm). Las harinas de cereal que resultan del proceso de fermentación se pueden usar como materia prima para la producción de alimentos sin gluten diseñados para ser ingeridos por pacientes celíacos. El proceso biotecnológico propuesto da como resultado diversas ventajas económicas, sociales, nutricionales y sensoriales comparado con procesos de producción actuales de alimentos sin gluten fabricados con ingredientes que naturalmente son sin gluten o como resultado de procesos de extracción.

La epidemiología de intolerancia al gluten o enfermedad celíaca está continuamente en crecimiento. Las últimas encuestas sobre población europea y de Estados Unidos señalan una incidencia de 1/100 individuos afectados (Rewers, 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 seguir rigurosamente una dieta completamente libre de gluten durante toda la vida (Hamer, 2005. Celiac Disease: Background and biotechnical aspects. Biotechnol Advanc 23:401-408). Se conoce, por ejemplo, el uso de bacteria láctica para la preparación de alimentos horneados a partir de harinas sin gluten (More et al. Cereal Chemistry, American Association of Cereal Chemist. Minneapolis, EEUU, vol. 84, nº 4, 1 de enero de 2007, pp. 357-364 y Moore et al., European Food Research and Technology, vol. 226, 6 de junio de 2007, pp. 1309-1316). Sin embargo, la dieta sin gluten también tiene desventajas aparentes. Es muy cara, los productos sin gluten, cuando se compara con productos con base de cereal, presentan calidad sensorial y de almacenamiento más baja, la dieta es difícil de seguir estrictamente y se necesita estar continuamente vigilado por dietistas, que también tengan en cuenta desequilibrios nutricionales (por ejemplo fibras, minerales y vitaminas) como resultado de la completa ausencia de cereales en la alimentación (Grehn et al., 2001. Dietary habits of Swedish adult coeliac patients treated by a 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; Thompson et al., 2005. Gluten-free diet survey: are Americans with celiac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? J. Human. Nutr. Diet. 18: 163-169). Además, en algunos casos (por ejemplo "esprúe refractario") también el seguimiento completo de dieta sin gluten no permite una recuperación completa de la funcionalidad del intestino (Sollid and Khosla, Gastroenterol. Hepatol. 2: 140-147). Tratamientos terapéuticos alternativos de la dieta sin gluten, diversos estudios se han beneficiado de los conocimientos actuales de epítomos tóxicos y han considerado el uso de enzimas microbianas, particularmente prolilendopeptidasas (PEP), para la hidrólisis de estos polipéptidos. Se han propuesto las enzimas microbianas como complementos de la dieta (Shan et al., 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl-endopeptidase: implications for celiac sprue. Biochem. J. 383: 311-318) y/o para detoxificación invitro de gluten (Chem et al., 2003. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PePO2, an endopeptidase with post-proline specificity. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1276-1282; Stepniak et al., 2005. Highly efficient gluten degradation with a newly identified propyl-endoprotease: implications for celiac disease. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 291:G621-G629).

La solicitud de patente WO2008/010252 y Di Cagno et al. (Journal of Food Protection, vol. 71, nº7, 2008, pp. 1491-1495) describe un proceso para la preparación de productos horneados a partir de harinas sin gluten y tiene como objetivo mejorar las características nutricionales, sensoriales y de almacenamiento de estos productos preparados a partir de ingredientes sin gluten. Particularmente, WO2008/010252 describe una mezcla de bacterias lácticas (*Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, y/o *Lactobacillus brevis*) para cultivar productos horneados sin gluten.

Di Cagno et al. describe la detección de cuarenta y seis cepas de bacteria ácido láctica de masa fermentada para actividad proteolítica y velocidad de acidificación de harinas sin gluten. Los cultivos de masa fermentada consisten en *Lactobacillus sanfranciscensis* LS40 y LS41 y *Lactobacillus plantarum* CF1 y se seleccionaron y usaron para la fabricación de pan sin gluten.

Durante las últimas décadas también está cambiando considerablemente la biotecnología de productos horneados con levadura, influenciando los hábitos nutritivos de toda la población que antes estaba sometida a una dieta con base de gluten. Actualmente, los productos horneados con levadura se fabrican mediante procesos tecnológicos extremadamente rápidos (por ejemplo, agentes químicos de levadura o usando levadura de hornear), sustituyendo completamente a los procesos de fermentación largos que usan bacterias ácido lácticas y levaduras salvajes originadas a partir de materias primas, y usadas como "masa de fermentar". Mediante los procesos actuales los componentes de cereal (por ejemplo proteínas) no se someten a ninguna actividad de hidrólisis durante el procesado de alimentos, manteniendo las características de la materia prima (Gobbetti, 1998. The sourdough microflora: interactions between lactic bacteria and yeasts. Trends Food Sci. Technol. 9:267-274). En base a estas consideraciones y beneficiándose del potencial enzimático de una mezcla de bacterias lácticas seleccionadas, diversos estudios (Di Cagno et al., effects on wheat flour by sourdough lactic bacteria: effects on wheat flour proteína fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerante. Appl. Environ. Microbiol. 68:623-633; Di Cagno et

al., 2004. Sourdough bread made from wheat and non toxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *App. Environ. Microbiol.* 70: 1088-1096; Di Cagno et al., 2005. Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *J. Agr. Food Chem.* 53: 4393-4402; De Angelis et al., 2005. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochim. Biophys. Acta.* 1762-80-93) demostraron que el uso de una biotecnología tradicional, basada en el uso de bacteria ácido láctica seleccionada y tiempos de fermentación largos, es posible reducir marcadamente la concentración inicial de gluten en el cereal.

El Codex Alimentarius, adoptado por la OMS (Organización Mundial de la salud) y la FAO (Food and Agricultural Organization), diferencia "productos sin gluten", que contienen ingredientes con concentración de gluten menor de 20 ppm, y "productos fabricados sin gluten", que tienen una concentración de gluten residual menor de 200 ppm. Sin embargo, diversos estudios, que culminan con las directrices según publica "Prolamins Working Group", sugieren que, en ningún caso, se puede mantener un umbral de gluten menor de 20 ppm (Stearn et al., 2001. Analysis and clinical effects of gluten in celiac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 741-747). Un estudio reciente de Rizzello et al. (Rizzello et al., 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4499-4507) considera el uso de una mezcla más compleja que consiste en 10 bacterias ácido lácticas seleccionadas, proteasas fúngicas y tiempos de fermentación largos (48 h a 37°C), bajo condiciones de amasado semilíquido. De acuerdo con análisis electroforéticos, cromatográficos y inmunológicos, el gluten contenido en la harina de trigo se degradó a una concentración menor del umbral de 20 ppm.

Además se conoce la solicitud de patente WO2006/097415 (ó EEUU2008/131556) en la que, análogamente al estudio mencionado anteriormente, se describe un proceso para la degradación de gluten por medio del uso de una mezcla compleja que consiste en al menos seis bacterias ácido lácticas y/o bifidobacterias y tiempos de fermentación largos (24-31 horas). Particularmente, la solicitud de patente anteriormente mencionada describe una mezcla de al menos seis especies de bacterias ácido lácticas y/o bifidobacterias en la fabricación de masa de fermentar sin gluten. La mezcla preferente comprende *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infants*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Sin embargo, el método descrito en este documento no es adecuado para degradar el gluten completamente; por lo tanto, da como resultado la imposibilidad de ser administrado a pacientes celíacos. La figura 1B de la solicitud de patente WO2006/097415, en realidad, muestra que después de la hidrólisis por medio de microorganismos, aún hay puntos claros de gliadinas no degradadas y esto se confirma en la tabla 2, de nuevo a partir del mismo documento, a partir de la que se hace aparente que mientras algunas gliadinas se hidrolizan parcialmente otras no son sensibles al proceso de hidrólisis.

Corsetti et al. (*Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 48, 2000, páginas 3044-3051), describe los efectos de diversas bacterias ácido lácticas de masa de fermentar (por ejemplo, masa de fermentar hecha usando *S. cerevisiae* 141, *Lactobacillus sanfranciscensis* 57 y *L. plantarum* 13) y aditivos (por ejemplo proteasa) sobre la firmeza y dureza del pan.

En base a la bibliografía y datos descritos previamente, algunos problemas parecen ser de mayor preocupación para la fabricación de alimentos sin gluten a partir de harina de cereal detoxificada: (i) para simplificar la composición de bacteria láctica seleccionada para usar para el proceso de degradación; (ii) para reducir considerablemente los tiempos de fermentación haciendo así adecuado para su uso en procesos industriales; (iii) para demostrar la capacidad de la bacteria ácido láctica y enzimas fúngicas de actuar eficazmente sobre pan y harinas de trigo duro que pertenecen a diferentes variedades, y sobre cebada, arroz y avena; (iv) para proporcionar un proceso biotecnológico para la hidrólisis de gluten que permita detoxificar las harinas de cereal para usar para la producción de productos sin gluten; y (v) para demostrar, por medio de ensayos médicos crónicos en vivo, la tolerancia absoluta de pacientes celíacos después de la administración prolongada de productos sin gluten con base de harina de trigo detoxificada.

En vista de lo anterior, se hace aparente por tanto la necesidad de proporcionar materiales y métodos para la preparación de productos horneados sin gluten hechos de harina de cereal detoxificada que no presente, por un lado, las desventajas que aparecen en encuestas de datos bibliográficos económicas, sociales, nutricionales y sensoriales, y por otro lado, las desventajas de los productos sin gluten disponibles comercialmente en la actualidad.

Los autores de la presente invención ven ahora que usando sólo dos bacterias ácido lácticas seleccionadas, en combinación con proteasas fúngicas, los tiempos de fermentación que se necesitan para la degradación del gluten disminuyen de modo remarcado. Además, se probó la capacidad de la bacteria ácido láctica y proteasa fúngica para la completa degradación del gluten a partir de variedades diferentes de pan y trigo duro, harina de cebada, arroz y avena; se proporcionó un protocolo biotecnológico para la producción de diversos productos horneados con levadura a partir de harina de trigo detoxificada; y se demostró la tolerancia absoluta del producto para pacientes celíacos, permitiendo así, de un modo completamente innovador, usar la harina de trigo como un ingrediente para la fabricación de productos horneados con levadura sin gluten.

Las bacterias ácido lácticas según la presente invención pertenecen al género *Lactobacillus* y se aislaron de "masas de fermentar" usadas para la fabricación de panes típicos del sur de Italia. *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12

(depositado como DSMZ N. DSM22063 el 28 de noviembre de 2008) y *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (depositado como DSMZ N. DSM22064 el 28 de noviembre de 2008).

Se estandarizó y optimizó un protocolo biotecnológico que implicaba el uso de bacteria ácido láctica seleccionada y proteasas fúngicas en un proceso de fermentación extremadamente rápido (12-20 h a 30-37°C) de harinas de cereal resuspendidas en agua a 20-50% en peso y sus sucesivos usos, a diversos porcentajes según las características deseadas, como un ingrediente para una fermentación corta (aproximadamente 1-3 h) por medio de levaduras de panadería, para la producción de productos horneados con levadura sin gluten (contenido de gluten residual menor de 20 ppm).

A continuación se muestra un guión del protocolo biotecnológico para la producción de alimentos horneados con levadura a partir de harina de trigo sin gluten detoxificada.

Cultivo, lavado y suspensión en agua de cultivos de bacteria ácido láctica



Mezclado de harina (30%) de grano con agua (70%) que contiene dos bacterias ácido lácticas seleccionadas (densidad de células  $10^8$  cfu/g) y proteasas fúngicas (400 ppm cada una)



Fermentación durante 18 h a 37°C



Mezclado con maíz nativo (10%), harina de arroz (10%), huevo (5%), azúcar (3%), mantequilla (1%) y levadura de hornear (1,5%)



Fermentación durante 1,5 h a 30°C



Hornear a 250°C durante 50 minutos

Según una de las formulaciones posibles, los productos horneados, que contienen 10g equivalentes de gluten inicial, se administraron diariamente a pacientes celíacos durante un periodo de 60 días. Ensayos inmunológicos e histológicos probaron la tolerancia absoluta de la preparación a partir de harina de gluten detoxificada.

Según análisis complementarios que usan técnicas electroforéticas, cromatográficas e inmunológicas, el proceso de fermentación por medio de bacterias ácido lácticas seleccionadas, no usadas en estudios previos, y proteasas fúngicas, según la presente invención, permite: (i) detoxificación completa de gluten (contenido de gluten residual menor de 20 ppm); (ii) producción de harina hidrolizada que consiste en una mezcla de péptidos de bajo peso molecular y, especialmente, aminoácidos (alrededor de 15.000 mg/kg con respecto a <1.000 mg/kg en harina de trigo) que incrementa las características nutricionales con respecto a productos sin gluten convencionales; (iii) marcada reducción de tiempos de proceso comparado con los datos señalados en la bibliografía, haciendo así que dicho proceso sea adecuado para transformación a escala industrial; (iv) producción de productos horneados sin gluten con diferentes formulaciones de ingredientes que implica el uso de harina de trigo detoxificada a diferentes concentraciones (20-50%); y (v) tolerancia absoluta de la preparación para pacientes celíacos después de administración prolongada, según los datos médicos señalados en un primer momento.

Los productos que se obtienen según el proceso de la presente invención presentan ventajas de las propiedades sensoriales, reológicas y químicas que no ofrecen productos de la técnica previa (productos sin gluten obtenidos a partir de harinas naturalmente sin gluten). Los productos según la presente invención, en realidad, mantienen las propiedades nutricionales del gluten contenido en las harinas ofreciendo así mejores características nutricionales comparado con los productos obtenidos de harinas sin gluten.

Además, los productos según la invención están completamente libres de gluten como resultado del proceso de degradación de gluten llevado a cabo por la bacteria ácido láctica de la invención, diferente de productos que se obtienen usando bacteria ácido láctica conocida (WO2006/097415, WO2008/010252). La bacteria ácido láctica según la solicitud de patente WO2008/010252 se usó bajo las mismas condiciones que la bacteria ácido láctica según la presente invención y no eran adecuadas para degradación del gluten, en realidad el contenido de gluten residual está en el orden de alrededor de 6.000-10.000 ppm (figura 5). Por lo tanto dicha bacteria solo se puede usar para descontaminar las trazas de gluten pero no presenta las mismas características de la bacteria según la presente invención.

Con respecto al papel de Rizzello et al. (*Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4499-4507, 2007), la posibilidad de obtener una degradación completa de gluten con tiempos marcadamente más cortos (18 h comparado con 48 h) implica, primeramente, una ventaja tecnológica considerable haciendo el proceso de transformación comparable a los procesos industriales más frecuentes y comunes para productos de horno. Un proceso de fermentación demasiado largo (48 h), además de incrementar los costes tecnológicos, podría presentar riesgos higiénico sanitarios. Además, un proceso de degradación de gluten más rápido inevitablemente da como resultado la producción de una materia prima (harina con gluten completamente hidrolizado) caracterizada por un perfil diferente de aminoácidos libres y, por lo tanto, adecuada para dar como resultado características sensoriales diferentes de productos sin gluten comparado con un proceso más largo caracterizado inevitablemente por cinéticas enzimáticas diferentes.

Por lo tanto es un objeto específico de la presente invención una mezcla que comprende o consiste en bacterias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM 22064 como se describe en la reivindicación 1. La mezcla además puede comprender enzimas proteolíticas fúngicas, como por ejemplo proteasas *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o sus mezclas.

Es un objeto más de la presente invención el uso como se definió anteriormente de la mezcla como se describe en la reivindicación 4 para la degradación completa del gluten tanto en pan como en harinas de trigo duro, cebada, arroz y avena.

La presente invención además se refiere a un proceso para la preparación de una masa de harina líquida, como se describe en la reivindicación 6, con gluten completamente degradado adecuada para la producción de productos sin gluten con levadura que comprende o consiste en las siguientes etapas:

- a) cultivo que propaga las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM 22064;
- b) mezcla de la harina a concentraciones de 20-50%, preferentemente 30%, y agua a concentración de 50-80%, preferentemente 70%, que contiene la mezcla de dos bacterias de la etapa a) a una densidad celular de alrededor de  $10^8$  cfu/g;
- c) añadir una o más proteasas fúngicas a concentración de 200-500 ppm, preferentemente 400 ppm;
- d) fermentar durante 8-20 h, preferentemente 12 h, a 30-37°C.

Además el proceso puede comprender una etapa e) de secado de la masa líquida obtenida en la etapa d). Entre las harinas adecuadas para usar en el proceso hay tanto pan como harinas de trigo duro, cebada, arroz, avena y sus mezclas, preferentemente pan y trigo duro.

Se pueden seleccionar enzimas fúngicas proteolíticas a partir del grupo que consiste en proteasas *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o sus mezclas.

Por lo tanto, la invención también se refiere a masa de harina líquida o seca según se describe en la reivindicación 10 donde el gluten está completamente degradado según el proceso anteriormente definido.

Es un objeto más de la invención una mezcla como se describe en la reivindicación 11 que comprende o consiste en masa como se definió anteriormente en combinación con una o más harinas naturalmente sin gluten, como por ejemplo, las seleccionadas de grupo que consiste en harinas de maíz nativo, maíz blanco, arroz, quínoa, teff o amaranto, y alforfón. Particularmente, se pueden usar las harinas anteriormente mencionadas según los siguientes porcentajes: maíz nativo 5-15%, preferentemente 10%, maíz blanco 5-15%, preferentemente 10%, arroz, quínoa, teff o amaranto 10-30%, preferentemente 20%, y harina de alforfón 1-10%, preferentemente 5%, donde dichos porcentajes se expresan en peso en base al peso total de la composición de harina. Otros ingredientes que se pueden añadir a la formulación de productos horneados sin gluten en base a harina de trigo detoxificada son, por ejemplo, azúcar, mantequilla, huevo y nata líquida animal.

Es un objeto más de la presente invención un proceso para la preparación de productos horneados con levadura, según se describe en la reivindicación 14, mediante el uso de una harina de gluten detoxificada según el proceso definido anteriormente que comprende o consiste en las siguientes etapas:

- a) añadir una mezcla de harinas naturalmente sin gluten a 10-40%, preferentemente 30%, levadura de hornear 1-2%, sal 0,1-1,0% y agentes estructurantes 0,5-1% a masa de harina líquida con gluten detoxificada usando el proceso según se definió anteriormente y amasar;
- b) permitir que se de la fermentación durante aproximadamente 1-3 h, preferentemente 1,5 h, a 30°C;
- 5 c) hornear durante 50 minutos a 220°C. Cuando la masa de harina con gluten detoxificada se seca, la proporción entre el ingrediente y agua será aproximadamente 1,2:0,8.

Se pueden seleccionar las harinas naturalmente sin gluten a partir del grupo que consiste en harina de maíz nativo, maíz blanco, arroz, quínoa, teff, amaranto, alforfón o sus mezclas. Por otro lado la harina con gluten detoxificada se puede seleccionar a partir del grupo que consiste tanto en pan como en harina de trigo duro, cebada, arroz, avena y sus mezclas, preferentemente pan o harina de trigo duro.

Por lo tanto, también es un objeto de la presente invención productos horneados con levadura según la reivindicación 18 que se obtienen por medio del proceso definido anteriormente.

Un objeto más de la presente invención es el proceso para la preparación de productos horneados con levadura según se describe en la reivindicación 19 que comprende o consiste en las siguientes etapas:

- 15 a) añadir directamente maíz nativo, harina de arroz, huevo, azúcar, mantequilla y levadura de hornear a masa de harina con gluten detoxificada según el proceso definido anteriormente y amasar;
- b) permitir que se de la fermentación durante 1,5 h a 30°C y
- c) hornear la masa con levadura durante 50 minutos a 250°C.

Particularmente, en la etapa a) el % de ingredientes es como sigue: maíz nativo 10%, harina de arroz 10%, huevo 5%, azúcar 3%, mantequilla 1% y levadura de hornear 1,5%.

Por lo tanto, los productos horneados con levadura según se describe en la reivindicación 21 por medio del proceso según se describió anteriormente constituye un objeto de la presente invención.

Un objeto más de la presente invención es también el uso de los productos según la presente invención, es decir masa de harina, mezcla de la masa con harinas sin gluten, productos horneados con levadura, productos horneados con levadura adecuados para cubrir desequilibrios nutricionales que resultan de una dieta sin gluten, según se describe en la reivindicación 22.

Finalmente, las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM 22064 representan un objeto de la presente invención, según las reivindicaciones 23 y 24.

La presente invención se describirá ahora de un modo ilustrativo, pero no limitante según sus realizaciones preferentes, con particular referencia a los dibujos incluidos.

La figura 1 muestra aminopeptidasa tipo N (PepN), dipeptidasa (PepV) y tripeptidasa (PepT) (a), y prolina iminopeptidasa (PepI), prolidasa (PepQ), prolinasa (PepR), dipeptidil peptidasa (PepX) (b) actividades de *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) y *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064), sobre sustratos sintéticos Leu-p-NA, Leu-Leu, Leu-Leu-Leu y Pro-p-NA, Val-For-Gly y Gly-For-Wing, respectivamente. La bacteria ácido láctica usada en el estudio de Rizzello et al. (Rizzello et al., 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4499-4507) se empleó como control: *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, *Lactobacillus hilgardii* 51B y *L. sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 y LS47. La actividad enzimática se expresó como unidades de actividad (U), es decir cantidad de enzima necesaria para libera 1 µmol/min de p-nitroanilina o 1 µmol/min de aminoácido para las actividades sobre diferentes sustratos de p-nitroanilina.

La figura 2 muestra perfiles electroforéticos bidimensionales de diversas variedades de trigo duro (Stevo y Duilio) antes y después del tratamiento con bacterias ácido lácticas seleccionadas y proteasas fúngicas.

La figura 3 muestra la composición de proteína de harina de trigo antes y después del proceso de hidrólisis mediante bacterias ácido lácticas seleccionadas y proteasa fúngicas.

La figura 4 muestra actividades de aminopeptidasa (A), prolina aminopeptidasa (B) y prolil-dipeptidil aminopeptidasa (3) de bacterias ácido lácticas usadas según la patente WO2008/010252 (*Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 y LS41) y la presente invención [*L. sanfranciscensis* DPPMA12, (DSM22063) y *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064)]. Los acrónimos 15M, 14G, 7A, 51B, LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 y LS47 señalan los biotipos según se usan en la publicación de Rizzello et al., 2007.

La figura 5 muestra la concentración de gluten residual (ppm) en masas fermentadas con *Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 y LS41 (WO2008/010252) y con *L.*

*sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) y *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064) durante 12 horas a 37°C.

5 La figura 6 muestra la concentración de aminoácidos libres totales (mg/kg) en masa fermentada usando diferentes combinaciones de bacteria láctica según la patente WO2008/010252 (msa 1, 2, 3, 4 y 5) y masa de harina de trigo fermentada con dos bacterias ácido lácticas (DDPPMA12 y DPPMA125) de la presente invención.

La figura 7 muestra el análisis del componente principal (ACP) de los datos obtenidos a partir de análisis sensorial de panes (1, 2, 4 y 5) según la patente WO2008/010252 y pan (DPPMA12 y DPPMA125) obtenido usando harina de trigo detoxificada según la invención.

Ejemplo 1: actividad de peptidasa de bacteria ácido láctica seleccionada.

10 Se propagó *L. sanfranciscensis* DPPMA12 y *L. plantarum* DPPMA125 de la colección de cultivos del Dipartimento di Protezione delle Piante y Microbiología Applicata dell'Università degli Studi di Bari, previamente aislados de "masa madre", a 30°C durante 24 horas en MRS modificado (mMRS), que contenía, además de los ingredientes usuales, 5% de maltosa y 10% de agua de levadura, pH final 5,6. Como control para actividades de peptidasa de bacteria ácido láctica usada en la reciente publicación de Rizzello et al. (Rizzello et al., 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4499-4507) se usó: *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, *Lactobacillus hilgardii* 51B y *L. sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 y LS47.

15 Las células cultivadas durante 24 h, se recogieron por centrifugación (10.000 rpm, 4°C), se lavaron dos veces en tampón fosfato 50 mM, pH 7,0 y se resuspendieron en el mismo tampón a una densidad óptica de 2,5 ( $A_{620}$  nm), que corresponde con  $10^8$  cfu/ml, se usaron para ensayos enzimáticos. Las actividades de aminopeptidasa tipo N (PepN) y prolina aminopeptidasa (PepI), se determinaron usando sustratos sintéticos Leu-p-NA y Pro-p-NA, respectivamente. La mezcla de reacción consistía en: 0,9 ml de tampón K-fosfato 50 mM, pH 7,0 que contenía sustrato sintético disuelto (concentración final 2 mM) y  $10^8$  de suspensión celular. La actividad enzimática, expresada como unidad de actividad (U), corresponde a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol/min de p-nitroanilina (Gobbetti et al., 1996. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3220-3226). Se determinaron prolidasa (PepQ), prolina (PepR) y dipeptidil-peptidasa (PepX) como se describe en Cagno y colaboradores, (Di Cagno et al., 2004. Sour dough bread made from wheat and nontoxic flours and starter with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients, *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1088-1096) sobre, respectivamente, Val-Pro, Pro-Gly y Gly-Pro-Ala. Se determinó dipeptidasa (PepV) y tripeptidasa (PepT) según el método Cd-nitridina (Gobbetti et al., 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and a won the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic bacteria by quadratic response surface methodology, *Enzyme Microbial Technol* 25: 795-809) usando, respectivamente, Leu-Leu y Leu-Leu-Leu. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol/min de aminoácido.

20 Con propósitos comparativos, la prueba también se repitió para la bacteria ácido láctica descrita en WO2008/010252 (*L. sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 y LS41).

Ejemplo 2: extracción de proteína a partir de harina de trigo y análisis electroforético.

25 Se extrajeron proteínas a partir de harina de trigo según el método descrito por Weiss et al. (Weisset et al., 1993. Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma. *Electrophoresis.* 14: 805-816). Se llevó a cabo análisis electroforético bidimensional de aproximadamente 30  $\mu$ g de fracción de proteína extraída según el método inmobilina-poliacrilamida (De Angelis et al., 2005. *Biochim. Biophys. Acta* 1762: 80-93). Se analizaron cuatro geles para cada fermentación independiente y se normalizaron los datos según el procedimiento propuesto por Bini et al. (Bini et al., 1997. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis.* 18: 2831-2841).

Ejemplo 3: análisis inmunológico y espectrometría de masas MALDI-TOF.

30 Se llevaron a cabo análisis inmunológicos mediante el uso de anticuerpo R5, y pruebas ELISA de sándwich y competitivo (Transia Plate, Diffchamb) (Valdez et al., 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 465-474). El análisis de espectrometría MALDI-TOF se llevó a cabo usando Voyager-De Pro-workstation (PerSeptive Biosystems United Kingdom) según el método indicado por Hernando et al. (Hernando et al., 2003. New strategy for the determination of gliadin in maize or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fractionation of gliadin from maize or rice-prolamins by acid treatment. *J. Mass Spectrom.* 38: 862-871).

35 Se determinó la concentración de proteína según el método Bradford (Bradford, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteína utilizing the principle of proteína-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254). Se determinó la concentración de nitrógeno orgánico según el método Kjeldahl. Se determinó la concentración de aminoácidos libres usando un analizador de aminoácidos (Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, Reino Unido) (Di Cagno et al., 2004. *Appl. Environ Microbiol.* 70: 1088-1096).

Con propósitos de comparación, también se determinó la concentración de aminoácidos libres en masa obtenida usando lactobacilli descrito en la patente WO2008/010252 (*L. sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 y LS41) después de fermentar durante 24 horas a 30°C según los procedimientos que se indican en el protocolo señalado en la figura 8 de dicho documento.

5 Ejemplo 4: fabricación de productos horneados con levadura usando harina de trigo detoxificada.

Se propagaron cultivos de dos bacterias ácido lácticas seleccionadas en medio de cultivo, lavado y resuspendido en agua como se describió anteriormente. Se mezcló harina de trigo a 30% con agua (70%) que contenía la mezcla de dichas dos bacterias ácido lácticas a una densidad celular de aproximadamente  $10^8$  cfu/g, y se añadieron enzimas fúngicas, cada una a una concentración de 400 ppm. La fermentación se llevó a cabo durante 12 h a 37°C. Después de la fermentación, se añadió directamente a la masa líquida maíz nativo (10%), harina de arroz (10%), huevo (5%), azúcar (3%), mantequilla (1%) y levadura de hornear (1,5%). Las concentraciones son en base al peso total de la masa. Después de amasar, la fermentación continua durante 1,5 h a 30°C, antes de hornear la masa con levadura durante 50 minutos a 250°C.

15 El proceso además puede comprende una etapa de secado de la masa de harina de trigo líquida. También se usaron diferentes ingredientes para la producción de pan sin gluten.

Con propósitos de comparación también se produjeron los panes 1, 2, 4, y 5 según el protocolo de la solicitud de patente WO2008/010252. Se llevaron a cabo análisis sensoriales de los panes obtenidos según la invención y la técnica conocida, respectivamente, particularmente se consideraron los siguientes factores: elasticidad, fragancia ácida, sabor ácido, dulzor, sequedad y fragancia. Cada factor se evaluó según una escala de puntuación de 0 a 100. Los resultados del análisis sensorial se procesaron mediante análisis del componente principal. Además, de los panes se analizó el volumen específico, estructura de la miga, firmeza y contenido de fibra según los métodos estándar de American Association of Cereal Chemistry (AACC).

Ejemplo 5: administración a pacientes celíacos de productos horneados con levadura hechos con harina de trigo detoxificada.

25 Se administraron productos horneados con base de harina de trigo detoxificada, obtenidos como se describió previamente, a 5 pacientes celíacos. Adecuadamente el diagnóstico de patología celíaca se había adquirido según el criterio propuesto por European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. La edad media de los pacientes era alrededor de 15 años. Los pacientes celíacos estaban bajo condiciones de remisión desde al menos dos años y sometidos a una dieta sin gluten controlada. Todos los pacientes cuando se reclutaron mostraban indicadores negativos de patología serológica, así como ensayos histoquímicos negativos. Cada paciente, durante un periodo de 60 días, consumió diariamente alimentos horneados que contenían harina de trigo detoxificada correspondiente a 10 g de equivalente de gluten nativo. Se llevaron a cabo ensayos inmunoquímicos y histológicos en el Dipartimento di Pediatria e Gastroenterologia dell'Università degli Studi di Napoli, Federico II. El reclutamiento de pacientes se realizó con el informe de consentimiento de los padres que se habían sometido al programa experimental, previamente aprobado por el Ethical Committee de la Universidad de Nápoles.

Resultados.

(1) Actividad de peptidasa de la bacteria ácido láctica seleccionada.

Se ensayó la actividad de peptidasa sobre sustratos sintéticos relativamente específicos para actividades de peptidasa que eran importantes para la degradación de oligopéptidos derivados de gluten (figura 1). Es posible observar que *L. sanfranciscensis* DPPMA12 y *L. plantarum* DPPMA125 presentan todas las actividades enzimáticas consideradas. Con la excepción de la actividad de tipo tripeptidasa (PepT), dos bacterias ácido lácticas, y particularmente *L. plantarum* DPPMA125, presentan valores para otras actividades de peptidasa significativamente ( $P < 0,05$ ) más altos que los biotipos usados en el estudio de Rizzello et al. (Rizzello et al., 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4499-4507). Se detectaron diferencias significativas, particularmente para actividades PepI, PepQ, PepR y PepX, con la presencia de restos de prolina a diversas posiciones de enlaces. La glútea y en particular gliadinas, contenían un porcentaje muy alto e inusual (45-60%) de restos de glutamina y prolina. Este último aminoácido, consecuentemente, se da particularmente en epítotos tóxicos, que resultan a partir de harina de trigo, y responsables de la patología celíaca. Para proporcionar microorganismos adecuados para degradación alta de enlaces donde está implicada prolina, esta actividad de enzima es definitivamente un requerimiento previo para degradación de gluten intensa y proceso de hidrólisis rápido. La disponibilidad de una colección de cultivo grande para revisar y el gran número de actividades enzimáticas ensayadas representan, por lo tanto, el requerimiento de conseguir cepas seleccionadas que no están disponibles comúnmente. La actividad de peptidasa de la bacteria láctica seleccionada se realiza mediante el uso complementario de proteasas fúngicas que se usan rutinariamente en procesos de fabricación de pan. Tales enzimas se emplean en la industria de fabricación de pan para modificar la concentración de proteína y, por lo tanto, la "fuerza de la harina", dependiendo de los productos horneados para los que están diseñadas.

La figura 4 muestra una comparación de actividades de peptidasa para bacterias ácido lácticas conocidas en la técnica y dos bacterias ácido lácticas (DPPMA12 y DPPMA125) según la invención, respectivamente, y se hace

aparente que la última muestra actividades de aminopeptidasa, prolina iminopeptidasa y propildipeptidasa marcadamente más altas.

## (2) Caracterización de harina hidrolizada.

Después de fermentar durante 12 h a 37°C, se extrajeron selectivamente fracciones de proteína y se sometieron a ensayos analíticos complementarios. Como se hace aparente usando análisis electroforético bidimensional (figura 2), al final del proceso de fermentación no eran detectables trazas de gliadina de harina de variedades de trigo duro Svevo y Duilio. Se encontraron resultados similares en la fracción de glutenina de pan comercialmente disponible de harinas de trigo tipo "00", otras variedades de trigo duro probadas (Arcangelo, Ciccio, Colosseo, Gargano y Simeto) y de cebada, arroz y avena. Las proteínas de harina de trigo, extraídas con 60% de etanol, se analizaron con la técnica MALDI-TOFF MS. Los picos que correspondían a gliadina europea estándar desaparecieron completamente después de fermentación durante 12 h a 37°C. Solo se detectaron algunos picos con masa molecular más baja de 8 kDa mediante análisis espectrométrico. Se llevaron a cabo ensayos inmunológicos usando anticuerpos R5 y pruebas ELISA que confirmaron que no se detectaron trazas de gliadina en muestras fermentadas. Según el mismo método, se determinó la concentración de gluten residual en pan comercialmente disponible de harinas de trigo tipo "00", variedades de trigo duro y de cebada, arroz y avena, que fue, en todos los casos, menor de 20 ppm. El método usado para estas determinaciones es un método oficial de AIC (Associazioni Italiana Celiachia), WHO y FAO. Con respecto a los datos que da la bibliografía (Rizzello et al., 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4499-4507), el proceso de hidrólisis se lleva a cabo con la misma eficacia (gluten residual < 20 ppm) pero en tiempos marcadamente menores (12 frente a 48 h). Esta velocidad alta del proceso resulta, por un lado, del uso de concentraciones más altas de cada enzima proteolítica fúngica (400 ppm) y, por otro lado, principalmente a partir de actividad de peptidasa más alta de biotipos de bacteria láctica seleccionada. De nuevo en comparación con dicha referencia bibliográfica que solo consideraba harina de trigo para pan con concentración inicial baja de gluten, la presente invención muestra la eficacia del protocolo también sobre diversas harina de variedades de trigo duro, y cebada, arroz y avena que también tienen concentraciones iniciales elevadas de proteína.

En la figura 3 se indica el contenido de nitrógeno orgánico de pan de harina comercialmente disponible de trigo tipo "00" antes y después del proceso de fermentación. La harina hidrolizada consiste casi totalmente en una mezcla de péptidos y aminoácidos de bajo peso molecular. Solo una cantidad menor del 20% de gluteninas iniciales está aún presente en harina hidrolizada. La concentración de aminoácidos de la harina hidrolizada es aproximadamente 15.000 mg/kg comparado con <1.000 mg/kg que se da en harina de trigo. La biodisponibilidad más alta de aminoácidos libres hace de esta harina de trigo hidrolizada una materia prima con contenido nutricional alto, que al mismo tiempo retiene otras características nutricionales del cereal en términos de sales minerales, vitaminas y fibras. Cuando se usa como un ingrediente para la producción de alimentos sin gluten, la harina de trigo hidrolizada cubriría los desequilibrios nutricionales que resultan de la dieta sin gluten (Grehn et al. 2001. *Scand J Nutr* 45: 178-182; Mariani et al., 1998. *J. Pediatr Gastroenterol Nut* 27: 519-523; Thompson et al., 2005. *J. Human. Nutr. Diet.* 18: 163-169).

Pruebas comparativas con bacterias ácido lácticas conocidas muestran que la concentración de aminoácidos en la masa es remarcadamente más baja e igual a aproximadamente 2.000 mg/kg después del estado de hidrólisis más alta (figura 6). Esto confirma el diferente grado de hidrólisis de las proteínas de trigo. Además, ya que la liberación de aminoácidos y precursores de compuestos volátiles que se generan durante el proceso de horneado y son responsables del sabor de productos horneados, la concentración de aminoácidos libres remarcadamente más alta, como en el caso de la presente invención, indica síntesis de compuestos volátiles más alta y, por lo tanto, un mejor sabor de los productos según la presente invención.

## (3) Producción de productos horneados con levadura usando harina de trigo detoxificada.

Anteriormente se señaló un ejemplo de aplicación de protocolo biotecnológico para la fabricación de productos horneados con levadura con base de harina de trigo detoxificada. Además de la fabricación de alimentos horneados, el protocolo se estandarizó y optimizó también para producción de pan sin gluten con los ingredientes descritos anteriormente. Además del posible uso directo de harina de trigo detoxificada, es posible un tratamiento usando secado por pulverizado y posterior uso de la materia seca. Esta posibilidad tecnológica permite una fácil conservación de la materia prima a lo largo del tiempo, sin ninguna alteración de las características nutricionales de la harina de trigo.

La figura 7 muestra las mejores propiedades sensoriales del pan según la presente invención (DPPMA12 + DPPMA125) comparado con panes de técnicas conocidas. Además, la tabla 1 muestra que el pan según la presente invención se caracteriza por volumen específico más alto, más burbujas en la miga, firmeza más baja, y contenido de fibra más alto comparado con pan de la técnica conocida. Estas diferencias resultan de la presencia de harina de trigo que aunque está detoxificada es adecuada para mejores características reológicas y químicas.

Tabla 1

Parámetros reológicos y químicos	Estárter de pan*	Pan (DPPMA12 + DPPMA125)
Volumen específico (cm <sup>3</sup> /g)	1,35 ± 0,04	1,48 ± 0,07
Burbujas en la miga (%)	39,2 ± 0,34	42,3 ± 0,47
Firmeza (n)	16,62 ± 0,27	14,75 ± 0,21
Contenido de fibra (%)	1,5 ± 0,44	2,0 ± 0,52

\**Lactobacillus sanfranciscensis* DSM18426, DSM18427, *Lactobacillus plantarum* DSM18430

(4) Administración a pacientes celíacos de productos horneados hechos con harina de trigo detoxificada.

5 Se administró diariamente productos horneados preparados según el protocolo biotecnológico descrito previamente a pacientes celíacos que corresponde a una dosis equivalente de 10 g de gluten nativo. En la tabla 2 se dan índices inmunoquímicos e histológicos de pacientes celíacos en remisión sometidos a consumo (10 g de equivalente de gluten al día para 60 gg) con base de harina de trigo detoxificada.

Tabla 2

	Anti-tTG		Inmunoquímica						Grado Marsh	
			CD3		CD25		γδ			
	T <sub>0</sub>	T <sub>60</sub>								
F.I.	1,6	1	39	38	6	5	5,6	8,6	0	0
I.C.	1,9	1,1	3,7	11	11	9	0,9	3,8	0	0
R.R.	0,3	0,3	53	56	3	4	11,5	17,8	1	1
I.I.	0,5	0,3	31	36	21	21	8,4	12,8	0	0

10 Como es posible observar, todos los pacientes en el momento del reclutamiento (T<sub>0</sub>) presentan valores serológicos e histológicos normales (grado Marshes). Después de cada consumo diario de 10 g de equivalente de gluten, durante un periodo de 60 días (T<sub>60</sub>), ninguno de los valores bioquímicos e inmunohistoquímicos era diferente comparado con valores iniciales. En particular, se debe observar que el grado Marsh, que representa el estado de integridad y funcionalidad de la mucosa intestinal, según se detecta en base a muestras bio-ópticas, es absolutamente idéntico al valor inicial. Ningún paciente desarrollo atrofia de las vías intestinales durante el cambio. Sólo uno de cada 5 de los

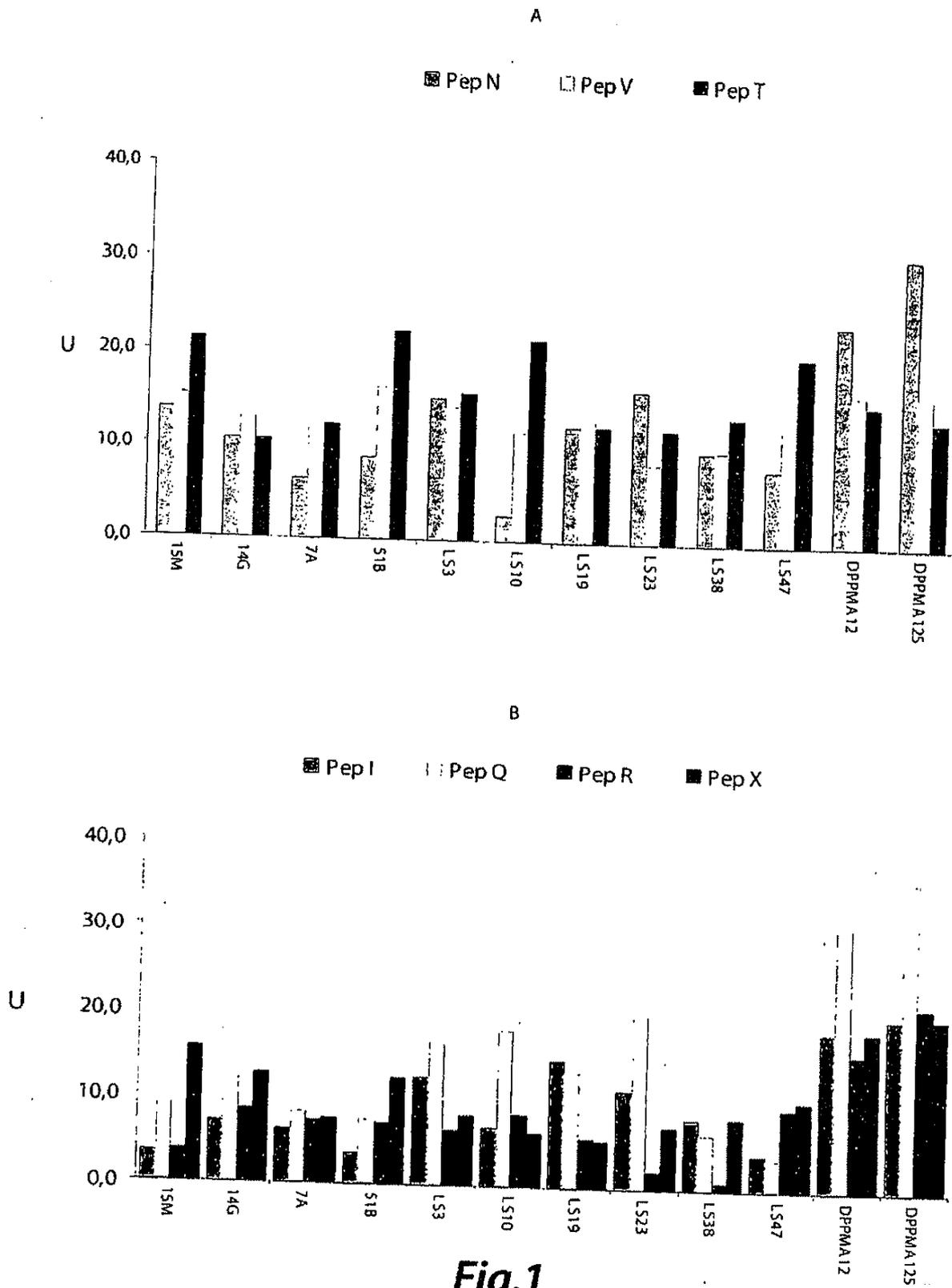
15 pacientes reclutados interrumpió la prueba debido a razones personales y no dependiendo de estados patológicos finales. En la base de los resultados adquiridos en base al mayor cuidado de análisis clínicos en vivo, es posible señalar que la harina de trigo detoxificada era tolerada por todos los pacientes. En conclusión, la harina de trigo detoxificada se puede usar para la preparación de alimentos sin gluten.

20

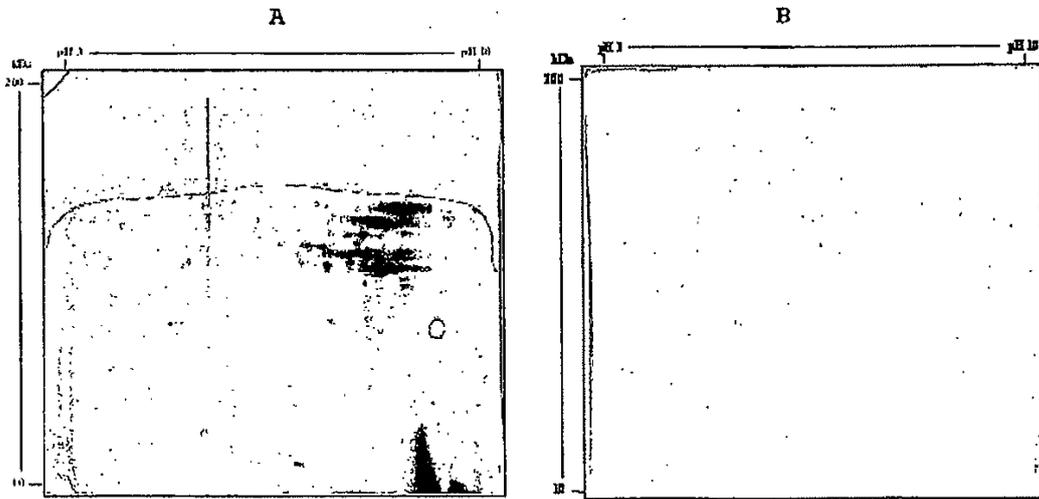
**REIVINDICACIONES**

1. Una mezcla que comprende o consiste en bacterias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM22064.
2. Una mezcla según la reivindicación 1, que además comprende proteasas fúngicas.
- 5 3. Una mezcla según la reivindicación 2, en la que las proteasas fúngicas se seleccionan a partir del grupo que consiste en proteasas *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o sus mezclas.
4. El uso de una mezcla como se define en cada una de las reivindicaciones precedentes para la completa degradación de gluten en harinas y/o fermentación de dichas harinas.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que las harinas se seleccionan del grupo que consiste en harinas de trigo tanto duro como blando, cebada, arroz o avena.
- 10 6. Un proceso para la preparación de una masa de harina líquida, en el que el gluten se degrada completamente, adecuado para la producción de productos sin gluten con levadura, que comprende o consiste en las siguientes etapas:
  - 15 (a) propagar cultivo de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus safranciscensis* DSM22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM22064;
  - (b) mezclar la harina a concentraciones de 20-50%, preferentemente 30%, y agua, a 50-80%, preferentemente 70%, que contiene la mezcla de dos cepas de bacterias de la etapa a) a densidad celular de aproximadamente  $10^8$  cfu/g;
  - (c) añadir una o más proteasas fúngicas cada una a concentración de 200-500 ppm, preferentemente 400 ppm;
  - 20 (d) fermentar durante 8-20 h, preferentemente 12 h, a 30-37°C.
7. Un proceso según la reivindicación 6, que además comprende una etapa e) de secado de la masa líquida obtenida en la etapa d).
8. Un proceso según cada una de las reivindicaciones 6-7, en el que la harina se selecciona a partir del grupo que consiste tanto en pan como en harinas de trigo duro, cebada, arroz, avena o sus mezclas, preferentemente harinas de trigo blando y duro.
- 25 9. Un proceso según cada una de las reivindicaciones 6-8 en el que las enzimas proteolíticas fúngicas se seleccionan a partir del grupo que consiste en *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o sus mezclas.
10. Una masa de harina líquida o seca en la que el gluten se degrada completamente mediante el uso del proceso como se define en cada una de las reivindicaciones 6-9, dicha masa de harina líquida o seca comprende bacteria ácido láctica *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM22064.
- 30 11. Una mezcla que comprende o consiste en una masa como se define en la reivindicación 10 en combinación con una o más harinas naturalmente sin gluten.
12. Una mezcla según la reivindicación 11 en la que las harinas naturalmente sin gluten se seleccionan a partir del grupo que consiste en harina de maíz nativo, maíz blanco, arroz, quínoa, teff o amaranto, y alforfón.
- 35 13. Una mezcla según cada una de las reivindicaciones 11-12 en la que las harinas están contenidas según los siguientes porcentajes: maíz nativo 5-15%, preferentemente 10%, maíz blanco 5-15%, preferentemente 10%, harina de arroz, quínoa, teff o amaranto 10-30%, preferentemente 20%, y harina de alforfón 1-10%, preferentemente 5%, en la que dichos porcentajes están expresados en peso en base al peso total de harina de la composición.
- 40 14. Un proceso para la preparación de productos horneados con levadura por medio de harina de gluten detoxificada usando el proceso según se definió en cada una de las reivindicaciones 6-9 que comprende o consiste en las siguientes etapas:
  - 45 (a) añadir una mezcla de harinas naturalmente sin gluten a 10-40%, preferentemente 30%, levadura de hornear 1-2%, sal 0,1-1,0% y agentes estructurantes 0,5-1% a masa de harina de gluten detoxificada líquida usando el proceso según se define en las reivindicaciones 6-9 y amasar;
  - (b) permitir que se de la fermentación durante aproximadamente 1-3 h, preferentemente 1,5 h, a 30°C;
  - (c) hornear durante 50 minutos a 220°C.

15. Un proceso según la reivindicación 14 en el que cuando la masa de harina de gluten detoxificada se seca, el % de la proporción entre los ingredientes y agua es aproximadamente 1,2:0,8.
- 5 16. Un proceso según cada una de las reivindicaciones 14-15, en el que las harinas de trigo naturalmente sin gluten se escogen a partir del grupo que consiste en harina de maíz nativo, maíz blanco, arroz, quínoa, teff, amaranto, alforfón o sus mezclas.
17. Un proceso según cada una de las reivindicaciones 14-16, en el que la harina de trigo detoxificada se selecciona a partir del grupo que consiste tanto en pan como en harina de trigo duro, cebada, arroz, avena o sus mezclas, preferentemente harina de trigo blando y duro.
- 10 18. Alimentos horneados que se obtienen por medio del proceso según se define en cada una de las reivindicaciones 14-17, dichos alimentos horneados comprenden bacterias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM22064.
19. Un proceso para la preparación de productos horneados con levadura que comprende o consiste en las siguientes etapas:
- 15 (a) añadir directamente maíz nativo, harina de arroz, huevo, azúcar, mantequilla y levadura de fermentar a masa de harina de gluten detoxificada según se define en cada una de las reivindicaciones del proceso 6-9 y amasar;
- (b) permitir que se de la fermentación durante 1,5 h, a 30°C y
- (c) hornear durante 50 minutos a 250°C.
- 20 20. Un proceso según la reivindicación 19, en el que en la etapa a) los porcentajes de los ingredientes son los siguientes: maíz nativo 10%, harina de arroz 10%, huevo 5%, azúcar 3%, mantequilla 1%, y levadura de hornear 1,5%.
21. Productos horneados con levadura que se obtienen por medio del proceso según se define en cada una de las reivindicaciones 19-20, dichos productos horneados con levadura comprenden bacterias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 y *Lactobacillus plantarum* DSM22064.
- 25 22. El uso de una masa de harina según se define en la reivindicación 10, mezclada según se define en las reivindicaciones 11-13, producto con levadura de horno según se define en la reivindicación 18, productos de confitería con levadura de horno según se define en la reivindicación 21, para la preparación de alimentos adecuados para cubrir desequilibrios nutricionales que resultan de regímenes alimentarios sin gluten.
23. Bacteria ácido láctica *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063.
- 30 24. Bacteria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* DSM22064.



Duilio



Svevo

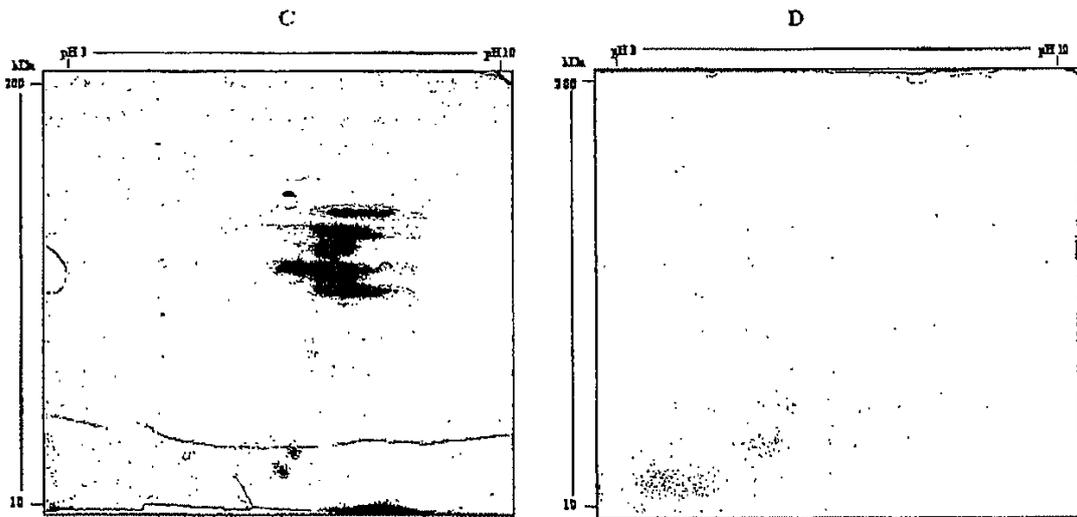
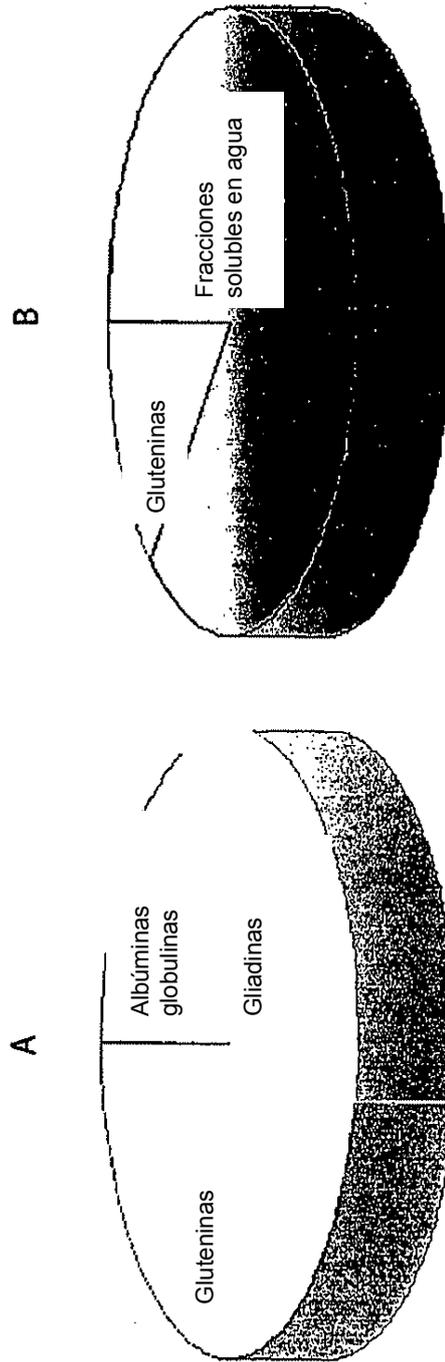


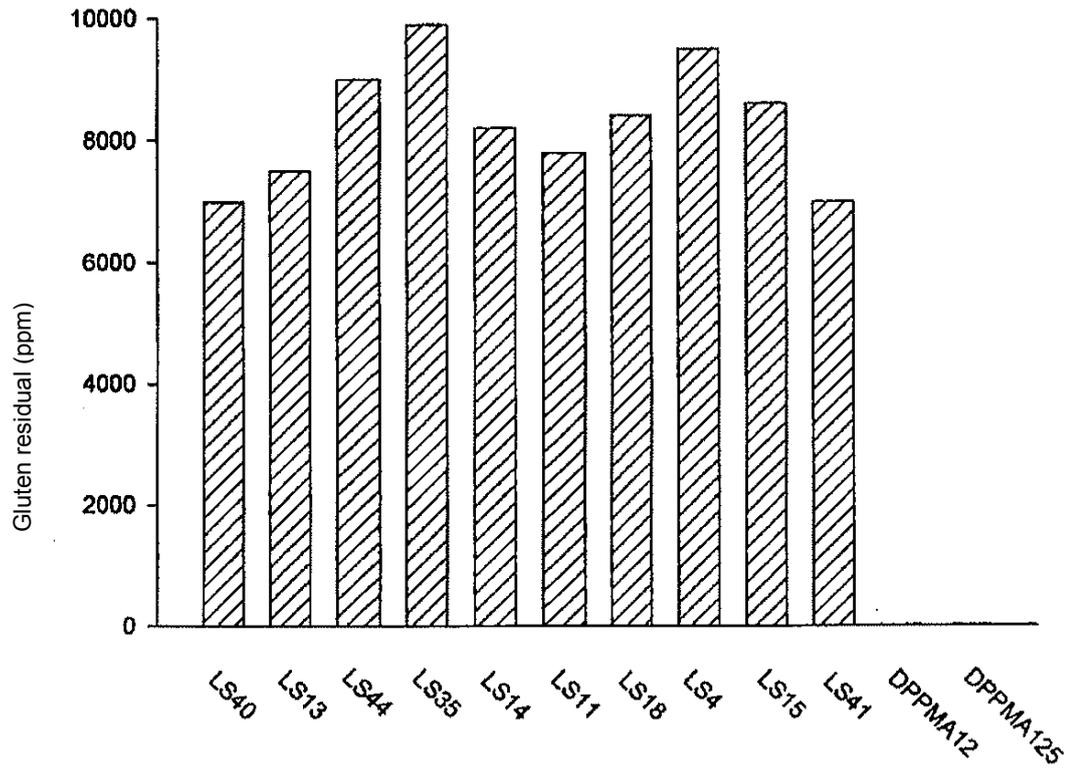
Fig.2



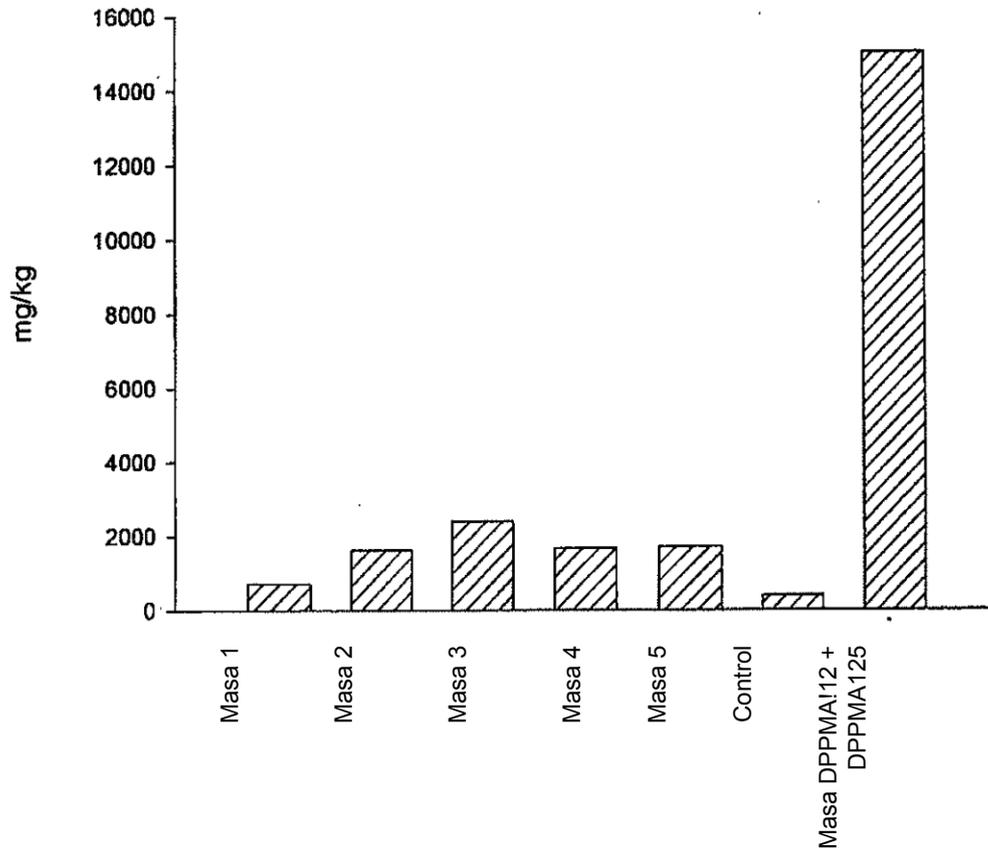
	Harina de trigo	Harina hidrolizada
Albúminas y globulinas	0,22%	1,83%
Gliadinas	0,78%	0,00%
Gluteninas	0,91%	0,14%

**Fig.3**



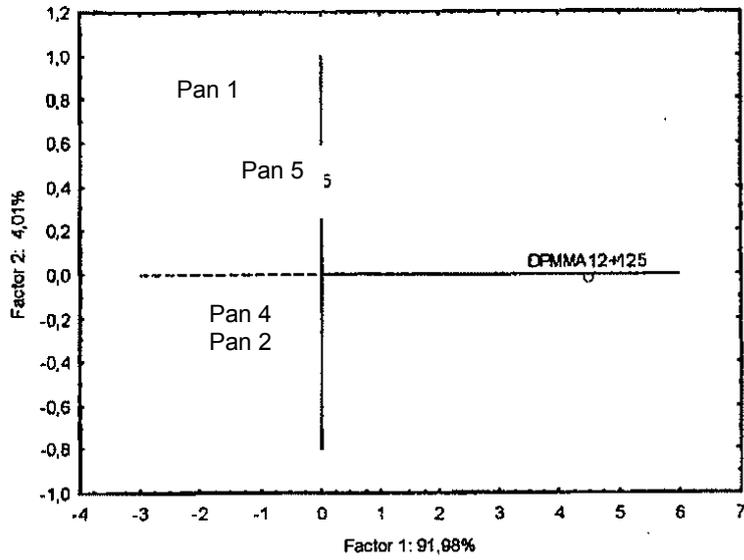


**Fig.5**

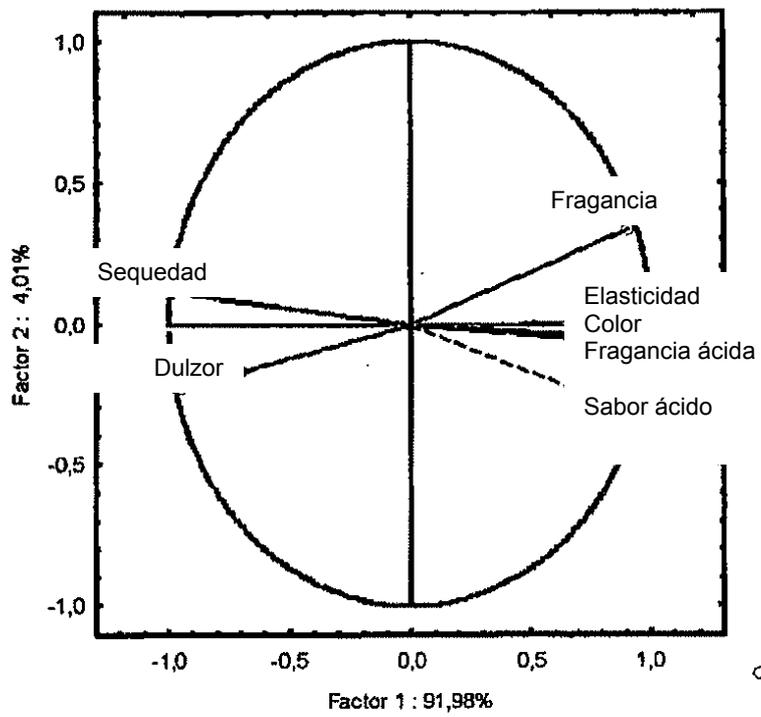


**Fig.6**

(A)



(B)



**Fig.7**