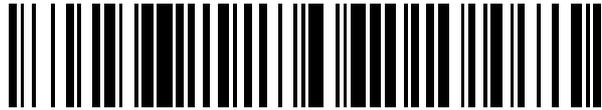


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 969**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)

C12R 1/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2006 E 10175609 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2272375**

54 Título: **Productos lácteos con veteados azul "libres de gluten" destinados a personas afectadas por enfermedad celíaca**

30 Prioridad:

11.10.2005 IT MI20051908

23.06.2006 IT MI20061211

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

07.02.2014

73 Titular/es:

MOFIN S.R.L. (100.0%)

Via Pietro Custodi, 12

28100 Novara, IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI;

STROZZI, GIAN PAOLO y

BRUNO, FEDERICO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 441 969 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

Productos lácteos con veteado azul “libres de gluten” destinados a personas afectadas por enfermedad celiaca.

- 5 La presente invención se refiere a cultivos de mildiu o esporas “libres de gluten” del género *Penicillium*, en particular de la especie *Penicillium roqueforti*, para el veteado azul de quesos destinados a personas afectadas por enfermedad celiaca.

El objetivo de la presente invención es un procedimiento para la preparación de dichos cultivos libres de gluten que
10 prevé el uso de un sustrato de cultivo analérgico libre de gluten, asociado posiblemente con un tratamiento enzimático posterior adecuado para la completa eliminación de trazas de gluten, si es que existe alguna, provenientes de contaminación accidental y no intencionada (contaminaciones cruzadas).

La enfermedad celiaca es una enfermedad inflamatoria inmuno-mediada, crónica, enteropática, surgida de la
15 ingestión de gluten, una proteína “almacén” contenida de manera natural en algunos cereales. Esta intolerancia alimentaria afecta a personas genéticamente predispuestas, de cualquier edad, que tienen un sistema inmunitario que responde de una manera anormal a la ingestión de fracciones proteínicas típicas del gluten del trigo, escanda común (un tipo de trigo), kamut y “spel” (un tipo de trigo), cebada, arroz, triticale (un cruce entre trigo y arroz) y sus derivados. Algunos individuos también presentan intolerancia a las proteínas de la avena. Técnicamente, el término
20 “gluten” se aplica a la combinación de las proteínas prolaminas (ricas en prolina) simples, denominadas “gliadinas”, y glutelínicas (ricas en glutamina), denominadas “gluteninas”, de los cereales mencionados anteriormente. En el contexto de la enfermedad celiaca, el término “gluten” se usa a menudo con referencia a todos los tipos de proteínas contenidas en los cereales, incluso si entre las diferentes fracciones proteínicas que forman el gluten, la gliadina parece ser la más perjudicial. La enfermedad celiaca puede producirse en múltiples formas clínicas, no siempre en
25 una forma manifiesta; de hecho, existen formas mono-sintomáticas latentes o potenciales, clínicamente silentes y sin síntomas evidentes o con un síntoma clínico intestinal y extra-intestinal completo.

La inflamación crónica conduce al incremento de los linfocitos intraepiteliales intestinales, a la hipertrofia de las
30 criptas y al progresivo aplastamiento y desaparición de la vellosidad intestinal del intestino delgado, en particular la mucosa duodenal, con una consiguiente pérdida de capacidad de absorción de las sustancias nutritivas y la aparición de síntomas tales como diarrea crónica, distensión abdominal, inapetencia, disminución de peso, anemia y deficiencia vitamínica. En los casos más graves, contramarcados con un diagnóstico tardío, puede producirse osteoporosis, infertilidad, abortos repetidos, baja altura en las personas jóvenes, diabetes mellitus, tiroiditis autoinmune, alopecia, epilepsia con calcificaciones cerebrales y linfoma intestinal terrible. En las personas celiacas,
35 la ingesta de gluten, también en pequeñas cantidades, es capaz de causar la respuesta anormal del sistema inmunitario: la transglutaminasa, una enzima que existe en el tejido mucoso intestinal, se une a su vez a la gliadina y, a través de la desaminación, se transforma en una molécula capaz de activar las células T (células del sistema inmunitario capaces de mediar todas las respuestas inmunitarias a los antígenos proteínicos), con una consiguiente producción de inmunoglobulinas IgG y IgA antitransglutaminasa e IgA antiendomiso. En una primera fase, se
40 produce un incremento de las células T activadas intraepiteliales intestinales, mientras que con el avance de la enfermedad, el incremento se refiere tanto a los linfocitos como a las células plasmáticas infiltradas de la propia lámina, con una producción de metaloproteinasas responsables del acortamiento de la vellosidad y, por lo tanto, del daño a la mucosa intestinal.

45 La posibilidad de prevenir el desarrollo o de tratar la enfermedad celiaca no existe hasta ahora, por lo tanto, una dieta libre de gluten, estrictamente llevada a lo largo de la vida es la única terapia capaz de garantizar a las personas celiacas una salud perfecta. Las personas celiacas deben eliminar también las más pequeñas trazas de harina de los cereales peligrosos, puesto que la ingesta de gluten, incluso en cantidades mínimas, puede desencadenar la respuesta autoinmunitaria. Puesto que la relación de la cantidad de gluten ingerido con respecto al efecto tóxico
50 inducido a nivel intestinal no ha sido aún definida, el término “trazas”, desde el punto de vista cuantitativo, tiene una importancia práctica fundamental en el tratamiento de la enfermedad celiaca y las implicaciones sobre el plan de legislación alimentaria, dado que dichas “trazas” están relacionadas con el límite máximo de gluten “aceptable” (umbral) en los productos adecuados para la dieta de la persona celiaca. Todos los expertos en la materia están de acuerdo en que una dosis de 100 mg por día de gliadina, igual a 200 mg de gluten, es decir, aproximadamente 3 g
55 de pan, es suficiente para causar, en la mayoría de las personas celiacas, el incremento de los linfocitos intraepiteliales intestinales, un signo prematuro de inflamación intestinal persistente.

Con referencia al umbral mínimo, los pocos trabajos científicos llevados a cabo hasta ahora parecerían mostrar que
60 la ingestión de hasta 10 miligramos por día de gliadina (igual a 20 partes por millón de gluten) no es capaz de dañar sensiblemente la mucosa intestinal, pero puede determinar, en una minoría de los casos, la aparición de síntomas gastroentéricos.

A nivel legislativo internacional, la antigua norma “*Codex Standard for Gluten-Free Foods*”, por otra parte aún en
65 vigor, muestra, como contenido de gluten máximo en los productos de dieta terapéutica, 0,05 de nitrógeno por 100 g de producto seco (con referencia al almidón del trigo), lo cual corresponde a una fracción de gluten igual a aproximadamente 500 ppm. Sin embargo, está teniendo lugar una revisión apropiada y correcta de la directriz

anteriormente indicada, que parece prever que los alimentos libres de gluten que resultan de ingredientes libres de gluten de manera natural no contengan más de 20 ppm de gluten, mientras que los alimentos libres de gluten obtenidos de cereales con gluten, pueden tener un límite máximo de 200 ppm de gluten.

- 5 En Francia, Gran Bretaña y los Países Bajos, que están esperando la revisión de la directriz anteriormente indicada, consideran, como el límite máximo para los productos libres de gluten, 200 partes por millón. En Italia, entrará en vigor una ley (Decreto Legislativo n° 109/1992), que establece que, si en la composición del producto alimentario o en la de uno o más de los ingredientes (aromatizantes, aditivos o coadyuvantes) que forman el mismo, están presentes cereales que contienen gluten o sustancias obtenidas de los mismos y/o a partir del procedimiento productivo puede obtenerse en el producto final una cantidad de gluten, determinada analíticamente como superior a 20 partes por millón, dicho producto tendrá que mostrar en la etiqueta, al pie de la lista de los ingredientes y de una manera bien visible, las palabras “producto que contiene gluten”.

15 Por lo tanto, para garantizar a las personas celíacas una información precisa sobre la ausencia de gluten en los alimentos, será obligatorio, también en los quesos, mostrar en la etiqueta la presencia de posibles trazas de gluten.

Para la industria láctea especializada en la producción de quesos veteados azules, este nuevo aspecto regulador implica un serio daño comercial derivado de la disminución del círculo potencial de compradores consumidores. Sin embargo, la completa exclusión del gluten de la dieta no es fácil de llevar a cabo, considerando que pueden producirse fenómenos de contaminación cruzada de cereales y derivados (almidones, harinas, harina de almidón, etc.) libres de gluten de manera natural, previamente a nivel de la industria de molidura. Dichos productos son usados, a continuación, por la industria alimentaria en la preparación de alimentos complejos basados en múltiples ingredientes tecnológicos, aditivos y coadyuvantes de diferente origen y naturaleza. Una reciente investigación ha mostrado que hasta el 6% de los productos “teóricamente” libres de gluten, en base a los ingredientes indicados, contienen realmente por encima de 30 mg de gliadina por 100 g del producto final, igual a 600 ppm de gluten. Con el fin de excluir una posible contaminación por gluten, es necesario, por lo tanto, considerar, para cada producto alimentario comercializado, no solamente todos los ingredientes usados y el procedimiento, sino también la cadena productiva de cada ingrediente individual.

30 Entre los “alimentos en riesgo”, tal como los también señalados por la Asociación Italiana de Personas Celíacas, los “quesos veteados azules y con una corteza mohosa” están también incluidos, puesto que a partir de investigaciones experimentales, llevadas a cabo igualmente en Italia, resulta que algunos “quesos veteados azules y con una corteza mohosa” pueden contener gluten proveniente de medios de cultivo de desarrollo de esquizomicetos (mildius y levaduras) usados como cultivos de partida con el fin de obtener el veteado azul típico del queso azul (*Penicillium roqueforti*), el recubrimiento de fieltro blanco de quesos tales como Brie, Camembert y Carré de l'Est, Tomme blanche (*Penicillium candidum*) y/o el refinado de muchos otros tipos de quesos (géneros *Kluiveromices*, *Debaromices*).

40 De acuerdo con la reglamentación que entrará en vigor, nacida con el fin de satisfacer la necesidad de las personas celíacas de una información precisa sobre la ausencia de gluten en los alimentos, si dichos quesos contienen trazas de gluten, o sin embargo están fabricados con ingredientes o coadyuvantes que contienen gluten tecnológicos, será obligatorio mostrarlo en la etiqueta.

45 El documento IAMMETTI F. Y COL.: “Determinazione del contenuto glutinico residuo in colture fungine utilizzate per la produzione di Gorgonzola”, IL LATTE, TECNICHE NUOVE, MILÁN, IT, vol. 25, no. 10, 01-01-2000, páginas 52-56, se refiere a la determinación de la cantidad de gluten en dos cultivos de *Penicillium* usando un ensayo ELISA.

50 La solicitud de patente francesa FR 2447682 A1 se refiere a la germinación de un cultivo de *Penicillium roqueforti* en un medio que contiene polvo de suero de leche (*poudre de lactoserum*).

El documento BLASZYK M. Y COL.: “Reduced water activity during sporogenesis in selected penicillia: Impact on spore quality”, FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, vol. 31, no. 6-7, 1998, páginas 503-509, se refiere al uso de medio PDA (agar de patata dextrosa) para la producción de esporas de *Penicillium roqueforti*.

55 El documento DEMYTTENAERE J. C. R. Y COL.: “De novo production of (+)-aristolochene by sporulated surface cultures of *Penicillium roqueforti*”, PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 59, no. 6, marzo de 2002, páginas 597-602, se refiere al uso de medio PDA (agar de patata dextrosa) para la producción de esporas de *Penicillium roqueforti*.

60 Por lo tanto, sigue existiendo una fuerte necesidad de ser capaces de proporcionar productos lácteos con veteado azul “libres de gluten”. También en el caso en el que el procedimiento de fabricación de los cultivos de *Penicillium* no prevé el uso de ningún ingrediente o sustancia que contiene gluten, es posible sin embargo que, debido a contaminaciones cruzadas no intencionadas y accidentales, algunos componentes usados en el procedimiento productivo lleven trazas de gluten. Por lo tanto, todos los operadores del sector están de acuerdo en que, hasta ahora, sigue existiendo una muy fuerte necesidad de proporcionar un procedimiento para la preparación de medios de cultivo adecuados para el desarrollo de los esquizomicetos (mildius o levaduras), usados como cultivos de partida

para obtener el veteado azul de los quesos, capaz de usar un sustrato no basado en pan y, simultáneamente, capaz de reducir las contaminaciones cruzadas, no intencionadas y accidentales, si se produjeran. En particular, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un procedimiento para la preparación de medios de cultivo de desarrollo de los esquizomicetos (mildius y levaduras), usados como cultivos de partida para obtener el veteado azul de los 5 quesos, que prevé un doble nivel de seguridad en relación con la ausencia de gluten.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar el uso de un cultivo de esporas o mildiu libres de gluten que pertenecen al género *Penicillium* en un procedimiento para la preparación de productos lácteos con veteado azul libres de gluten, según la reivindicación 1.

10

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de medios de cultivo capaces de superar los límites de la técnica conocida y que sea adecuado para ser destinado a personas afectadas por enfermedad celiaca de manera segura.

15 Estos y otros objetivos, que resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, han sido alcanzados por el Solicitante, el cual ha mejorado una metodología, que incluye un doble nivel de seguridad en relación con la ausencia de gluten en los medios de cultivo.

En particular, el Solicitante ha establecido una metodología que prevé: un primer procedimiento para la preparación de cultivos de mildiu o esporas desarrolladas en un sustrato de cultivo libre de gluten seleccionado de manera natural, capaz de salvaguardar completamente la actividad biológica de las esporas de mildiu y, por lo tanto, la capacidad de asegurar un veteado azul óptimo y, a continuación, un segundo procedimiento que prevé un tratamiento enzimático de dichos cultivos. Los mildius que pertenecen a la especie *Penicillium roqueforti*, preferentemente seleccionados a partir del grupo depositado por el Solicitante en el Centro de Recogida DSMZ 25 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*; Braunschweig, Alemania) el 21.12.2005, forman un sujeto de la presente invención, en la cual dicho grupo está constituido por los microorganismos identificados por dicho centro, con los números de registro indicados en la siguiente tabla 1:

<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17815
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17816
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17817
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17818
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17819
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17820
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17821
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17822
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17823
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17824
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17825
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17826
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17827
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17828
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17829
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17830

30 tal como se indica en la reivindicación independiente adjunta.

Un procedimiento para la preparación de un cultivo de espora o mildiu libre de gluten, seleccionado entre el grupo indicado anteriormente, una composición que incluye al menos uno de dichos cultivos y el uso de al menos uno de dichos cultivos para la preparación de un producto lácteo con veteado azul destinado a personas con enfermedad 35 celiaca forman, por consiguiente, un objetivo de la presente invención, que tiene las características indicadas en las reivindicaciones adjuntas.

El veteado azul, es decir el veteado con un color verde más o menos intenso típico del Gorgonzola (Italia), Roquefort, Bress Blue, Blue d'Auvergne, Sassenage y otros (Francia), Stilton (Inglaterra), Danablu (Dinamarca), 40 Cabrales (España) y Bluecheese (Estados Unidos), se obtiene mediante el desarrollo de un mildiu que pertenece al género *Penicillium* (especie *Penicillium roqueforti*), el cual se añade voluntariamente a la leche en el momento del procesamiento, junto con enzimas lácteas y el cuajo. Las cepas de mildiu, las cantidades de esporas y las técnicas de tratamiento varían de un queso a otro, pero todas las tipologías se caracterizan por un tipo de coagulación del cuajo láctico, con una naturaleza láctica tardía prevalente, con una coagulación húmeda y particularmente blanda y 45 agrietada, con lento y progresivo drenaje. La acción enzimática de una microflora mezclada (bacterias lácticas, mildiu y a menudo levaduras) permite obtener, en tiempos relativamente cortos, pastas muy proteolizadas (con un coeficiente de maduración de aproximadamente el 65%) caracterizadas por la presencia de diversas sustancias aromáticas para la acción lipolítica llevada a cabo por el *Penicillium* sobre la materia grasa. Los agrietamientos, indispensables para el desarrollo del mildiu, son una consecuencia tanto de la acidificación llevada a cabo por las

enzimas lácticas como por el desarrollo del dióxido de carbono producido por las levaduras o bacterias heterofermentadas.

5 Durante la maduración, las formas están sometidas, en dos etapas diferentes, a la perforación de ambas caras con agujas apropiadas. La operación tiene el objetivo de permitir la entrada de aire y, por lo tanto de oxígeno, dentro de los agrietamientos que existen en la pasta.

10 Únicamente en un entorno aireado, las esporas de *Penicillium* son capaces de desarrollarse por sí mismas, mediante la formación, en primer lugar, de un entrelazado de hifas (micelio) que invaden los agujeros y las grietas y posteriormente producen los conidióforos que portan las esporas, con un color verde/azul más o menos intenso.

15 Es el color de las esporas el que caracteriza el aspecto típico del Gorgonzola y todos los demás quesos veteados azules, mientras que las acciones proteolíticas y lipolíticas del mildiu causan la maduración del queso y la formación de las características sensoriales particulares.

Los cultivos de esporas de las diferentes cepas de *Penicillium roqueforti* usadas en el procesamiento son preparadas por laboratorios especializados, en una forma líquida o liofilizada, de acuerdo con la técnica conocida por el experto en la materia.

20 De hecho, se realiza la preparación de un cultivo intermedio, el cual prevé una siembra de las esporas de la cepa de *Penicillium* (procedente de un tubo del *Working Cell Bank*) en un medio de cultivo de agar apropiado (por ejemplo agar de patata, agar de patata-dextrosa, agar de extracto de malta) y posterior incubación a 22-28°C durante 5-10 días, con el fin de incrementar su número.

25 Una vez finalizado el desarrollo y la formación de esporas del cultivo intermedio (habitualmente una semana) en uno de los medios de cultivos descritos anteriormente, con una pipeta estéril las esporas se retiran y se recogen de la superficie del medio de agar.

30 En una realización particularmente preferida, dicho cultivo intermedio se obtiene mediante el desarrollo de esporas que pertenecen a la especie *Penicillium roqueforti*, seleccionadas entre el grupo descrito anteriormente y reivindicado en la reivindicación independiente adjunta.

Dichas esporas han sido aisladas a partir de un hábitat natural, preferentemente a partir de esencias de forraje.

35 Las esporas del cultivo intermedio, después de suspensión en un medio líquido estéril apropiado (solución fisiológica o los propios caldos de cultivo descritos anteriormente en la formulación sin agar) forman el inóculo para la producción del cultivo final. El Solicitante ha descubierto que es útil usar, como sustrato de desarrollo, al menos un sustrato libre de gluten de manera natural de origen vegetal.

40 En la práctica, el Solicitante ha descubierto que es útil el uso, como un sustrato de desarrollo, de uno o más sustratos seleccionados entre el grupo que incluye: arroz, maíz, patata, mandioca, tapioca, castañas, guisantes, habas y legumbres libres de gluten de manera natural, en forma de granos inflados o explotados (tales como palomitas de maíz), o en la forma de harinas como tales y/o precocinadas.

45 Con referencia a los tubérculos (patata, tapioca y mandioca) estos tienen que ser previamente cortados en pequeños cubos o tiras, dependiendo de la posibilidad; sin embargo, es posible también usar sus harinas, tanto como tales o precocinadas. Por el contrario, las legumbres (por ejemplo, habas, guisantes, judías y garbanzos) se usan como tales o en una forma seca. Sin embargo, es posible usar cualquier mezcla de las materias primas enumeradas hasta ahora. Ventajosamente, el sustrato se selecciona a partir de arroz y/o maíz; preferentemente en forma de un sustrato inflado o explotado o en forma de harina, usado en solitario y/o en todas las combinaciones simples y/o complejas previsibles. El sustrato preferido, constituido por arroz inflado y/o maíz explotado se introduce en recipientes de vidrio Pirex con una gran abertura, los cuales posteriormente se cierran con un algodón bacteriológico y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

55 A continuación, cada recipiente se inocula con una suspensión de esporas del cultivo de *Penicillium* y se introduce para la incubación, junto con otras muchas suspensiones idénticas que forman un único lote de producción, en termostatos con una temperatura controlada que varía entre 20 y 28°C, en función de las cepas usadas.

60 La naturaleza del sustrato de cultivo y las condiciones de incubación permiten el paso de la forma de espora quiescente a la forma vegetativa; la espora germina y, a partir de cada una, se forman células (hifas), las cuales producen enzimas capaces de transformar las sustancias complejas que existen en el sustrato mencionado anteriormente en moléculas más simples, las cuales son absorbidas por las células y determinan un desarrollo rápido de las mismas.

65 Cada hifa se extiende y se segmenta por sí misma desarrollando dos células hija las cuales llevan a cabo el mecanismo, dando lugar en unos pocos días a largos filamentos. A partir del mayor o menor íntimo entrelazado de

las hifas, se forma un tipo de fieltro de color blanco-grisáceo (micelio), el cual, a continuación, cuando alcanza un nivel de desarrollo bien preciso y cuando las condiciones ambientales son ventajosas, produce hifas particulares en forma de un “cepillo” (conidióforos) con los cuerpos fructíferos, los cuales, a su vez, portan las esporas con un color verde/azul más o menos intenso.

5

El tiempo requerido para el mantenimiento de las esporas cambia de cepa a cepa, pero generalmente, usando pan como sustrato, el ciclo termina después de 12-21 días a partir del inóculo.

10 Cuando se ha completado el desarrollo, se separan uno o más sustratos sujetos de la presente invención, completamente invadidos y recubiertos de micelio y esporas verdes, del recipiente con la ayuda de una solución estéril de agua, sal y agar y se someten a trituración, homogeneización y filtración en instalaciones apropiadas para la extracción de esporas. Al final del procedimiento, se obtiene un líquido de color verde/azul, en el cual están suspendidas las esporas de la cepa de *Penicillium* producida.

15 La etapa de extracción viene seguida por una etapa de normalización del valor cuantitativo de las esporas, un objetivo que se logra mediante la adición de una fracción adicional de solución estéril en agua, sal y agar hasta que se alcanza la misma densidad óptica de una muestra de referencia de la cepa, evaluada mediante comparación nefelométrica. El procedimiento descrito anteriormente permite ya certificar al cultivo de *Penicillium* fabricado de este modo como un cultivo “libre de gluten”, no habiéndose usado en ninguna etapa del procedimiento productivo ningún
20 ingrediente, excipiente o sustancia que contenga gluten de manera natural.

No obstante, para garantizar un nivel de seguridad adicional, el Solicitante ha asociado ventajosamente con dicha metodología de producción un tratamiento con enzimas proteolíticas capaces de degradar el gluten, si es que existe, procedente de contaminaciones cruzadas accidentales que será llevado a cabo sobre la suspensión de esporas
25 obtenida a partir de los sustratos anteriormente descritos.

Por lo tanto, con la presente divulgación, el Solicitante es capaz de proporcionar una metodología que prevé un doble nivel de seguridad, capaz de eliminar también el posible riesgo debido a la presencia de trazas de gluten
30 usadas por contaminaciones cruzadas ocurridas a lo largo de la cadena de producción de las materias primas usadas.

El tratamiento enzimático, sujeto de la presente divulgación, ha sido definido después de haberse evaluado múltiples enzimas proteolíticas, tanto proteasas como peptidasas y sus mezclas, tales como tripsina, quimotripsina, pancreatina, pepsina, papaína y bromelaína.
35

Ventajosamente, se usan pepsina y bromelaína, o mezclas de las dos enzimas, en una relación de 1:10 a 10:1 de las mismas; preferentemente, en una relación en peso de 1:5 a 5:1.

40 La pepsina es una enzima contenida en el jugo gástrico que promueve la digestión de los alimentos. La pepsina es una proteasa que trabaja mejor en ambiente ácido y es capaz de romper las proteínas en muchos puntos diferentes y en desorden. Su acción hidrolítica es debida a un sitio activo que contiene dos restos de ácido aspártico. Es extraída, en particular, a partir de la mucosa gástrica de los cerdos, o a partir del cuarto estómago de los rumiantes, en particular bovinos. Se encuentra disponible en el mercado tanto en forma líquida como en polvo con un valor cuantitativo diferente, expresado en Unidades Enzimáticas, o para el tipo bovino, usado en la industria láctea con el
45 fin de coagular la leche y efectuar la maduración del queso, en MCU (Unidades de Coagulación de la Leche). La bromelaína es una mezcla de proteinasa compleja generalmente extraída a partir del tronco de la piña tropical, aunque están presentes en su pulpa enzimas similares. La bromelaína se encuentra disponible en polvo con una actividad enzimática expresada en GDU (Unidades de Digestión de Gelatina) o MCU (Unidades de Coagulación de la Leche). 1 MCU es equivalente a aproximadamente 2/3 de GDU.
50

La hidrólisis del gluten tiene lugar en un intervalo bastante amplio de temperatura, de 5 a 60°C; preferentemente, de 30 a 50°C. El valor del pH está entre 1 y 7; preferentemente, de 4 a 7. En particular, el pH para la pepsina está entre 1,8 y 6,0 y para la bromelaína el pH está entre 3,5 y 6,5.

55 Ventajosamente, la temperatura está entre 30 y 40°C; preferentemente, es de 37°C para la pepsina. Ventajosamente, la temperatura está entre 40 y 50°C; preferentemente, es de 45°C para la bromelaína.

El tiempo de hidrólisis está entre 5 y 60 horas, preferentemente de 15 a 50 horas.

60 Para la definición de las condiciones de trabajo con las cuales ha de llevarse a cabo el tratamiento enzimático, adecuado para la eliminación de toda presencia de gluten en los cultivos de mildiu producidos con sustancias libres de gluten de manera natural, se han realizado experimentos, en los cuales, a dichos cultivos se han añadido voluntariamente cantidades conocidas de gluten, para situar la concentración final en un intervalo que varía entre 3 y 20 ppm. Dichas concentraciones de gluten simulan la situación más grave que podría producirse después de
65 contaminaciones cruzadas ocurridas en la cadena de producción de los alimentos y sustancias libres de gluten de manera natural, usadas como sustancias de desarrollo para el mildiu.

En los experimentos, llevados a cabo con el fin de hidrolizar el gluten voluntariamente añadido, se ha usado pepsina líquida con un valor cuantitativo entre 300 y 800 MCU, ventajosamente con un valor cuantitativo igual a 500 MCU, y bromelaína en polvo con un valor cuantitativo entre 1550 y 3000 GDU, ventajosamente con un valor cuantitativo igual a 2.200 GDU.

5 Se han llevado a cabo varios ensayos, variando de vez en cuando la concentración final de las enzimas, usadas en solitario y mezcladas, o las condiciones de trabajo de la hidrólisis (temperatura, pH del mildiu y tiempo de acción).

10 La eliminación completa de la cantidad máxima de gluten añadido, igual a 20 ppm, se ha llevado a cabo preferentemente con el uso simultáneo de pepsina (con un valor cuantitativo igual a 500 MCU) y bromelaína (con un valor cuantitativo igual a 2.200 MCU), para una duración total de 20-28 horas, por ejemplo 24 horas, con una temperatura entre 24 y 30°C a un pH controlado entre 4 y 5. Después del tratamiento enzimático y la aprobación del lote por el Control de calidad, se lleva a cabo el envasado en recipientes estériles.

15 Conforme a la reglamentación Europea que entrará en vigor a finales de 2005, únicamente un queso veteadado azul producido con mildius fabricados con la tecnología sujeto de la presente invención proporcionará garantías absolutas sobre la ausencia de gluten en él. Por lo tanto, para este queso será innecesaria cualquier mención en la etiqueta concerniente a la presencia de gluten.

20 Aunque, en lo concerniente a las materias primas usadas como sustancias de desarrollo, se han indicado ya un número suficiente de datos, a continuación se enumeran algunas realizaciones preferidas relativas al tratamiento enzimático meramente a modo de ejemplo, lo cual no limita la importancia de la presente invención.

25 En estas realizaciones preferidas, las condiciones de trabajo son tales que la actividad biológica de las esporas de mildiu y, por lo tanto, su capacidad para asegurar un óptimo veteadado azul y maduración de los quesos azules, están protegidas.

30 Por ejemplo, en una realización preferida se usa: a) concentración de bromelaína: de 0,1 a 0,4 g/litro de mildiu (igual a 220-880 GD/l); pH de la hidrólisis: 4,4-4,6; temperatura de la hidrólisis: 22-28°C (por ejemplo, 24°C); duración de la hidrólisis: 24-48 horas.

35 Por ejemplo, en otra realización preferida se usa: b) concentración de pepsina: de 0,2 a 0,4 g/litro de mildiu (igual a 100-200 MCU/l); pH de la hidrólisis: 4,4-4,6; temperatura de la hidrólisis: 22-28°C (por ejemplo, 24°C); duración de la hidrólisis: 24-48 horas.

40 Por ejemplo, en otra realización preferida más se usa: c) concentración de bromelaína: de 0,05 a 0,2 g/litro de mildiu (igual a 110-440 GDU/l); concentración de pepsina: de 0,1 a 0,2 ml/litro de mildiu (igual a 50-100 MC/l); pH de la hidrólisis: 4,4-4,6; temperatura de la hidrólisis: 22-28°C (por ejemplo, 24°C); duración de la hidrólisis: 24-48 horas.

45 Ventajosamente, con el procedimiento sujeto de la presente divulgación, la cantidad final de gluten determinada con el ensayo más sensible actualmente disponible en el mercado, siempre resulta no determinable. En este caso, es posible asegurar la ausencia de gluten en los cultivos producidos con la metodología de la presente divulgación. Los controles analíticos relativos a las concentraciones de gluten han sido llevados a cabo con el kit de gliadina ELISA RIDASCREEN® de R-Biopharm A, Darmstadt, Alemania, para el análisis cuantitativo de la gliadina y la prolamina correspondiente. A partir de la revista "Approaches to Establish Thresholds for Major Food Allergens and for Gluten in Food" - Draft Report of the U.S. Food and Drug Administration, Junio de 2005, puede concluirse que el kit analítico usado para la determinación de las concentraciones de gluten es uno de los pocos confirmados, el más sensible, cuantitativo y específico para la diferentes gliadinas.

50 Las realizaciones adicionales son las siguientes:

Una realización preferida de la presente divulgación se refiere a esporas o mildiu de la especie *Penicillium roqueforti* seleccionadas entre el grupo constituido por los microorganismos tal como se desvelan en la Tabla 1 anteriormente.

55 Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición que comprende al menos un cultivo de esporas o mildius libre de gluten se caracteriza porque dicho cultivo es del género *Penicillium* y porque se obtiene mediante un sustrato de cultivo libre de gluten.

60 Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que el cultivo de esporas o mildius es de la especie *Penicillium roqueforti*.

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que dicho cultivo se selecciona entre el grupo constituido por los microorganismos tal como se han descrito anteriormente en la Tabla 1.

65 Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que el sustrato de cultivo se selecciona entre aquellos de origen vegetal.

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que el sustrato de cultivo se selecciona entre el grupo que incluye: arroz, maíz, patata, mandioca, tapioca, castañas, guisantes, habas, judías y legumbres o sus mezclas libres de gluten de manera natural.

5

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que el sustrato de cultivo es una mezcla que incluye arroz y maíz.

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que el sustrato está en forma de granos inflados o explotados o en forma de harinas como tales y/o precocinadas.

10

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento que incluye al menos una etapa en la que al menos un sustrato, tal como se ha definido anteriormente, se inocula con una suspensión de esporas intermedia de la especie *Penicillium roqueforti*; preferentemente, dichas esporas se seleccionan entre el grupo de los microorganismos tal como se han descrito anteriormente en la Tabla 1.

15

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que la inoculación se lleva a cabo durante el tiempo requerido y en condiciones de temperatura tales que se permite la maduración de las esporas.

20

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que está prevista, además, una etapa de separación de una solución líquida, que contiene el cultivo de esporas, del sustrato usado.

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que está prevista, además, una etapa de deshidratación de dicha solución para obtener el cultivo de esporas en una forma liofilizada, pulverizada o pulverulenta.

25

Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a una composición que comprende al menos un cultivo de esporas o mildiu libre de gluten tal como se ha desvelado anteriormente en la Tabla 1; preferentemente, dichas esporas se seleccionan entre el grupo de microorganismos tal como se han desvelado anteriormente.

30

Otra realización preferida de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto lácteo con veteado azul que incluye al menos una etapa en la que se usa dicha composición que incluye al menos un cultivo de esporas libre de gluten.

35

Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a un producto lácteo con veteado azul obtenido según el procedimiento desvelado anteriormente.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de un cultivo de esporas libre de gluten del género *Penicillium*, preparado según el procedimiento desvelado anteriormente, para la preparación de un producto lácteo con veteado azul destinado a personas afectadas por enfermedad celiaca; preferentemente, dichas esporas pertenecen a la especie *Penicillium roqueforti*; más preferentemente, se seleccionan entre el grupo según la Tabla 1.

40

Una realización preferida adicional de la presente invención se refiere al uso de un sustrato de cultivo seleccionado entre el grupo que incluye: arroz, maíz, patata, mandioca, tapioca, castañas, guisantes, habas, judías y legumbres o sus mezclas libres de gluten de manera natural para la preparación de un cultivo de esporas o mildiu libre de gluten del género *Penicillium*, preferentemente, de la especie *Penicillium roqueforti*; más preferentemente, dichas esporas se seleccionan entre el grupo según la Tabla 1.

45

Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición que incluye al menos un cultivo de esporas o mildiu libre de gluten, estando dicho procedimiento caracterizado porque dicha composición se prepara según el procedimiento desvelado anteriormente y porque es sometida adicionalmente a un tratamiento enzimático para eliminar trazas de gluten, si hubiera alguna, existentes en esta última composición.

50

Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que dichas esporas o mildius pertenecen al género *Penicillium*; preferentemente a la especie *Penicillium roqueforti*; más preferentemente, se seleccionan entre el grupo según la Tabla 1.

60

Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que las posibles trazas de gluten existentes en dicha composición a tratar provienen de contaminaciones accidentales, no intencionadas o cruzadas.

Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que el tratamiento enzimático prevé el uso de al menos una enzima proteolítica.

65

Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que la enzima proteolítica se selecciona entre el grupo que incluye: proteasas y peptidasas.

- 5 Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que las proteasas y peptidasas se seleccionan entre el grupo que incluye: tripsina, quimotripsina, pancreatina, pepsina, papaína y bromelaína; preferentemente, las proteasas y las peptidasas se seleccionan entre pepsina y/o bromelaína.

- 10 Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que dicha al menos una enzima proteolítica añadida a la composición, preparada según el procedimiento desvelado anteriormente, hidroliza las trazas de gluten, si hubiera alguna, existentes en esta última composición.

- 15 Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que la hidrólisis tiene lugar a un valor de pH entre 1 y 7, preferentemente de 4 a 5; a una temperatura entre 5 y 60°C, preferentemente de 30 a 50°C y en un periodo entre 5 y 60 horas, preferentemente de 15 a 50 horas.

- 20 Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a dicho procedimiento, en el que la hidrólisis se lleva a cabo con pepsina y/o bromelaína en las siguientes condiciones: pH entre 4,4 y 4,6; temperatura entre 22 y 28; y un periodo entre 24 y 48 horas.

- Una realización adicional de la presente divulgación se refiere a una composición que incluye al menos un cultivo de esporas o mildiu libre de gluten obtenido según el procedimiento desvelado anteriormente; preferentemente, dichas esporas o mildius se seleccionan entre el grupo según la Tabla 1.

- 25 Una realización preferida adicional de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto lácteo con veteado azul que incluye al menos una etapa en la que se usa una composición que incluye al menos un cultivo de esporas o mildiu libre de gluten, tal como se ha desvelado anteriormente.

- 30 Una realización adicional de la presente divulgación se refiere a un producto lácteo con veteado azul obtenido según el procedimiento desvelado anteriormente.

- 35 Una realización adicional de la presente invención se refiere al uso de un cultivo de esporas libre de gluten del género *Penicillium* preparado según dicho procedimiento, para la preparación de un producto lácteo con veteado azul destinado a personas afectadas por enfermedad celiaca; preferentemente, dichas esporas pertenecen a la especie *Penicillium roqueforti*; más preferentemente, se seleccionan entre el grupo según la Tabla 1.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un cultivo de esporas o mildiu libre de gluten que pertenece al género *Penicillium* en un procedimiento para la preparación de un producto lácteo con veteado azul libre de gluten, cultivando al menos un cultivo de esporas o mildiu que pertenece al género *Penicillium* en un sustrato de cultivo libre de gluten de origen vegetal seleccionado entre el grupo que incluye arroz, maíz, patata, mandioca, tapioca, castañas, guisantes, habas y legumbres o sus mezclas.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho al menos un cultivo de esporas o mildiu pertenece a la especie *Penicillium roqueforti*.
3. El uso según la reivindicación 2, en el que dicha al menos una espora o mildiu de la especie *Penicillium roqueforti* se selecciona entre el grupo constituido por los siguientes microorganismos:

<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17815
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17816
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17817
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17818
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17819
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17820
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17821
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17822
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17823
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17824
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17825
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17826
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17827
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17828
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17829
<i>Penicillium roqueforti</i>	DSM 17830

- 15 que fueron depositados por el Solicitante a cargo del centro de recogida DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*; Braunschweig - Alemania) el 21/12/2005.
4. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato de cultivo está en forma de granos inflados o explotados o en forma de harinas como tales y/o precocinadas.
5. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho sustrato de cultivo libre de gluten se selecciona entre arroz y/o maíz.
- 25 6. El uso según la reivindicación 5, en el que dicho cultivo libre de gluten está constituido por arroz inflado y/o maíz explotado.