(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 637 822**

(51) Int. CI.:

A23J 3/18 (2006.01)
C12C 1/02 (2006.01)
A23L 5/20 (2006.01)
A23L 5/30 (2006.01)
A23L 7/10 (2006.01)
A23L 7/196 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2013 PCT/IB2013/000797**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053891**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2013 E 13731862 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2903453**

(54) Título: **Método de destoxificación de proteínas de gluten de granos de cereales**

(30) Prioridad:

02.10.2012 IT RM20120468

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2017

(73) Titular/es:

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FOGGIA (100.0%)
Via Gramsci, 89/91
71122 Foggia, IT

(72) Inventor/es:

DI LUCCIA, ALDO;
LAMACCHIA, CARMELA y
GIANFRANI, CARMELA

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Método de destoxificación de proteínas de gluten de granos de cereales

La presente invención propone un método de destoxificación de proteínas de gluten de los granos de cereales, en particular, de granos de trigo, destinado a la obtención de harinas destoxificadas para la preparación de pan y productos de pasta a partir del trigo, preferentemente aptas para la alimentación de pacientes celíacos, pero también adecuadas por sus características organolépticas y por su aspecto para la alimentación de toda la población.

Notas técnicas

El gluten es un componente alimentario constituido principalmente por proteínas. Las prolaminas representan aproximadamente el 80 % de toda la fracción proteica presente en la cariopsis del cereal y están constituidas principalmente por gliadina y glutenina.

Las gliadinas son moléculas monoméricas clasificadas normalmente en alfa, beta, gamma y omega (de acuerdo con su movilidad electroforética), para las que la condición monomérica se debe a la ausencia de restos de cisteína, como es el caso de las omega-gliadinas, o a la presencia de solo enlaces disulfuro intramoleculares (el resto de gliadinas).

Sin embargo, las gluteninas son un polímero complejo, que consiste en subunidades de alto peso molecular (SG-APM) y de bajo peso molecular (SG-BPM), estabilizadas por puentes disulfuro intermoleculares. La gliadina y la glutenina confieren propiedades tecnológicas a la harina; las gliadinas contribuyen a la viscosidad de la masa, mientras que las gluteninas son responsables de la elasticidad y de la tenacidad de la misma.

En particular, la cantidad y el tamaño de los polímeros de glutenina se correlacionan positivamente con las propiedades tecnológicas de la masa.

Estas características de los polímeros de glutenina dependen, por tanto, de la capacidad de las subunidades individuales para formar polímeros más o menos extendidos. El gluten, en particular, no está presente en la cariopsis del cereal, sino que se forma en un momento posterior; el gluten como complejo proteico se forma como consecuencia de la hidratación y del amasado de la masa, y constituye un elemento esencial para la producción de la harina y del pan, ya que confiere viscosidad y elasticidad a la masa. Como se sabe, cuando se añade agua a la harina, las gliadinas (que consisten en una proteína monocatenaria) comienzan a combinarse entre sí, formando fibrillas (fibras pequeñas y finas) que confieren extensibilidad a la masa de gluten. Simultáneamente, también las gluteninas (compuestas de diferentes subunidades proteicas) se combinan entre sí, creando fibras de mayores dimensiones y formando una estructura, estable y muy cohesiva, que da consistencia y una cierta resistencia a la masa. Por lo tanto, la fuerza y el grado de fermentación de la masa dependen de la proporción entre el contenido de gliadina y de glutenina en la harina. La relación entre las dos clases de proteínas depende de la variedad de cereal, y da al gluten la capacidad de deformarse y resistir la distensión.

Durante la acción mecánica del amasado, las fibrillas de las fibras de glutenina y de gliadina comienzan a entrelazarse entre sí, formando una malla tridimensional que incorpora gránulos de almidón (Fig. 1), lípidos, minerales, agua y burbujas de aire, siendo estas últimas un producto muy importante de la fermentación alcohólica de la levadura. Cuando se añade la levadura a la masa, la producción de alcohol y de dióxido de carbono determina la expansión de las mallas de gluten, que se ensanchan y se relajan para hacer crecer el volumen de la misma masa. La posterior cocción determina la desnaturalización/coagulación de las proteínas y, así, el gluten, que pierde la capacidad de extenderse, estabiliza de manera irreversible la estructura y la forma de la masa.

El gluten como complejo proteico no tiene propiedades nutritivas particulares, ya que es pobre en aminoácidos esenciales tales como la lisina, la metionina y el triptófano.

La ausencia de este compuesto en la dieta no implica ningún riesgo nutricional específico.

Por otra parte, el gluten es capaz de realizar una actividad tóxica, en particular, contra la mucosa intestinal, por lo que la intolerancia permanente al gluten del trigo y a las proteínas correspondientes del centeno, de la cebada y de la avena, que activa la cascada inflamatoria de citocinas inflamatorias, se define como enfermedad celíaca.

Inicialmente, se creía que la acción tóxica del gluten podía atribuirse a la fracción de alfa-gliadina; posteriormente, se demostró que incluso las omega-gliadinas y gluteninas son capaces de inducir daño en la mucosa intestinal, así como las prolaminas de cereales relacionados tales como la cebada (ordeína), el centeno (secalina) y la avena (avenina).

Es de interés reciente el estudio de un péptido de 33 aminoácidos de dicha alfa-gliadina, denominado 33-mer. Dicho péptido es capaz de resistir la actividad proteolítica de las enzimas digestivas que alcanzan intacta la mucosa intestinal, donde, al tener una alta afinidad por la transglutaminasa tisular, ejerce una potente acción inmunogénica

en los individuos en riesgo; dicha acción se determinaría, tras la desaminación de los epítopos tóxicos del péptido, mediante una activación intensa de los linfocitos TCD4, que liberan citocinas inflamatorias (Shuppan *et al*., 2009).

Además, se ha demostrado que otros epítopos tóxicos de alfa-gliadina podrían inducir la apoptosis de los enterocitos derivados de explantes de la mucosa intestinal de pacientes celíacos.

Por lo tanto, el gluten ejerce un efecto perjudicial sobre la mucosa intestinal mediante la activación de la cascada inflamatoria de citocinas y causando un efecto tóxico directo. La terapia a través de la dieta de la enfermedad celíaca se basó inicialmente en la eliminación total de la dieta de todos los granos y alimentos que contenían gluten (especialmente del pan y de la pasta, productos bien conocidos obtenidos del trigo y otros alimentos de la alimentación mediterránea) en el momento en que aparecían los síntomas de dicha intolerancia, tales como el dolor abdominal, la distensión abdominal, la gastritis, la estomatitis aftosa, los trastornos del estado de ánimo, los dolores de cabeza, etc. Este tratamiento permitía a los pacientes reducir los síntomas y recuperar la estructura de la mucosa intestinal, si presentaban las lesiones típicas. Dicha terapia, sin embargo, implica la dificultad de su continuación en el tiempo, ya que crea enormes limitaciones en la dieta de los pacientes y, por consiguiente, en las actividades sociales relacionadas con la comida. Con el fin de resolver estos problemas, se decidió producir alimentos sin gluten para las personas intolerantes al gluten o alimentos en los que el gluten no pudiera activar la reacción inflamatoria, a fin de permitir a los pacientes tener un estilo de vida normal mediante el consumo de alimentos parcialmente parecidos en sabor y aspecto al pan y a la pasta.

Actualmente, se conocen algunos métodos gracias a los cuales se ha desactivado parcialmente la acción tóxica del gluten.

Un método en fase experimental que no ha mostrado el efecto deseado ha sido la creación de trigo destoxificado mediante manipulación genética, es decir, modificado de modo que no contenga las secuencias inmunogénicas que rigen la producción de los epítopos tóxicos del gluten que pueden estimular los linfocitos T.

Una primera limitación de este método consiste en la dificultad de identificar todas las secuencias de genes (actualmente aproximadamente cuarenta, situadas en seis locus de dos cromosomas distintos) que dirigen la codificación de los péptidos inmunológicamente activos contenidos dentro de la estructura primaria de las proteínas de gluten. Este método, además, no garantiza un determinado resultado, ya que existe una alta posibilidad de que todavía se desconozcan secuencias de genes que codifiquen otros epítopos tóxicos.

Otra limitación podría ser la falta de confianza del consumidor en el consumo durante un tiempo prologando de productos "modificados genéticamente" y, por tanto, la dificultad de que dichos productos se introduzcan en el mercado con un destino genéricamente dirigido a toda la población.

Otro método de la técnica anterior, sin embargo, proporciona el uso de enzimas (Rizzello *et al.,* 2007), tratándose de una complementación con endopeptidasa de origen bacteriano añadida durante la preparación de la harina, capaz de fragmentar las proteínas de gluten y, en particular, el fragmento 33-mer. Una limitación de este método es que resulta muy caro, porque implica el uso de enzimas purificadas; su uso potencial es solo en los alimentos destinados a los pacientes celíacos y se vuelve, por consiguiente, muy caro por los altos costos de producción.

Una segunda limitación de este método es que el uso de estas enzimas genera la destrucción total de la red del gluten y, por consiguiente, la pérdida de propiedades tecnológicas de la masa, que no se pueden usar para los procesos de transformación del pan o de la pasta y, por tanto, es necesario recurrir a trucos para estructurar dichas sustancias (gomas, polisacáridos, almidón pregelatinizado, agar, etc.).

Otro método conocido en la técnica anterior es el uso de enzimas microbianas (transglutaminasa) en presencia de metiléster de lisina para destoxificar, por desamidación, los epítopos tóxicos presentes en la gliadina del trigo (Gianfrani *et al.,* 2007). Este método tiene la ventaja, en comparación con los métodos anteriores, de preservar la red del gluten y mantener, por tanto, las propiedades tecnológicas de las harinas. Una limitación de este método es que resulta muy caro, porque implica el uso de enzimas purificadas; su uso potencial es solo en los alimentos destinados a los pacientes celíacos y se vuelve, por consiguiente, muy caro por los altos costos de producción.

Otra limitación significativa es que la destoxificación depende de la concentración tanto de las proteínas tóxicas como de la enzima microbiana, así como de la cinética de la reacción. Por estas razones, los experimentos pueden no dar un resultado determinado.

Una alternativa para resolver el problema de la intolerancia al gluten podría ser el uso de inhibidores de la zonulina (Fasano, 2008), una proteína que parece desempeñar un papel clave en la alteración de la permeabilidad intestinal.

Este método, sin embargo, descuida el hecho de que la transmisión de la gliadina tóxica no se produce solo por vía intercelular (que puede ser bloqueada por el inhibidor de la zonulina), sino también por vía intracelular. El documento US2011/0293724 desvela un método de reducción de la toxicidad de las proteínas de gluten mediante el tratamiento de productos alimenticios que comprenden gluten *in vitro* con una glutenasa.

Cristina Mitea *et al*. ("A Universal Approach to Eliminate Antigenic Properties of Alpha-Gliadin Peptides in Celia Disease", publicado el 16 de diciembre de 2010) propone el desarrollo de genes que codifiquen alfa-gliadinas que sean seguras para su consumo por pacientes con la enfermedad celíaca.

Samantha Stoven *et al*. ("Celiac Disease: Advances in Treatment via Gluten Modification", 2012) revisa algunas nuevas terapias para la enfermedad celíaca, incluyendo alternativas al trigo y la selección del trigo, la alteración enzimática del trigo, suplementos enzimáticos orales y aglutinantes poliméricos.

El documento CN 101623064 desvela un método de obtención de harina de trigo baja en gluten usando calentamiento con microondas.

El documento WO01/54519 desvela el tratamiento térmico de los granos usando energía de microondas para la reducción del contenido de microorganismos, y la inactivación de ciertas enzimas y de la vitalidad del gluten. Es por esta necesidad, es decir, la de producir alimentos típicos de la dieta mediterránea tales como el pan y la pasta derivados del trigo, en los que el gluten no sea tóxico para las personas con enfermedad celíaca, y que puedan ser consumidos, por su sabor y aspecto, por toda la población, que se creó la presente invención.

El fin de la presente invención es superar dichas desventajas de la técnica anterior proponiendo un método de destoxificación de las proteínas de gluten, en particular, de los granos de trigo, y también de otros cereales, mediante su exposición a microondas, tras haberlos sometido a un proceso de hidratación.

La presente invención, en efecto, tiene por objeto resolver, en particular, el problema técnico de la producción de alimentos, pan y pastas destinados a pacientes con enfermedad celíaca, y la privación de la harina de la acción tóxica del gluten sin perder sus propiedades técnicas para formar la masa.

Más concretamente, la presente invención, mediante el tratamiento del grano maduro con microondas, desea resolver principalmente el problema técnico de la producción de harinas con gluten destoxificado que, al mismo tiempo, sean adecuadas para la producción técnica de pasta, pan, así como la producción de productos de panadería de trigo, sin perder la formación de la red del gluten.

Por último, la presente invención, a través de la producción de harinas y, por consiguiente, de productos alimenticios tales como pan y pastas, destoxificados de los epítopos tóxicos del gluten, tiene por objeto producir alimentos derivados del trigo y equivalentes en sabor y aspecto a los usados comúnmente en la alimentación mediterránea, que determinen, a través de su uso en el tiempo y por una gran parte de la población, no solo en personas con enfermedad celíaca, una reducción de la incidencia de la enfermedad celíaca en la población y, por consiguiente, también del impacto económico de la producción de determinados productos alimenticios para las personas con enfermedad celíaca.

Esto se ha logrado con un método de destoxificación de acuerdo con la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá ahora, de manera ilustrativa, pero sin limitación, con referencia particular a las figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 muestra la red tridimensional que incorpora los gránulos de almidón y que se forma en presencia de agua, durante la acción mecánica del amasado, a partir de la unión de la gliadina y de la glutenina;
la Figura 2 muestra el perfil electroforético de las gliadinas extraídas de diferentes muestras (A, B, C, D, E, F, G, H) de las cuales las muestras A y B se trataron con el método de destoxificación de la presente invención;
la Figura 3 muestra el perfil proteico de la semolina destoxificada (la Fig. 3a es la proteína soluble y la proteína insoluble es la Fig. 3b) por medio del análisis de SE-HPLC;
la Figura 4 muestra un gráfico que muestra la producción de interferón en estirpes de linfocitos T generadas por la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad celíaca;
la Figura 5 muestra la red del gluten que se forma después del tratamiento en los granos maduros por microondas (a) y la red del gluten que se forma de manera natural (b);
la Figura 6 muestra el modo de enmascarar el epítopo tóxico después del tratamiento de destoxificación, tal como volviendo el sitio de unión de las gliadinas inaccesible e/o irreconocible a nivel intestinal por la transglutaminasa, que, en las condiciones de la enfermedad celíaca, induce la respuesta inmune.

Descripción de la invención

En la presente invención, se describe un método que proporciona la destoxificación de las proteínas de gluten, en particular, del grano de trigo.

El método de preparación de dicha harina destoxificada mediante epítopos tóxicos del gluten comprende las siguientes fases:

A) Hidratación de los granos, en particular, los del trigo, con agua de la red principal durante aproximadamente 1 hora; para 100 gramos de granos maduros, se añaden 500 ml de agua. Esta fase es necesaria para desencadenar las reacciones químicas funcionales para la destoxificación de las proteínas del gluten.
B) Retirada del agua. Esta fase se lleva a cabo drenando con un tamiz para retener los granos y retirar el agua.
C) Tratamiento por microondas de los granos hidratados durante dos minutos usando una potencia de 1000 vatios. En esta fase, lo que es importante no es la temperatura dentro del horno, sino la potencia de las ondas electromagnéticas que desencadenan, a través del agua contenida en los granos, las reacciones de destoxificación.
D) Enfriamiento de los granos de cereal tratados con microondas a temperatura ambiente (20-22 ºC).

Todas las fases descritas anteriormente son obligatorias: la hidratación de los granos durante una hora permitiendo a la semilla acumular la cantidad de agua necesaria para desencadenar, en presencia de ondas electromagnéticas, las reacciones de destoxificación del gluten.

Basta con la potencia de 1000 vatios, aplicada de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito durante dos minutos para que la energía acumulada por el agua favorezca la producción de radicales de oxígeno singlete, radicales hidroxilo o hidrógeno por el metabolismo celular (peroxidasas, lipoxigenasa, etc.). Estos compuestos altamente reactivos del interior de la semilla de trigo implican reacciones de polimerización de las proteínas de gluten ubicadas en sectores distintos de la cariopsis (cuerpos proteicos presentes en la capa de aleurona y cuerpos proteicos presentes en el endosperma) mediante enlaces intermoleculares y/o enlaces intramoleculares con cambio de configuración.

El enfriamiento lento hasta una temperatura de aproximadamente 20 ºC permite completar las reacciones químicas generadas por la acción de las ondas electromagnéticas y el agua.

El método ilustrado en la presente invención se basa en el análisis de estudios recientes en los que Lamacchia y otros (2010) han informado que, cuando se aplican altas temperaturas a la cariopsis del trigo, las proteínas experimentan cambios que no son similares a los observados en sistemas modelo, que consisten únicamente en gluten (Schofield *et al.,* 1983; Singh y MacRitchie, 2004), ni a los observados en la pasta durante los ciclos de secado.

En particular, las albúminas y las globulinas no se incorporan a los polímeros de alto peso molecular, pero coagulan e interactúan con las gliadinas formando un agregado de peso molecular intermedio al de las gliadinas, y las albúminas y las globulinas se revelaron como un nuevo pico denominado pico de "proteína intermedia" (PI).

La participación de las ω-gliadinas en estos cambios sugiere que la interacción entre las proteínas no solo tiene lugar a través de la formación de enlaces disulfuro, sino también a través de la formación de enlaces covalentes que implican restos de tirosina.

Los investigadores Lamacchia y otros (2010) explicaron este fenómeno basándose en el hecho de que, en la cariopsis del trigo, el gluten todavía no se ha formado, y las proteínas de gluten se depositan en diferentes cuerpos proteicos (Rubin *et al*., 1992, Krishnan *et al*., 1986; Lending *et al*., 1989).

En un estudio reciente, Tosi y otros (2009) confirmaron, de hecho, que los componentes de APM son particularmente abundantes en la capa más interna de la cariopsis del trigo (endospermo), encontrándose prácticamente ausentes en la capa subaleurónica que, sin embargo, es rica en gliadinas y componentes de BPM.

Este patrón de deposición se mantiene durante toda la fase de desarrollo de la cariopsis del trigo y continúa incluso después de la fusión de los cuerpos proteicos y la formación de la matriz amilácea.

Por lo tanto, la segregación de las proteínas del gluten en los cuerpos proteicos cuando se encuentran en la cariopsis y la aplicación de altas temperaturas en esta fase antes de la molienda, permitiría a dichas proteínas experimentar cambios estructurales tales como no volverlas reconocibles por la transglutaminasa intestinal. bloqueando la cascada de citocina inflamatoria.

Los granos, hidratados y sometidos a tratamiento con microondas, generan radicales de agua que activan la polimerización de las proteínas del gluten.

Esta polimerización parece verse favorecida cuando las proteínas de gluten son segregadas en los cuerpos proteicos debido al hecho de que, dentro de estos cuerpos proteicos, están muy próximas entre sí, permitiendo una fácil interacción entre las diversas clases dependiendo del tipo de proteína corporal en la que se encuentren. En el caso de los cuerpos proteicos vacuolares (capa aleurónica), se pueden producir interacciones entre las gliadinas, los componentes de BPM y las albuminas/globulinas; en el caso de los cuerpos proteicos de tipo endoplásmico (capa del endosperma) solo se pueden producir interacciones entre los componentes de APM.

La polimerización inducida por el agua y por las ondas electromagnéticas no determina la pérdida de grupos

sulfhidrilo libres, necesarios para la formación del gluten, dando lugar a una red de proteínas aunque de configuración diferente (Fig. 5a) (debido a la interacción de los diferentes agregados mencionados anteriormente) de la red de gluten que se forma de manera natural (Fig. 5b), pero que garantiza las propiedades tecnológicas adecuadas de transformación de la harina de trigo en un producto final.

La polimerización de las proteínas de gluten por radicales de agua favorecida por las ondas electromagnéticas produce la formación de enlaces covalentes entre estas proteínas de gluten. La formación de estos enlaces entre las proteínas de gluten dentro de los cuerpos proteicos permite una especie de enmascaramiento del epítopo tóxico, como se muestra en la Figura 6, de modo que el sitio de ataque de las gliadinas se vuelve inaccesible y/o no reconocible a nivel intestinal por la transglutaminasa que, en condiciones de enfermedad celíaca, induce la respuesta inmune. Los cambios estructurales de las proteínas de gluten de las harinas destoxificadas se destacan a través del ensayo que puede determinar el índice de gluten, evaluando la fuerza las mismas.

El gluten de las harinas destoxificadas, que pasan completamente a través de la rejilla del dispositivo, experimenta una lixiviación de los componentes del grano, evidenciando la presencia de cambios estructurales en la proteína de gluten.

Estos cambios estructurales del gluten de las harinas destoxificadas se analizan mejor en las Figuras 2 y 3. La Figura 2 muestra el cambio del patrón proteico de las gliadinas extraídas de diferentes muestras de granos tratadas con el método de destoxificación objeto de la presente invención (A y B - semolina de trigo duro), en comparación con otras muestras no tratadas (C, D, E - semolina de trigo duro, F, G, H - harina de trigo blando), siendo las gliadinas proteínas de gluten que son solubles en alcohol, que contienen epítopos tóxicos reconocidos en el intestino.

La reducción de la intensidad de las bandas de electroforesis indica un cambio cualitativo y cuantitativo de las gliadinas.

El cambio cuantitativo se debe a que la mayoría de ellas, debido a los procesos de polimerización inducidos por el tratamiento de microondas, se han vuelto insolubles en una solución de etanol hasta el 70 % y, por lo tanto, no son detectables en el gel de electroforesis.

El cambio cualitativo se debe a que las pocas bandas visibles son, no obstante, agregados de gliadinas (que sufren una polimerización por microondas) hasta el peso molecular más bajo y, por tanto, se pueden extraer en solución de etanol y detectarse en el gel de electroforesis, pero, sin embargo, no son tóxicos de acuerdo con los hallazgos inmunológicos realizados *in vitro* (Fig. 4).

Las Figuras 3a y 3b, por otro lado, muestran dos gráficos que indican el perfil proteico de las proteínas respectivamente solubles e insolubles, extraídas de granos destoxificados (las curvas con tonos de gris oscuro) y de granos sin tratar (la curva con tonos de gris más claro) mediante SE-HPLC. La Figura 3a indica dos picos principales, uno a la derecha, que representa los polímeros de alto peso molecular (APM y BPM); el de la izquierda representa los oligómeros y monómeros de gliadina. El gráfico muestra la disminución de la solubilidad de las proteínas de gluten después del tratamiento de destoxificación de la presente invención.

La Figura 3b indica un aumento de los dos picos en la harina destoxificada, que indica un aumento en las proteínas insolubles después del tratamiento de destoxificación.

Estos cambios estructurales de las proteínas de gluten podrían privar al gluten de su toxicidad, gracias a un enmascaramiento del sitio de ataque de la transglutaminasa (Fig. 6) y permitir el mantenimiento de las propiedades técnicas de la masa debido al mantenimiento de los grupos sulfhidrilo libres, necesarios para la formación de la red de gluten (Fig. 5a y 5b).

En cuanto a la pérdida de toxicidad del gluten presente en las harinas tratadas, la Figura 4 muestra un gráfico de un ensayo de células inmunológicas linfocitos (linfocitos T) de pacientes celíacos. En este gráfico, se representa la producción de interferón-γ en estirpes de linfocitos T extraídas de la mucosa intestinal de pacientes celíacos. Se ha demostrado que las estirpes celulares son altamente sensibles a la gliadina procedente del trigo hexaploide (producto de la digestión tríptica Pepto-PT) tras la desaminación con tejido de transglutaminasa, mientras que se ha observado cualquier reactividad inmunológica hacia la gliadina extraída de las harinas A y B tratadas a concentraciones de 50 y 100 mg/ml.

Por último, en cuanto al mantenimiento de las propiedades tecnológicas de la harina destoxificada, se sabe que, en el amasado con agua, la harina absorbe el agua provocando la unión de las gliadinas y las gluteninas y, por tanto, la formación de la red de gluten que influye en la formación de la masa viscoelástica para arrastrar gas.

La harina destoxificada mediante dicho método conserva la capacidad de amasado de la masa, ya que no pierde la capacidad de formar enlaces entre los grupos disulfuro de cisteína libres (Figuras 5a y 5b) necesarios para la formación de la red. La masa obtenida con las harinas destoxificadas mantiene la característica de extensibilidad

que, como se sabe, se debe principalmente a la gliadina, perdiendo parcialmente elasticidad y viscosidad debido a la formación de agregados de cuerpos proteicos a través de enlaces covalentes.

En particular, la pérdida de una parte de la elasticidad se debe a la interacción entre las subunidades de APM, a través de enlaces covalentes que implican aminoácidos del dominio central de la subunidad proteica de alto peso molecular, que se conoce, a partir de estudios de la literatura, determinando la elasticidad de la masa.

La pérdida de viscosidad de la masa se debe, en cambio, a la interacción de las gliadinas entre sí, ya que son responsables de esta característica reológica.

Ventajas adicionales de la invención

Una primera ventaja del método es que, a partir de esos granos y de la harina, será posible producir alimentos no tóxicos para las personas con la enfermedad celíaca, con características organolépticas equivalentes en sabor y aspecto a las usadas comúnmente en la alimentación mediterránea.

La segunda ventaja es una ventaja económica debido a la materia prima usada, el trigo (Italia es uno de los mayores productores de trigo del mundo), en lugar del maíz y todas las sustancias estructurantes (gomas, agar, gelatina, etc.) que son caras, pero también por el uso, durante la experimentación, de solo agua de la red principal y ondas electromagnéticas durante un corto período de tiempo; por consiguiente, los productos sin gluten ya no serán caros como lo son ahora.

La tercera ventaja es relativa a la salud, ya que las harinas de trigo son menos amiláceas que las de maíz (usadas hasta ahora para la producción de productos sin gluten) y, por tanto, los productos resultantes se caracterizan por un índice glucémico inferior y, por lo tanto, dichos productos serían ideales para la alimentación de pacientes que, además de la enfermedad celíaca, también sufran de diabetes mellitus de tipo 1, una asociación frecuentemente observada debido al probable sustrato genético común compartido por las dos enfermedades.

La cuarta ventaja es la simplicidad del procedimiento, fácilmente aplicable también a otros granos, incluyendo, por ejemplo, la cebada para producir cerveza, exenta de ordeína tóxica (proteínas similares a las gliadinas del trigo) o la avena para fabricar productos para el desayuno, también exenta de sustancias tóxicas (proteínas similares a las gliadinas del trigo).

La quinta ventaja es la producción de alimentos que determinan, a través de su uso en el tiempo y por grandes números de personas de la población, no solo por las personas con enfermedad celíaca, una reducción de la incidencia de la enfermedad celíaca en la población debido al menor efecto inmunogénico del producto destoxificado.

La presente invención se ha descrito con fines ilustrativos, sin limitación, pero debe entenderse que los expertos en la materia pueden realizar variaciones y/o modificaciones sin apartarse del alcance de la protección, según lo definido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de destoxificación de las proteínas de gluten de granos de cereal, **caracterizado por** las siguientes fases:

A. hidratación con agua de los granos de cereal, realizada en una franja de tiempo de entre 30 minutos y 3 horas, usando 500 ml de agua por cada 100 gramos de granos;
B. retirada del agua de los granos de cereal;
C. tratamiento con microondas de los granos de cereal, realizado en una franja de tiempo de entre uno y tres minutos, usando una potencia de entre 750 y 1.500 vatios;
D. enfriamiento de los granos de cereal.

2. Método de destoxificación de las proteínas de gluten de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la franja de tiempo de la etapa A es de aproximadamente una hora.

3. Método de destoxificación de las proteínas de gluten de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el intervalo de tiempo es de dos minutos y la potencia usada es de 1.000 vatios.

4. Método de destoxificación de las proteínas de gluten de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la fase de enfriamiento de los granos se realiza a una temperatura de entre 18 ºC y 24 ºC.

5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los granos de cereal se seleccionan entre trigo, cebada y avena.

6. Granos seleccionados del grupo del trigo, la cebada y la avena que se pueden obtener de acuerdo con el método definido en las reivindicaciones 1-5, **caracterizados por que** se han destoxificado de los epítopos tóxicos del gluten.

7. Un producto que se puede obtener de los granos de la reivindicación 6, seleccionado del grupo de semolina, harinas, productos para el desayuno, cerveza.

8. Granos y productos de acuerdo con las reivindicaciones 6-7 para su uso en la alimentación de personas con la enfermedad celíaca.

9. Uso del trigo de acuerdo con la reivindicación 6 para la producción de semolina y harina para personas con la enfermedad celíaca y para personas que padecen diabetes mellitus de tipo 1.

10. Uso de la cebada de acuerdo con la reivindicación 6 para la producción de cerveza exenta de ordeína tóxica.

11. Uso de la avena de acuerdo con la reivindicación 6 para la producción de productos exentos de avenina tóxica.

12. Uso de la harina de acuerdo con la reivindicación 7 para la preparación de productos alimenticios adecuados para personas con la enfermedad celíaca y equivalentes, en sabor y aspecto, a los productos alimenticios comúnmente usados en la dieta mediterránea.

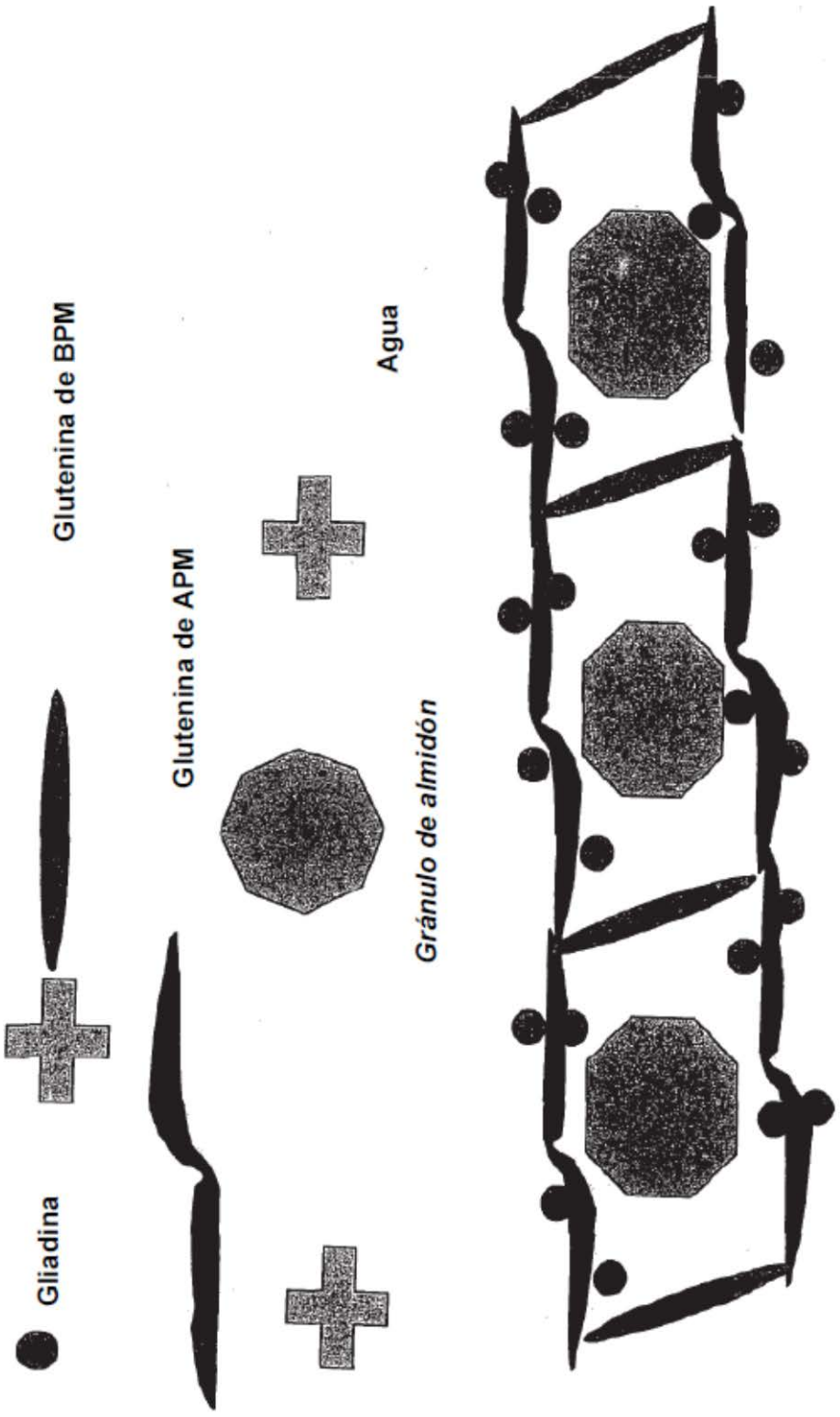
Gliadina
Glutenina de BPM
Glutenina de APM
Agua
Gránulo de almidón

Fig. 1

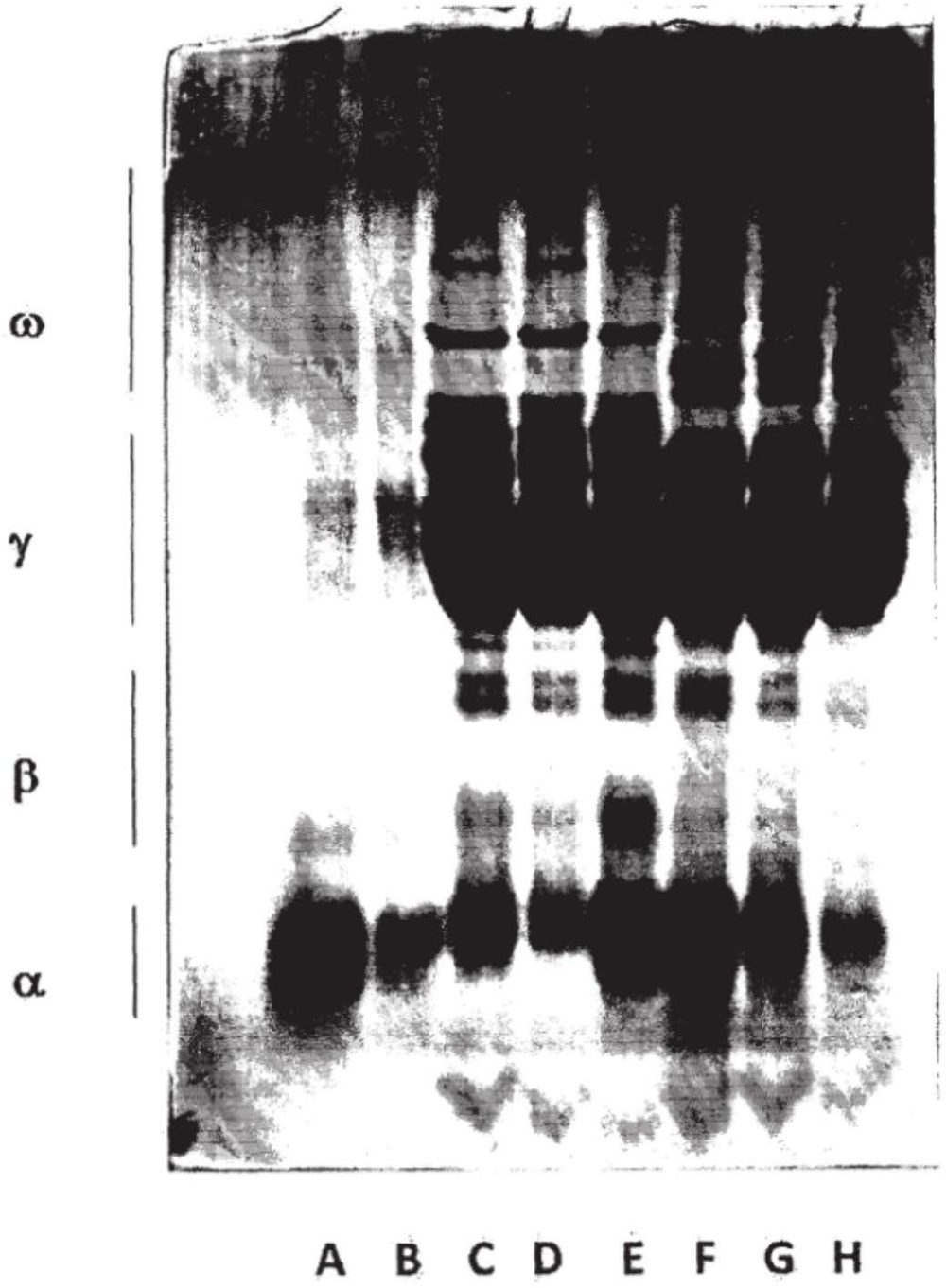

FIG. 2

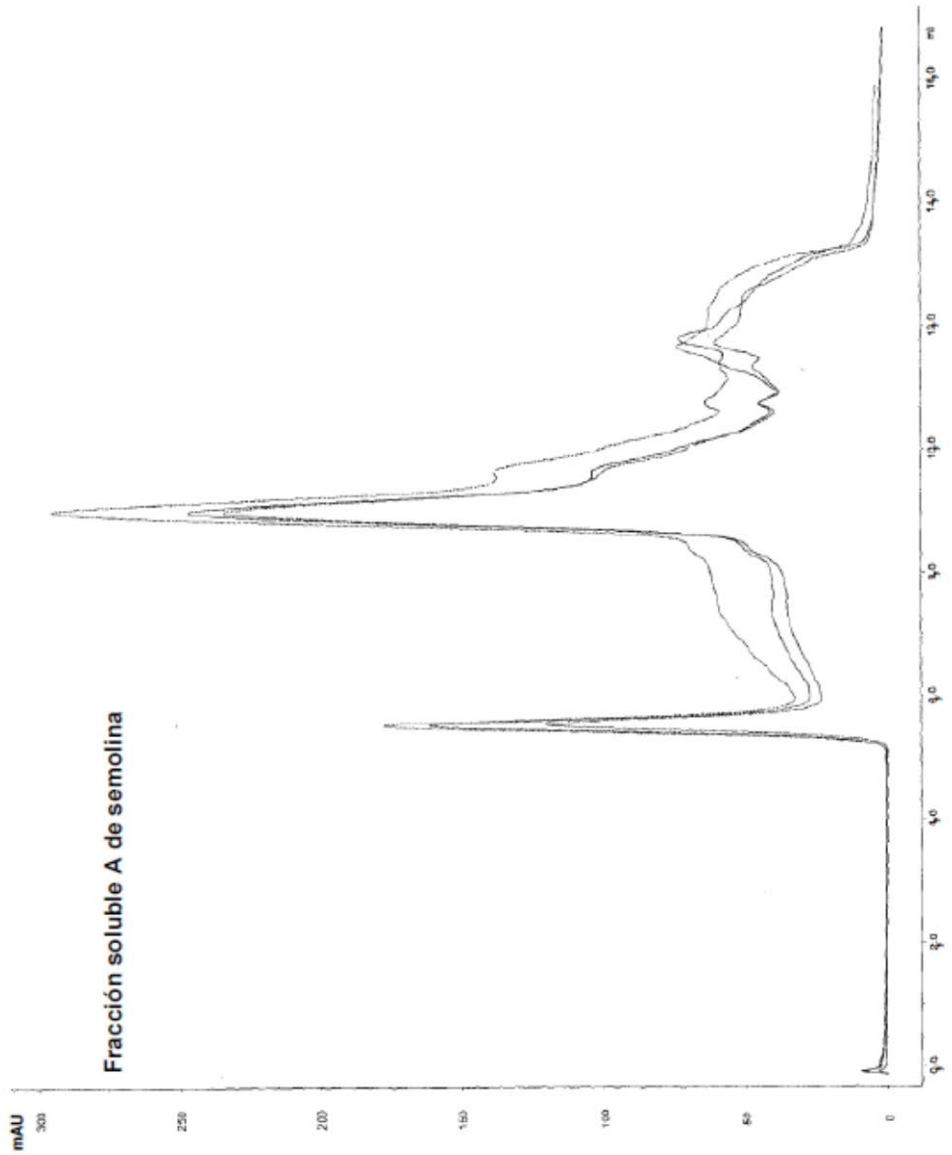
Fracción soluble A de semolina
mAU
300
250
200
150
100
50
0
5,0
3,0
4,0
8,0
9,0
13,0
14,0
15,0
min

Fig. 3a

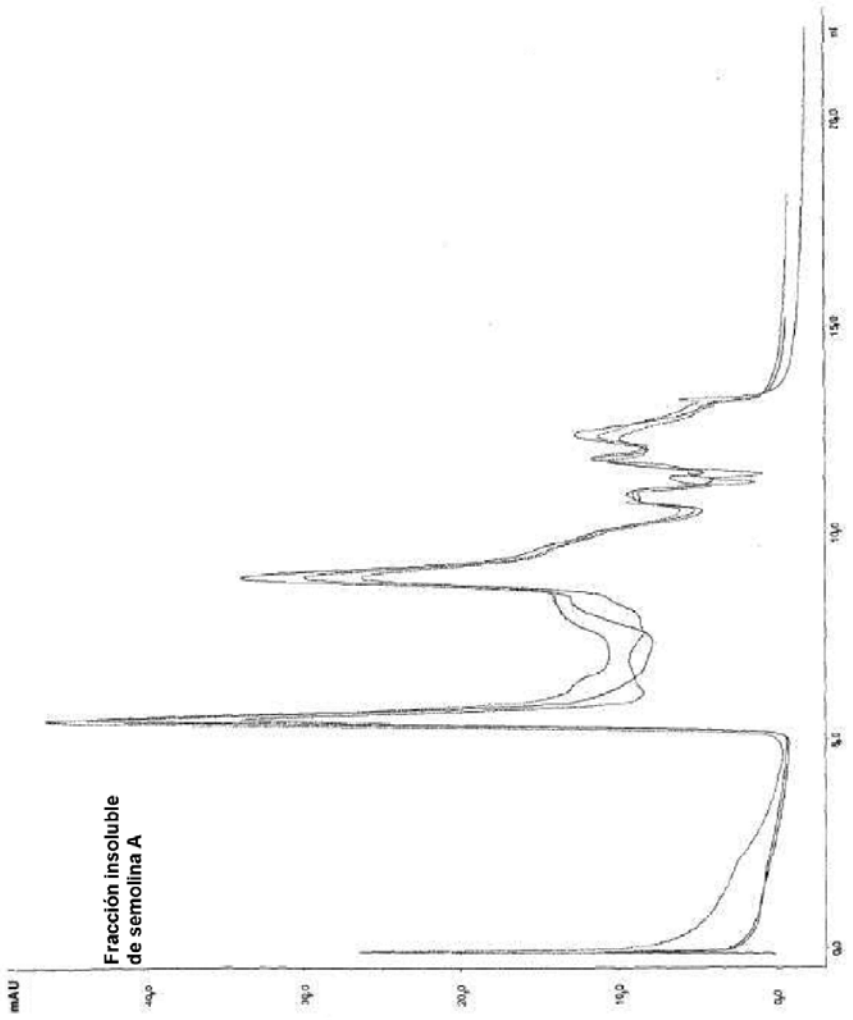

Fig. 3b

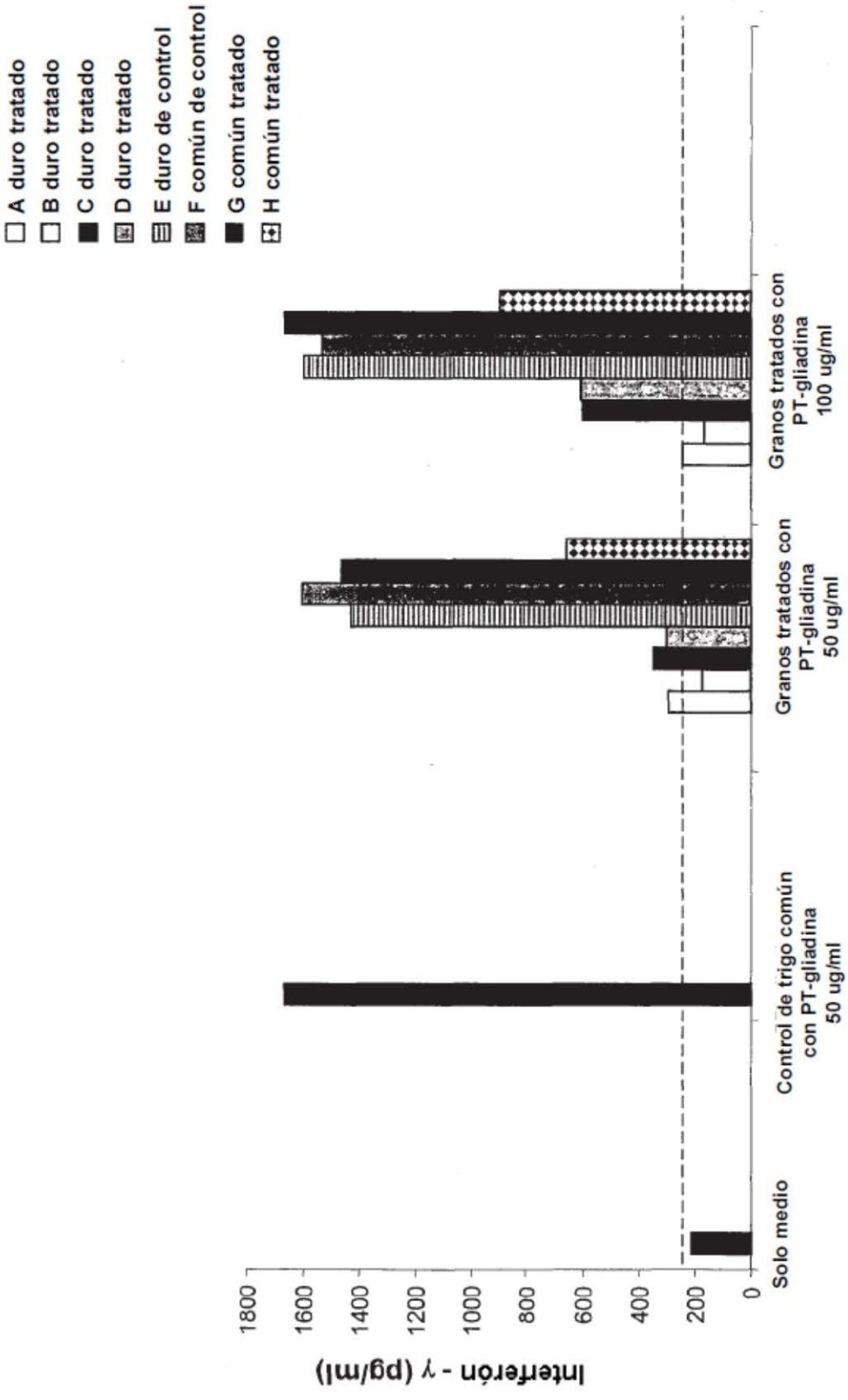
A duro tratado
B duro tratado
C duro tratado
D duro tratado
E duro de control
F común de control
G común tratado
H común tratado
Interferón - γ (pg/ml)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Solo medio
Control de trigo común con PT-gliadina 50 ug/ml
Granos tratados con PT-gliadina 50 ug/ml
Granos tratados con PT-gliadina 100 ug/ml

Fig. 4

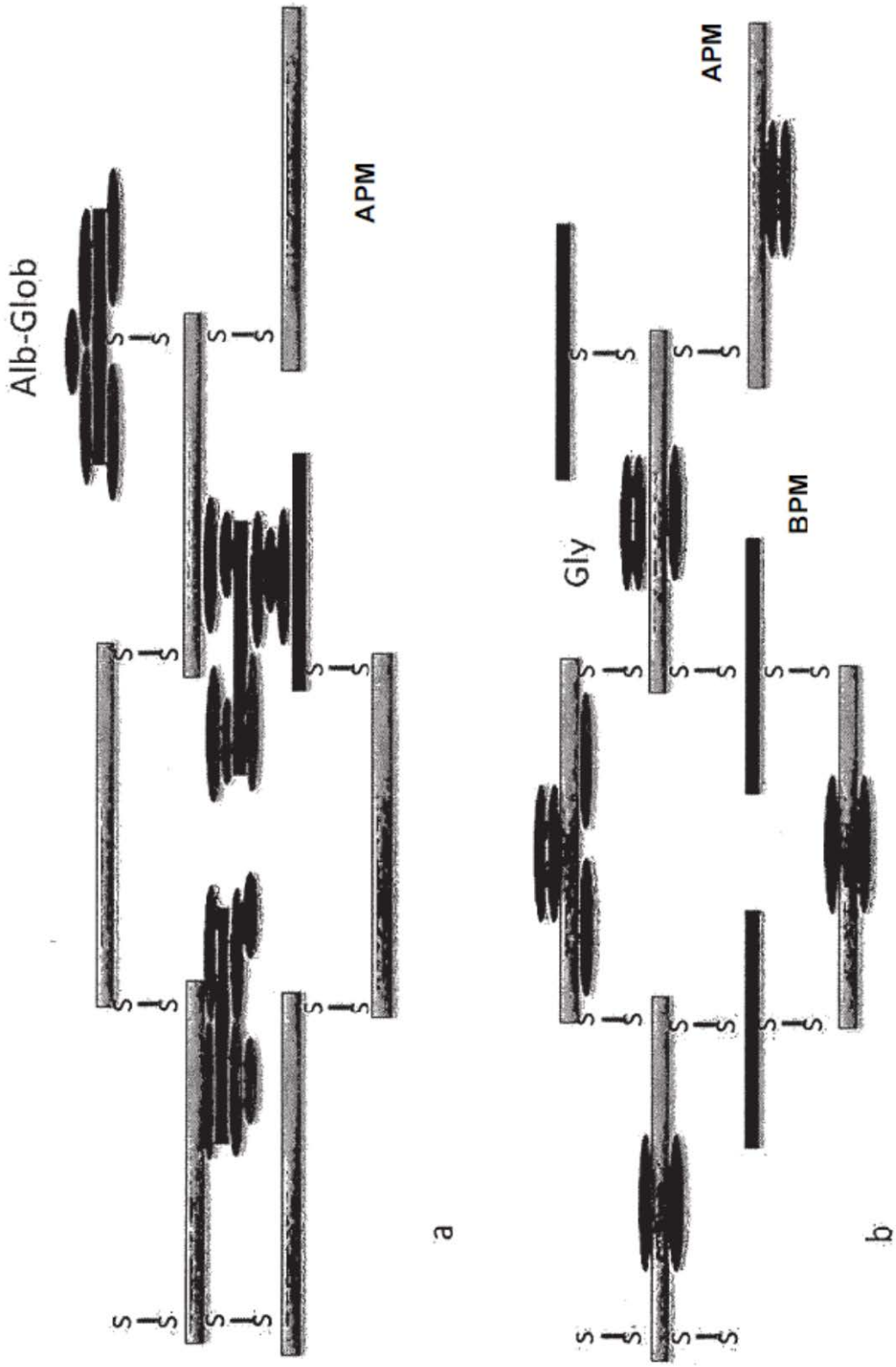

FIG. 5

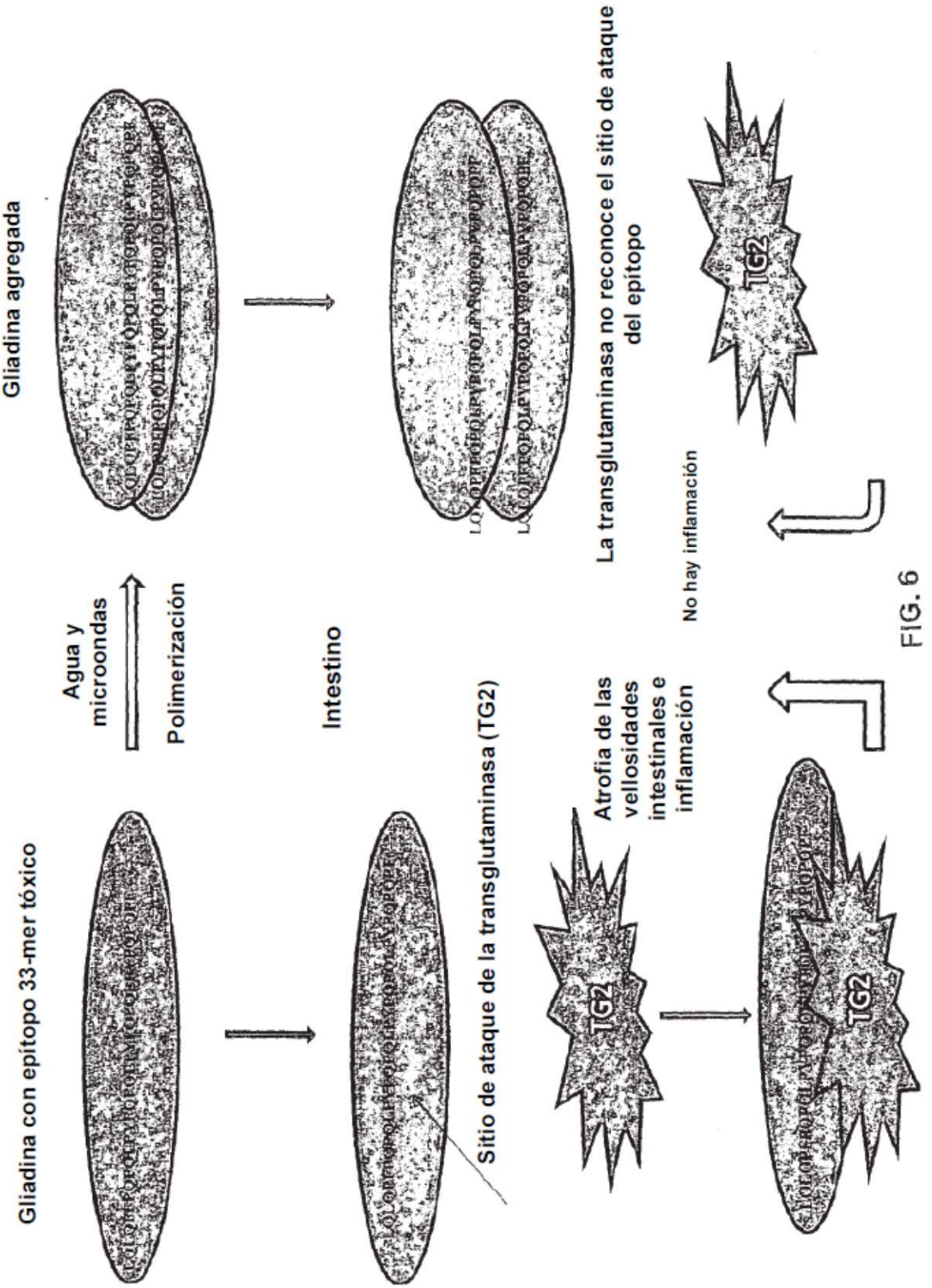
Gliadina agregada
Agua y microondas
Polimerización
Gliadina con epitopo 33-mer tóxico
Intestino
Sitio de ataque de la transglutaminasa (TG2)
La transglutaminasa no reconoce el sitio de ataque del epitopo
Atrofia de las vellosidades intestinales e inflamación
No hay inflamación
TG2
TG2
TG2

FIG. 6