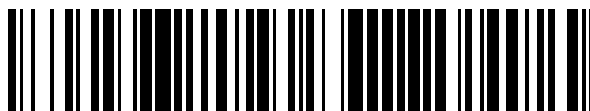


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 697**

51 Int. Cl.:

A21D 8/04 (2006.01)
C12P 39/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A21D 10/00 (2006.01)
A21D 13/04 (2007.01)
A21D 2/36 (2006.01)
A21D 13/06 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2006 PCT/EP2006/060505**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2006 WO06097415**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2006 E 06724958 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 1858336**

54 Título: **Mezcla de al menos 8 especies de bacterias de ácido láctico y/o bifidobacterias en la fabricación de masa madre**

30 Prioridad:

16.03.2005 WO PCT/IT2005/000144

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:

**ACTIAL FARMACEUTICA S.R.L. (100.0%)
Viale Shakespeare, 47
00144 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**DE SIMONE, CLAUDIO y
PIROVANO, FRANCO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 655 697 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mezcla de al menos 8 especies de bacterias de ácido láctico y/o bifidobacterias en la fabricación de masa madre

La presente invención se refiere a la fabricación de productos horneados y, más en general, alimentos con almidón. Proporciona productos horneados y otros alimentos que son más digeribles, no tienen gluten o tienen un contenido de gluten reducido y marcadamente hidrolizado y son particularmente adecuados para su uso no terapéutico por sujetos afectados por enfermedad celíaca.

Antecedentes de la invención

Los cereales son componentes importantes de la dieta diaria. Sin embargo, el gluten de la harina de trigo y, en particular, la fracción de gliadina, son responsables de la intolerancia humana. La enfermedad celíaca, también conocida como celiacía (CQ) o enteropatía sensible al gluten, es una de las intolerancias alimentarias difusas, que se produce en 1 de cada 130 a 300 personas de las poblaciones europeas y de EE. UU. En América del Sur, África del Norte y Asia, generalmente está subestimada (Fasano y Catassi; 2001, *Gastroenterology*, 120:636-651). La distribución epidemiológica de la CQ se conceptualiza eficientemente mediante el modelo de iceberg introducido por Logan en 1992 (Logan; 1992, *Dyn. Nutr. Res.* 2:14-24) donde la prevalencia de la enfermedad está influida por la frecuencia de los genotipos predisponentes en la población. La evitación total durante toda la vida de la ingesta de gluten sigue siendo la piedra angular del tratamiento de la CQ. La Autoridad Alimentaria Internacional ha redefinido el término sin gluten como cero tolerancia al gluten, mientras que el Codex Alimentarius permite una concentración de 200 ppm de gluten por alimento. Los esfuerzos para reducir la intolerancia humana a los cereales son de gran interés médico, nutricional y económico. Esto es particularmente cierto en el contexto actual, en el que las industrias de panificación están utilizando procedimientos tecnológicos muy rápidos que pueden tener una influencia en la expansión de la epidemiología de la CQ.

Por lo tanto, realmente se siente la necesidad de pan y productos horneados más digeribles y tolerados.

La CQ es una enfermedad autoinmune de la mucosa del intestino delgado en personas genéticamente susceptibles. Tras la ingestión de gluten, estos pacientes sufren una inflamación de la mucosa que se autoperpetúa caracterizada por una pérdida progresiva de vellosidades absorbentes e hiperplasia de las criptas (Silano y De Vincenzi, 1999; *Nahrung*, 43:175-184). Durante la digestión proteolítica endoluminal, por ejemplo, las gliadinas de trigo liberan una familia de oligopéptidos ricos en Pro y Glu que son responsables de la respuesta inmune mediada por células T y/o, más en general, del estado inflamatorio que caracteriza la etapa inicial de la CQ (Silano y De Vincenzi; 1999). La literatura informa sobre la identificación de los siguientes oligopéptidos: fragmento 31-43 de la A-gliadina (Silano y De Vincenzi; 1999), fragmento 62-75 de la α 2-gliadina (Auricchio, S., y col.; 1996, *Scand. J. Gastroenterol.* 31:247-253; Picarelli, A., y col.; 1999, *Scand. J. Gastroenterol.* 34:1099-1102), el epítipo de 33 unidades, que corresponde al fragmento 57-89 de la α 2-gliadina (Shan, L., y col.; 2002, *Science*, 297:2275-2279), fragmento 134-153 de γ -gliadina (Aleanzi, M., y col.; 2001, *Clin. Chem.*, 47: 2023-2028) y el fragmento 57-68 de α 9-gliadina (Arentz-Hansen, y col.; 2000, *J. Exp. Med.*, 191:603-612). Las harinas que no son toleradas por los pacientes de CQ incluyen trigo, centeno, cebada, kamut, triticale y espelta. Alguna controversia todavía se debate para la avena.

Se realizan esfuerzos de investigación multidisciplinarios en varios campos para gestionar la CQ. Se refieren a la ingeniería de granos libres de gluten (Fasano, A., y col.; 2003, *Arch. Intern. Med.*, 163:286-292), la búsqueda de los genes de la CQ en seres humanos (Fasano, A., y col.; 2003), el uso de algunas sustancias protectoras tales como mananos y oligómeros de N-acetilglucosamina y el uso de una prolil-endopeptidasa bacteriana de *Flavobacterium meningosepticum* como terapia suplementaria oral (Shan, y col., 2002).

Más recientemente, dos artículos mostraron la extensa hidrólisis de las fracciones de gliadina por lactobacilos de masa madre seleccionados, tales como *Lactobacillus alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A y *L. hilgardii* 51B (Di Cagno, y col.; 2002, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:623-33) y, especialmente, la tolerancia de 17 pacientes con CQ a panes que contenían 2 g de gluten, según lo determinado por exposiciones agudas *in vivo* basadas en la permeabilidad intestinal (Di Cagno, y col.; 2004, *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1088-1096). Estos resultados, aunque alentadores, al menos en vista de la sintomatología, no demostraron regresión del daño histopatológico.

Wei y col., (Wei, J. y Hemmings, G. P.; *Medical Hypotheses*, (2005), 64, 547-552) establecen una relación genética entre la enfermedad celíaca y la esquizofrenia e informan del efecto beneficioso de la regresión de los síntomas esquizofrénicos en pacientes celíacos tratados con una dieta sin gluten (De Santis, A., y col.; *J. Intern. Med.* 1997; 242: 421-3).

El uso de ciertas bacterias de ácido láctico en la fabricación de productos horneados ya es conocido.

El documento US 4.140.800, de Kline, describe un procedimiento para preparar una composición de partida de panadería de masa madre liofilizada, que usa *Lactobacillus sanfrancisco*, con el objetivo de proporcionar un producto útil en la preparación de pan francés. De forma deseable, la harina es rica en gluten.

La solución proporcionada por Di Cagno et al., de usar bacterias de ácido láctico de masa madre todavía deja algunos problemas prácticos sin resolver. En particular, (i) las cepas seleccionadas son los resultados de una investigación que consumió mucho tiempo y que mostró marcadas diferencias en el nivel de la cepa dentro de las especies de bacterias de ácido láctico de masa madre mencionadas anteriormente; (ii) los mismos resultados son obviamente no reproducibles en la planta de panadería; y, especialmente (iii) las cepas seleccionadas no están disponibles comercialmente.

Otras referencias desvelan el uso de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias en la fabricación de alimentos.

El documento EP 0 856 259 se refiere a una composición para uso en alimentación que contiene una mezcla de bacterias vivas liofilizadas que comprende al menos dos especies de bacterias seleccionadas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium* y uno o más oligosacáridos. La composición se agrega a un producto alimenticio líquido, cremoso o pastoso, siendo dicho producto alimenticio una leche, un producto lácteo o derivado de la leche, o un producto a base de o derivado de productos vegetales, llevándose a cabo dicha complementación en el momento del uso del producto alimenticio. El producto no se usa en panadería.

El documento WO 03/071883 se refiere a composiciones dietéticas y/o farmacéuticas para su uso humano y/o animal y alimentos en general, basadas en cultivos microbianos que consisten en especies autóctonas y alóctonas con respecto a seres humanos y animales, seleccionados de especies de bacterias lácticas, propionibacterias, levaduras y/o mohos. Tienen una acción equilibradora de la flora intestinal del ser humano o animal huésped, además de tener diversos efectos beneficiosos/probióticos hacia el organismo huésped. No hay indicación de un posible uso en la enfermedad celíaca.

El documento US 2004/265291 proporciona composiciones, kits y procedimientos para proporcionar o restaurar bacterias beneficiosas para un sujeto. Las composiciones y kits incluyen opcionalmente alimentos o nutrientes para promover el crecimiento y la proliferación de las bacterias en el sujeto o un agente antimicrobiano para reducir la presencia de microbios indeseables o patógenos en el sujeto.

El documento WO 02/065842 se refiere a preparaciones iniciales adecuadas para todos los tipos de cereales y al uso de las mismas para producir pan y productos de panadería basados en levadura o usando levadura, especialmente para producir productos de panadería sin gluten para personas con enfermedad celíaca. No hay descripción de mezclas particulares de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias.

El documento US 5.185.165 desvela una base precursora para su uso en un producto de masa de panadería que comprende un concentrado ácido, al menos un tipo de azúcar, levadura, al menos un tipo de harina, leche desnatada en polvo y al menos un tipo de bacteria productora de ácido láctico y se desvela un procedimiento para producir la base precursora. La base precursora es útil en un procedimiento para producir una suspensión espesa de precursor (o concentrado de fermentación activo) para su uso en la preparación de una mezcla de pasta de preferencia para la preparación del producto de masa de panadería. Además, se describen procedimientos para preparar la suspensión de precursor y la mezcla de pasta de preferencia y un aparato para producir la mezcla de pasta de preferencia. La referencia a bacterias de ácido láctico es totalmente genérica.

El documento US 2004/110270 describe una composición bacteriana que tiene propiedades de inmunomodulación que comprende al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, *Lactobacillus plantarum* PTA-4799, *Lactobacillus salivarius* PTA-4800, *Lactobacillus paracasei* PTA-4798, *Bifidobacterium bifidum* PTA-4801 y *Bifidobacterium lactis* PTA-4802.

El documento EP 1 258 526 desvela la producción de un iniciador para hacer trigo duro y masa madre de trigo fermentando parcialmente una mezcla de agua y producto(s) de trigo molido con un inóculo que comprende lactobacilos y la levadura comprende un inóculo que comprende una flora mixta adaptada que incluye al menos una cepa de levadura, al menos una cepa de lactobacilos homofermentativa y al menos una cepa de lactobacilos heterofermentativa. Se proporcionan cepas de *Saccharomyces* sp. DSM 14265, *Lactobacillus pontis* DSM 14269, *Lactobacillus pontis* DSM 14272, *Lactobacillus pontis* DSM 14273, *Lactobacillus pontis* DSM 14274, *Lactobacillus crispatus* DSM 14271, *Lactobacillus plantarum* DSM 14268 y *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 14270; una flora mixta adaptada que comprende *Saccharomyces* sp. DSM 14265 y al menos tres de *Lactobacillus pontis* DSM 14269, *Lactobacillus pontis* DSM 14272, *Lactobacillus pontis* DSM 14273, *Lactobacillus pontis* DSM 14274, *Lactobacillus crispatus* DSM 14271, *Lactobacillus plantarum* DSM 14268 y *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 14270. Esta referencia pertenece a la información técnica general de productos de panadería, sin indicaciones médicas especiales.

El documento WO 99/09839 se refiere a una composición similar a una pasta que es aplicable para su uso como tal y como un relleno, recubrimiento u otro componente de diversos productos alimenticios y que contiene una cantidad significativa de probiótico. El producto alimenticio es, preferiblemente, un producto de panadería, en particular un pan que contiene centeno, bizcocho tostado, galleta o similar. Esta referencia se refiere a los aspectos generalmente conocidos del uso de probióticos.

La necesidad de un producto horneado adecuado para sujetos afectados por la enfermedad celíaca, que se puede obtener con un procedimiento de fabricación fácil y reproducible y con materiales fiables, seguros y disponibles comercialmente, todavía se siente en este campo.

5 El documento WO 00/54788 se refiere a composiciones de ácido láctico vivo para regenerar la flora intestinal después de una diarrea o tratamiento con antibióticos. Las composiciones de la invención contienen diferentes cepas de bifidobacterias (por ejemplo, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. breve* y *B. infantis*), y de lactobacilos (por ejemplo, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*) y componentes farmacéuticamente aceptados y prebióticos que contribuyen a la supervivencia de estas cepas en el estómago y el intestino, lo que lleva a una recolonización efectiva del medio intestinal.

10 Ottogalli et al., Advances in Food Sciences. Technische Universitatet Muenchen Vol. 18, no. 5/6 131-144 (1996), es una revisión de los diferentes tipos de bacterias y microorganismos que caracterizan a los productos de panadería italianos.

De Vuyst et al., Trend in Food Science and Technology Vol. 16, 43-56 (January 2005), es una revisión de la flora bacteriana en masa madre y de las interacciones metabólicas que ocurren entre diferentes tipos de microorganismos de masa madre.

15 La base de datos WPI Week 2003 43, se refiere a una composición que comprende seis cepas de bifidobacterias que pueden colonizar rápidamente el intestino y pueden usarse para fermentar leche y preparar suplementos biológicamente activos.

20 El documento UA 69137A se refiere a un procedimiento para tratar recién nacidos con enterocolitis necrótica ulcerosa mediante la administración oral o rectal de Symbiter multiprobiótico multifuncional resistente a antibióticos. El Symbiter multiprobiótico comprende 14 cepas de bifidobacterias simbióticas, lactobacilos, lactococos y bacterias de ácido propiónico.

25 Gobbetti y col., Trends in Food Science and Technology Vol. 16, 57-69 (2005), es una revisión de la bioquímica y la fisiología de las bacterias de ácido láctico presentes en las masas madre. En la página 60, "Proteolysis during sourdough fermentation", los autores describen las propiedades proteolíticas de *Lactobacillus alamentarus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfranciscensis* y *Lactobacillus hilgardii*. Los autores informan que los resultados obtenidos usando estas bacterias de ácido láctico demostraron la lisis de albúminas, globulinas y gliadinas en la harina de trigo utilizada para la fermentación. De todos modos, este documento de la técnica anterior no menciona las bifidobacterias entre las bacterias capaces de lisar las proteínas de la harina de trigo.

30 Hsueh y col., Pediatric and Developmental Pathology, vol. 6, 6-23 (2002) y Henry et al. Seminars in Perinatology, W.B. Saunders GB vol. 28, n.º 3, June 2004, 221-233, se refieren a los efectos beneficiosos de las bifidobacterias y lactobacilos administrados por vía oral en el tratamiento de la enterocolitis necrosante.

35 Los documentos WO2003/010297 y US2003/215467 se refieren a la profilaxis y el tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal mediante administración oral de cepas de bifidobacterias seleccionadas a pacientes.

La presente invención satisface estas necesidades proporcionando un producto horneado para sujetos afectados por la enfermedad celíaca. Sin embargo, el producto horneado encuentra una utilidad general en la dieta humana debido a su mayor digestibilidad.

Sumario de la invención

40 Se ha encontrado ahora que ciertas mezclas específicas de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias, de origen humano y lácteo, están dotadas con la sorprendente propiedad de ser capaces de hidrolizar las fracciones de gliadina y glutenina que son responsables de la enfermedad celíaca.

Estas mezclas específicas son muy útiles en la fabricación de masa madre y proporcionan especies bacterianas bien definidas.

45 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención el uso de mezclas específicas de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias para la fabricación de masa madre y una masa madre que comprende dicha mezcla.

Otro objeto de la presente invención está representado por un alimento que comprende la masa madre mencionada anteriormente, en particular un alimento basado en cereales, más en particular productos horneados que son generalmente más digeribles y, en particular, pueden ser tolerados por pacientes con CQ.

50 Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para fabricar alimentos basados en cereales, en particular productos horneados adecuados para sujetos afectados por enfermedad celíaca y adecuados para evitar la contaminación del gluten en productos exentos de gluten.

Un objeto adicional de la presente invención se representa mediante alimentos a base de cereales sin gluten, en

particular productos horneados hechos de harina de trigo cuando el uso de las mezclas específicas de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias se implementa en condiciones específicas con enzimas proteolíticas microbianas, de forma rutinaria utilizadas en las industrias de panificación.

5 Otro objeto de la presente invención es un alimento para sujetos afectados por enfermedad celíaca, conteniendo dicho alimento la mezcla específica de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias divulgadas en el presente documento.

Otro objeto más de la presente invención es el uso de las mezclas mencionadas anteriormente de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias para la preparación de un producto útil para reducir el factor de activación de las plaquetas (PAF) y otras citocinas inflamatorias.

10 Estos y otros objetos de la presente invención se describirán a continuación con detalle en lo que antecede, también por medio de ejemplos y figuras, en los que:

15 La figura 1 muestra el análisis de 2DE de las fracciones de la proteína gliadina de diferentes masas hechas de harina de trigo. (A) Masa químicamente acidificada (control). Los polipéptidos de prolamina se indicaron mediante óvalos de color rojo numerados. (B) Masa incubada durante 24 h a 37 °C con la MEZCLA 1 del Ejemplo a continuación. Los polipéptidos de prolamina se indicaron mediante óvalos de color rojo numerados. Los números azules se refieren a polipéptidos que se degradaron más del 80 %. Mr, masa molecular.

La Figura 2 muestra la hidrólisis del péptido de 33 unidades con la MEZCLA 1 (10⁹ ufc/ml). RP-FPLC a UV 214 nm DE traza de 200 µM de 33 unidades después de 24 horas de incubación a 37 °C sin inóculo microbiano (A) y después de 24 horas de hidrólisis con la MEZCLA 1 a 37 °C (B).

20 **Descripción detallada de la invención**

Un objeto de la presente invención es una masa madre que comprende una mezcla de al menos 8 especies de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus* en los que están presentes al menos una especie de bacterias del ácido láctico y al menos una especie de bifidobacterias y una enzima proteolítica microbiana, y que tiene una concentración de gluten inferior a 200 ppm.

Se pueden usar otras especies, por ejemplo las descritas en el estado de la técnica y generalmente disponibles en colecciones, tales como ECACC, ASTM; DSM.

Las mezclas de acuerdo con la presente invención son las siguientes:

30 *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Estas mezclas de especies bien conocidas pueden prepararlas fácilmente cualquier experto versado en este campo.

Convenientemente, estas mezclas están disponibles comercialmente en una forma liofilizada.

35 Estas formulaciones son adecuadas para su uso como iniciador en la preparación de masa madre.

Los alimentos a base de cereales, en particular productos horneados obtenidos de acuerdo con la presente invención, son generalmente más digeribles, por lo tanto, son más aceptados por el consumidor general o particularmente por personas que desean o necesitan alimentos más digeribles.

40 En una realización particular de la invención, los alimentos a base de cereales, en particular productos horneados, pueden utilizarse para la integración de la dieta de personas afectadas por enfermedad celíaca, ya que la concentración de gluten se reduce a un valor bajo y la cantidad de gluten que persiste en la masa se hidroliza notablemente, especialmente para las secuencias peptídicas que son responsables de CQ.

45 Dado que las mezclas microbianas anteriores están integradas con una cantidad suficiente de proteasa microbiana, tal como, por ejemplo, 200 ppm de proteasa microbiana (típicamente de *Aspergillus* sp.) en las condiciones optimizadas en la presente invención, la masa madre fermentada tiene una concentración de gluten inferior a 200 ppm, según se determina usando el anticuerpo monoclonal R5. Tal como lo establece el Codex Alimentarius, este tipo de producto se define libre de gluten y, por lo tanto, es adecuado para pacientes celíacos.

50 Las proteasas microbianas son de uso común en panadería, véanse, por ejemplo, los documentos WO 88/03365, EP 0588426, US 6,465,209, GB1,196,946. Estas proteasas están comercializadas habitualmente, véase, por ejemplo, Enzyme Development Corporation U.S.A. y la presente invención se puede llevar a cabo con cualquier producto disponible en el mercado y de uso común en panadería.

En una realización preferida de la presente invención, la proteasa microbiana es una proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae*; actividad de 500.000 HUT/g; pH óptimo aproximadamente 3,0 y actividad en el intervalo de pH 3,0 a 6,0; temperatura óptima de aproximadamente 50 °C y actividad en el intervalo de 25-60 °C; u otra proteasa es una proteasa estable a los ácidos de *Aspergillus niger*; actividad de 3.000 SAPU/g; pH óptimo 2,0-3,0 y actividad en el intervalo de pH 2,0 a 6,0; temperatura óptima 50-60 °C y actividad en el intervalo de 30-60 °C. Estas enzimas están disponibles en Bio-Cat Inc., Troy, Virginia, U.S.A. y muchos otros proveedores.

La presente invención permite preparar productos horneados con un mayor porcentaje de harina de trigo, dando como resultado productos con un sabor más agradable y mejor aceptado por las personas afectadas por la enfermedad celíaca. La presente invención también permite obtener productos dirigidos a consumidores generales, incluidas personas sanas, dotados de una mejor digestibilidad.

En un aspecto más amplio, la presente invención también se refiere a productos amiláceos que comprenden la masa madre como se ha desvelado anteriormente.

En su aspecto más amplio, la presente invención proporciona una masa madre que comprende una mezcla de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias como se ha desvelado anteriormente, añadida con una enzima proteolítica de origen microbiano, útil para la preparación de productos para administración oral para mejorar la digestión de gluten y sustancias relacionadas con gluten.

La masa madre que comprende la mezcla específica de la presente invención es el aspecto crítico de la misma.

La masa madre es útil en un procedimiento para la preparación de un producto horneado, en particular pan, pero esto se aplica a todos los productos fermentados y no fermentados, tal como, por ejemplo, galletas, hojaldres, pasteles, tartas, pizza, galletas saladas, colines, aperitivos y todos los demás productos conocidos en la materia.

La masa madre según la presente invención es adecuada también para preparaciones para hacer, también elaboraciones caseras, alimentos a base de cereales, en particular productos horneados. En este caso, la masa madre puede comprender un agente de fermentación. La presente invención también comprende un paquete para la preparación de la masa madre anterior, comprendiendo dicho paquete a) una harina que contiene gluten, b) la mezcla mencionada anteriormente que contiene al menos 6 especies de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias y c) instrucciones de uso y, opcionalmente, un agente de fermentación. El paquete para un producto horneado comprenderá, aparte de los ingredientes habituales para el producto específico, una preparación de agente de fermentación que comprende la mezcla específica de la presente invención.

La preparación de fermentación según la presente invención puede ser una combinación con la mezcla específica de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias o puede proporcionarse en el envase por separado con las bacterias de ácido láctico y la mezcla de bifidobacterias y se mezclará con esta última en el momento de uso, por ejemplo en agua para formar una suspensión de fermentación. La mezcla de bacterias de ácido láctico se puede envasar en un único recipiente solo o en una mezcla con las enzimas proteolíticas (proteasa) desveladas anteriormente.

Los productos amiláceos son generalmente bien conocidos en el campo y son parte del conocimiento común, también entre los consumidores y la cocina casera. En particular, la presente invención se aplica a productos a base de cereales.

Ejemplos de productos amiláceos son todo tipo de pasta, fideos, tales como fideos instantáneos fritos y fideos húmedos, productos de aperitivos, tortillas, tortitas de maíz, cereales extruidos y cereales triturados,

Los procedimientos para hacer pasta son bien conocidos en la técnica y a ellos se hace referencia, por ejemplo, en Pasta and Semolina Technology, Editado por R.C. Kill y K. Turnbull, Blackwell Science, 2001 y patentes propiedad de Barilla. Los procedimientos para fabricar productos amiláceos asiáticos también son bien conocidos y a ellos se hace referencia ilustrativa únicamente en Asian Food, Science and Technology, Editado por Catharina Y.W. Ang, KeShun Liu y Yao-Wen Huang, Technomic Publishing Company, Inc., 1999 y el documento US 20020160093 de Kao Corporation y el documento WO 99/65331, de Societé de Produits Nestlé S.A.

En la actualidad, la mayoría de las pastas se fabrican mediante extrusoras continuas de alta capacidad, que operan según el principio de extrusión de la barrena, en el que el amasado y la extrusión se realizan en una sola operación. La fabricación de pasta incluye la producción de macarrones secos, fideos y espagueti.

Los productos de pasta se producen mezclando trigo molido, agua, huevos (para fideos al huevo o espagueti al huevo) y, a veces, ingredientes opcionales. Estos ingredientes se suelen agregar a una extrusora de barrena continua de alta capacidad, que puede equiparse con diversos moldes que determinan la forma de la pasta. A continuación, la pasta se seca y se envasa para el mercado.

Los productos de pasta contienen trigo molido, agua y ocasionalmente huevos y/o ingredientes opcionales. Los fabricantes de pasta generalmente usan trigo duro molido (sémola, granos duros y harina de trigo duro) en la producción de pasta, aunque ocasionalmente se usa harina y harina de trigo común. La mayoría de los fabricantes de pasta prefieren la sémola, que consiste en partículas finas de tamaño uniforme y produce pasta de la más alta calidad. El agua utilizada en la producción de pasta debe ser pura, libre sabores anormales y potable. Asimismo,

dado que la pasta se produce por debajo de las temperaturas de pasteurización, se debe usar agua con un recuento bacteriano bajo. Los huevos (huevos frescos, huevos congelados, huevos secos, yemas de huevo o sólidos de huevo secos) se agregan a la pasta para hacer fideos al huevo o espagueti al huevo y para mejorar la calidad nutricional y la riqueza de la pasta. Pequeñas cantidades de ingredientes opcionales, tales como sal, apio, ajo y laurel, también se pueden agregar a la pasta para mejorar el sabor. El fosfato disódico se puede usar para acortar el tiempo de cocción. También se pueden agregar otros ingredientes, como el gluten de goma, monoestearato de glicerilo y claras de huevo. Todos los ingredientes opcionales deben estar claramente etiquetados en el paquete.

El trigo duro se moltura en sémola, gránulos de trigo duro o harina dura utilizando molinos de rodillos. El molino de sémola es único en el sentido de que el objetivo es preparar productos intermedios granulares con un mínimo de producción de harina. Después de moler el trigo, se mezcla con agua, huevos y cualquier otro ingrediente opcional.

En la operación de mezcla, se agrega agua al trigo molido en un recipiente de mezcla para producir masa con un contenido de humedad de aproximadamente 31 por ciento. También se pueden agregar huevos y cualquier ingrediente opcional. La mayoría de las prensas de pasta modernas están equipadas con una cámara de vacío para eliminar las burbujas de aire de la pasta antes de la extrusión. Si no se elimina el aire antes de la extrusión, se formarán pequeñas burbujas en la pasta que disminuirán la resistencia mecánica y le darán al producto acabado un aspecto blanco y calcáreo.

Después de mezclar la masa, se transfiere a la extrusora. El tornillo sinfín de extrusión no solo fuerza la masa a través del molde, sino que también amasa la masa en una masa homogénea, controla la velocidad de producción e influye en la calidad general del producto terminado. A pesar de que la construcción y la dimensión de los tornillos sinfín de extrusión varían según los fabricantes de los equipos, las prensas más modernas tienen tornillos sinfín afilados que tienen un paso uniforme en toda su longitud. El tornillo sinfín encaja en un barril de extrusión ranurado, lo que ayuda a la masa a avanzar y reduce la fricción entre el tornillo sinfín y el interior del barril. Los barriles de extrusión están equipados con una camisa de refrigeración con agua para disipar el calor generado durante el procedimiento de extrusión. La camisa de refrigeración también ayuda a mantener una temperatura de extrusión constante, que debería ser de aproximadamente 51 °C (124 °F). Si la masa está demasiado caliente (por encima de 74 °C [165 °F]), la pasta se dañará.

El caudal uniforme de la masa a través del extrusor también es importante. Las variaciones en el caudal de la masa a través del molde hacen que la pasta se extruya a diferentes velocidades. Los productos de tamaño no uniforme deben descartarse o volver a procesarse, lo que aumenta el costo unitario del producto. La superficie interna del molde también influye en el aspecto del producto. Hasta hace poco, la mayoría de los moldes estaban hechos de bronce, que era relativamente blando y requería reparación o reemplazo periódico. Recientemente, los moldes se han mejorado colocando la superficie de extrusión del molde con inserciones de Teflon® para extender la vida de los moldes y mejorar la calidad de la pasta.

El secado es la etapa más difícil y crítica para controlar en el procedimiento de producción de pasta. El objetivo del secado es reducir el contenido de humedad de la pasta de aproximadamente 31 por ciento a 12 a 13 por ciento para que el producto terminado sea duro, conserve su forma y lo almacene sin estropearse.

La mayoría de las operaciones de secado de pasta utilizan un secador preliminar inmediatamente después de la extrusión para evitar que la pasta se pegue. El secado previo endurece la superficie exterior de la pasta y mantiene el interior blando y plástico. Luego se usa un secador final para eliminar la mayor parte de la humedad del producto.

La temperatura de secado y los incrementos de humedad relativa son factores importantes en el secado. Como la superficie exterior de la pasta se seca más rápido que el interior, los gradientes de humedad se desarrollan a través de la superficie hacia el interior de la pasta. Si se seca demasiado rápido, la pasta se agrietará, dando al producto un aspecto malo y muy baja resistencia mecánica. El agrietamiento puede ocurrir durante el procedimiento de secado o varias semanas después de que el producto haya salido del secador. Si la pasta se seca demasiado lentamente, tiende a deteriorarse o mojarse durante el procedimiento de secado. Por lo tanto, es esencial que el ciclo de secado se adapte para cumplir los requisitos de cada tipo de producto. Si el ciclo de secado ha tenido éxito, la pasta será firme pero también lo suficientemente flexible como para que pueda doblarse en un grado considerable antes de romperse.

El embalaje mantiene el producto libre de contaminación, protege la pasta de daños durante el envío y el almacenamiento, y muestra el producto favorablemente. El principal material de embalaje para los fideos es la bolsa de celofán, que proporciona protección a prueba de humedad para el producto y se usa fácilmente en las máquinas de envasado automático, pero es difícil de apilar en los estantes de las tiendas. Muchos fabricantes utilizan cajas en lugar de bolsas para envasar pasta porque las cajas son fáciles de apilar, proporcionan una buena protección para productos frágiles de pasta y ofrecen la oportunidad de imprimir anuncios que son más fáciles de leer que en las bolsas.

Las emisiones al aire pueden surgir de diversas fuentes en la fabricación de pasta. Las emisiones de materia particulada (MP) se deben principalmente a la manipulación y a la mezcla de sólidos. Para la fabricación de pasta, se producen emisiones de PM durante el procedimiento de molienda del trigo, ya que los ingredientes crudos se

mezclan y, posiblemente, durante el envasado. Las fuentes de emisión asociadas con la molienda de trigo incluyen la recepción del grano, la limpieza previa/manipulación, la limpieza de la casa, la molienda y la carga a granel. Otra información está disponible en D. E. Walsh y K. A. Gilles, "Pasta Technology", Elements Of Food Technology, N. W. Desrosier, Editor, AVI Publishing Company, Inc., 1977. La presente invención es aplicable tanto a la fabricación industrial como a la preparación casera de pasta, en el último caso, favorablemente en la preparación de pasta al huevo.

De acuerdo con la presente invención, en el procedimiento de fabricación de masa, se usa la mezcla de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias divulgada en el presente documento.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un alimento asiático típico a base de cereales. Un ejemplo preferido es un tipo de fideo conocido como conocido como Ramyun en Corea, Ramien en China y Ramen en Japón.

Como en la realización general de la presente invención, la masa se prepara añadiendo la mezcla de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias y dejando el tiempo suficiente para la pre-fermentación.

Las mezclas de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias según la presente invención, añadidas con proteasas microbianas, también pueden usarse en la fabricación de un alimento, en particular de calidad sin gluten, para el consumo por un sujeto afectado por enfermedad celíaca. Ejemplos de este tipo de alimentos son pastas, cereales, tacos, tortillas, palomitas. Para una referencia, véase Practical Gastroenterology - April 2004, páginas 86-104 y las referencias citadas en el mismo.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la fabricación de un producto horneado que comprende la adición de la preparación de masa madre anterior.

En una realización preferida de la presente invención, el procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a) pre-fermentación líquida de 20-50 % de harina de trigo en peso (mezcla completa 20 % -50 % de harina y 8 0% -50 % de agua, producción de masa aproximadamente 300 con aproximadamente 10^9 células de la mezcla de la presente invención por g de masa), a aproximadamente 37 °C durante al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente entre aproximadamente 24 y aproximadamente 31 horas;
- b) después de la fermentación, mezclar la masa con una o más harinas toleradas, tal como harina de mijo, para obtener un rendimiento de masa final de aproximadamente 150 (masa sólida) y añadir levadura comercial de panadería a una concentración de aproximadamente 1 % en peso;
- c) incubar la masa a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 2 horas hasta que se complete la fermentación;
- d) cocción a aproximadamente 250 °C durante aproximadamente 20 minutos.

En una segunda realización de la presente invención, el procedimiento se puede modificar de la siguiente manera:

- a) fermentación líquida del 20 % de harina de trigo con la adición adicional de proteasas fúngicas (200 ppm) a 37 °C durante 24-31 horas;
- b) después de la fermentación, secar para eliminar el agua a fin de obtener una harina de trigo sin gluten (<200 ppm de gluten);
- c) uso de la harina de trigo sin gluten como ingrediente básico para la fabricación de alimentos a base de cereales, en particular productos horneados.

El término "aproximadamente" en esta circunstancia significa los valores alrededor de los indicados que están comprendidos en la realización normal de la invención y pueden depender de los errores instrumentales de los dispositivos de medición o las desviaciones hechas por el experto en la técnica alrededor de los valores indicados, pero que no afectan al resultado obtenido por la invención.

Los intervalos anteriores también pretenden ser mayores que el límite inferior y menores que el límite superior. Por lo tanto, la pre-fermentación líquida de la etapa a) comprende una cantidad de harina de trigo no inferior a aproximadamente 20 % y no superior a 50 % en peso durante un tiempo de no menos de aproximadamente 24 horas y no más de aproximadamente 31 horas.

Una lista de ejemplo de harinas toleradas comprende harinas de alubias, trigo sarraceno, lino, maíz, harinas de leguminosas (garbanzos, lentejas, guisantes), mijo, hierbas de arroz de la India, harinas de frutos secos (almendras, avellanas, nueces), quinoa, harina de patata, harina de batata, sagú, harinas de semillas (sésamo), sorgo, soja, tapioca, tef. El mijo es una de las harinas toleradas preferidas.

Una realización muy ventajosa de la presente invención es incluir un prebiótico en el producto horneado, con o no una harina tolerada.

Un prebiótico es una sustancia similar a la fibra no digerible, ejemplos de los cuales son oligosacáridos de cadena corta y cadena larga, tales como fructooligosacáridos, oligosacáridos de soja, xilooligosacáridos e

isomalttooligosacáridos.

Una realización aún más ventajosa de la invención es la incorporación del producto horneado descrito en el presente documento en un producto horneado tal como el descrito en el documento EP 1 010 372. En esta realización, el producto horneado comprende una composición basada en grasa no horneada, esencialmente libre de agua, que comprende bacterias lácticas liofilizadas vivas. Esta composición a base de grasa que comprende bacterias lácticas liofilizadas vivas puede, por supuesto, combinarse con todos los productos horneados de la presente invención.

Los alimentos a base de cereales, en particular los productos horneados y los envases para la preparación de alimentos a base de cereales, en particular productos horneados de acuerdo con la presente invención, son adecuados para la administración a un sujeto que padece celiaquía.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención también comprende alimentos generales conocidos bajo el nombre general de alimentos con almidón, en particular alimentos a base de cereales.

La mezcla de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias añadidas con la proteasa microbiana, como se ha descrito previamente, se usa en la fabricación de alimentos con almidón, en particular alimentos basados en cereales para obtener los mismos resultados y ventajas de la realización de productos horneados descrita anteriormente. Por así decirlo, el alimento obtenido de acuerdo con la presente invención es adecuado para sujetos que padecen enfermedad celíaca o para consumidores en general, también con buena salud, que desean alimentos más digeribles. Por ejemplo, los niños y ancianos pueden desear alimentos más digeribles.

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento para tratar a un sujeto que padece enfermedad celíaca que comprende la integración de la dieta de dicho sujeto con un alimento horneado y/o un alimento con almidón como se ha descrito anteriormente. En lo anterior, los productos horneados y el alimento con almidón de acuerdo con la presente invención estarán comprendidos en la expresión "alimento a base de cereales". En otra realización de la presente invención, los alimentos a base de cereales, en particular los productos horneados, también pueden usarse para mantener la tolerancia al gluten o para inducir tolerancia al gluten o para disminuir el riesgo de alergias debido a albúminas y globulinas de la harina de trigo.

En otra realización de la presente invención, los alimentos a base de cereales, en particular los productos horneados, pueden usarse de forma segura para pacientes celíacos debido a la baja concentración de gluten (<200 ppm).

Los procedimientos de tratamiento de acuerdo con la presente invención también se pueden usar en combinación con otros tratamientos médicos para la enfermedad celíaca.

Como se ha informado anteriormente, en pacientes celíacos se observan síntomas esquizofrénicos y los pacientes esquizofrénicos muestran un comportamiento sensible al gluten. Las mezclas de acuerdo con la presente invención son útiles para preparar productos dietéticos sin gluten.

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es el uso de la mezcla descrita anteriormente en la preparación de un producto dietético exento de gluten útil para el tratamiento de síntomas esquizofrénicos. En particular, dichos síntomas afectan a un paciente celíaco o no celíaco.

Otro problema en la técnica es el uso de prolina en preparaciones para dieta entérica. En ciertos sujetos, la prolina no se hidroliza y los compuestos que producen la solución para la dieta entérica no se asimilan. También pueden producirse respuestas alérgicas debido a la prolina. Las mezclas de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias descritas en la presente invención son útiles para hidrolizar péptidos enriquecidos en prolina o prolina, haciendo de este modo que las preparaciones para dieta entérica sean eficaces y no alérgicas.

Gracias a sus propiedades, las mezclas de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias descritas en la presente invención también son útiles para hacer que las soluciones de glutamina enriquecidas en gliadina sean hipoalérgicas.

En otra realización de la presente invención, también se ha descubierto que las mezclas divulgadas en el presente documento se pueden usar en la fabricación de un producto para disminuir los niveles de factor activador de plaquetas (PAF) y otras citocinas inflamatorias para tratar la enfermedad gastrointestinal.

El PAF está involucrado en una serie de enfermedades gastrointestinales, en particular trastornos inflamatorios. Se puede mencionar la necrosis intestinal isquémica (Hsueh W., Gonzalez-Crussi F.; Methods Achiev. Exp. Pathol., 1988:13; 208-39), úlcera gástrica (Esplugues Zit., Whittle B.J., Methods Find.; 1989: Suppl. 1, 61-6), rectocolitis hemorrágica (Chaussade S., Denizot Y, Ann. Gastroenterol. Hepatol. (París); 1991, May 27(3): 117-21), enterocolitis necrotizante (Ewer AK., Acta Paediatr. Suppl.; 2002, 91(437): 2-5; neonatal: Caplan MS., y col., Semin. Pediatr. Surg. 2005, Aug 14(3): 154-51), enfermedad inflamatoria del intestino (Nassif A., y col. Dis. Colon Rectum; 1996, Feu.; 39(2):217-23), reservoritis (Rothenberg DA., y col. Ann. Chir.; 1993; 47(10):1043-6).

En vista de la explicación anterior, el producto de acuerdo con la presente invención también se puede suplementar

a sujetos, en particular a japoneses, que tienen un déficit de la PAF-hidrolasa, que puede verse afectado por una serie de enfermedades inflamatorias (Karasawa K.; y col.; Prog. Lipid. Res.; 2003 Mar., 42(2): 93-114).

El producto puede tomar la forma de un alimento, como se ha descrito anteriormente, o un suplemento nutricional, un nutraceutico, un fármaco.

- 5 Suplemento nutricional y nutraceutico son terminos bien conocidos en la materia (Arvanitoyannis IS, y col.; Crit. Rev. Food Sci. Nutr.; 2005,45(5):385-404 y Kalra EK, AAPS PharmSci.; 2003, 5(3); E25) y no hay necesidad de una definición adicional.

El ejemplo siguiente ilustra adicionalmente la invención.

El alcance de la invención se define de forma rigurosa en las reivindicaciones.

10 Ejemplo 1

Fermentación de masa madre y análisis por electroforesis

- 15 Las características de la harina de trigo utilizada fueron las siguientes: humedad, 12,8 %; proteína (N x 5,70), 10,7 % de materia seca (m.s.); grasa, 1,8% de m.s. ceniza, 0,6 % de m.s. y carbohidratos solubles totales, 1,5 % de m.s. Se usaron ochenta gramos de harina de trigo y 190 ml de agua del grifo (que contenía una concentración celular de las preparaciones celulares de aproximadamente 109 ufc por g de masa) para producir 270 g de masa (rendimiento de masa, 220). Se prepararon cuatro masas utilizando las siguientes mezclas de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias.

Mezcla 1 de acuerdo con la invención:

- 20 *Streptococcus thermophilus*,
Bifidobacterium infantis,
Bifidobacterium longum,
Bifidobacterium breve,
Lactobacillus acidophilus,
Lactobacillus plantarum
25 *Lactobacillus casei*,
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*.

Mezcla 2 no conforme a la invención

- 30 *Streptococcus thermophilus*,
Bifidobacterium lactis,
Bifidobacterium breve,
Lactobacillus acidophilus,
Lactobacillus plantarum,
Lactobacillus casei,
Lactobacillus helveticus.

35 Mezcla 3

Lactobacillus acidophilus,
Lactobacillus brevis,
Streptococcus thermophilus,
Bifidobacterium infantis.

40 Mezcla 4

Lactobacillus brevis,
Lactobacillus salivarius spp. *salicinius*
Lactobacillus plantarum

- 45 La fermentación se llevó a cabo a 37 °C durante 24 horas. Una masa sin inóculo bacteriano se acidificó químicamente a un pH 4,0 con una mezcla de ácidos láctico y acético (relación molar 4:1) y se usó como control. Después de la incubación, se extrajeron las gliadinas de las masas siguiendo el procedimiento descrito originalmente por Osborne (Osborne, T.B.; 1970, The proteins the wheat kernel. Carnegie Institute of Washington publication 84. Judd y Detweiler, Washington, D.C.) y posteriormente modificado por Weiss y col., (Weiss, y col., 1993, Electrophoresis, 14:805-816).

- 50 Se diluyeron alícuotas de 10-20 µl (aproximadamente 10 µg de gliadina) 1:1 con tampón de muestra, se trataron a 100 °C durante 5 minutos y se analizaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) según el procedimiento de Laemmli. (Laemmli, 1970, Nature, 227:680-685); los geles contenían 12 % de acrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie B10 Bio-Safe (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La electroforesis en gel bidimensional (2DE) se realizó según lo descrito por Di Cagno y col. (*Di Cagno, y col., 2004*). Se

analizaron tres geles y las intensidades de las manchas de la masa químicamente acidificada (siCAD) y la masa madre (agregado de la MEZCLA 1) (siSD) se normalizaron según lo informado por Bini y col. (Bini, y col., 1997, Electrophoresis, 18:2832-2841). El factor de hidrólisis para proteínas individuales se expresó como [(siCAD - siSD)/siCAD] x 100. Todos los factores de hidrólisis se calcularon en base al promedio de las intensidades puntuales de los tres geles, y se calculó la desviación estándar. Solo se indicaron los factores de hidrólisis con significación estadística en los que el valor P fue <0,05.

Hidrólisis de sustratos sintéticos, polipéptidos ricos en Pro y análisis de RP-FPLC

Preliminarmente, las actividades peptidasas específicas de prolina de la Mezcla 1 se caracterizaron usando sustratos sintéticos tales como Pro-*p*-NA, Leu-*p*-NA, Ala-*p*-NA, Leu-Leu, Val-Leu, Pro-Gly, Gly-Pro-Ala, Leu-Leu-Leu, Z-Gly-Pro-*p*-NA y NCBZ-Gly-Gly-Leu-*p*-NA (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo). La mezcla de ensayo contenía 500 µl de tampón fosfato 200 mM, pH 7,5, 150 µl de sustrato (0,2-3 mM, concentración final), 8 µl de NaN₃ (0,05 % de concentración final) y 50 µl de preparación de la preparación de la MEZCLA 1 (5 x 10⁹ufc/ml, concentración final). Fragmento 62-75 (P-Q-P-Q-L-P-Y-P-Q-P-Q-S-F-P) de la A-gliadina (*Silano and De Vincenzi; 1999*) y el epítipo de 33 unidades (L-Q-L-Q-P-F-P-Q-P-Q-L-P-Y-P-Q-P-Q-L-P-Y-P-Q-P-Q-L-P-YP-Q-P-Q-P-F) (*Shan et al, 2002*) fueron sintetizados químicamente por Neosystem Laboratoire (Strasbourg, Francia). La mezcla de ensayo para el fragmento 62-75 contenía 320 µl de tampón fosfato 20 mM, pH 7,0, 150 µl de sustrato (450 µM, concentración final), 8 µl de NaN₃ (0,05 % de concentración final) y 50 µl de preparación de la preparación de la MEZCLA 1 (5 x 10⁹ufc/ml, concentración final). La mezcla de ensayo para el epítipo de 33 unidades contenía 500 µl de tampón de fosfato 200 mM, pH 7,5, 150 µl de sustrato (200 µM, concentración final), 8 µl de NaN₃ (0,05 % de concentración final) y 50 µl de preparación de la preparación de la MEZCLA 1 (5 x 10⁹ufc/ml, concentración final). Ambas mezclas se incubaron a 37 °C en condiciones de agitación (150 rpm). La cinética enzimática para la hidrólisis de las 33 unidades se calculó usando un gráfico de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk; 1934, J. American Chem. Soc., 56:658-666).

Las reacciones enzimáticas se detuvieron mediante la adición de ácido trifluoroacético al 0,05 % (vol/vol) (concentración final). Los péptidos se separaron de la mezcla mediante RP-FPLC usando una columna Resource II RPC de 3 ml y un equipo de FPLC con un detector de UV que funcionaba a 214 nm (Amersham Bios-cences, Uppsala, Suecia). La elución fue a un caudal de 1 ml/min con un gradiente (5 a 100 %) de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,05 %. La concentración de CH₃CN aumentó linealmente de 5 a 46 % entre 16 y 62 minutos y de 46 % a 100 % entre 62 y 72 minutos.

Se usó el mismo procedimiento para determinar los oligopéptidos contenidos en los extractos solubles en 70 % de etanol de las masas fermentadas.

Uso de proteasas fúngicas en asociación con bacterias del ácido láctico y bifidobacterias

Para producir una masa madre sin gluten (<200 ppm), se usó la MEZCLA 1 en asociación con 200 ppm de proteasas fúngicas rutinariamente usadas en productos de panadería. Durante la fermentación, la actividad complementaria de las actividades proteolíticas de bacterias y fuentes fúngicas produjo una marcada disminución de, especialmente, las fracciones de gliadina y glutenina. Los extractos solubles en etanol de la masa madre fermentada mostraron una concentración de gluten inferior a 200 ppm determinada por el uso del anticuerpo monoclonal R5.

Análisis de transferencia de tipo Western con el anticuerpo monoclonal R5 y análisis RAPD PCR

La masa madre (37 °C durante 24 h) con la MEZCLA 1 (aproximadamente 10⁹ ufc por g de masa) se mezcló con ingredientes no proteicos y harina tolerada (por ejemplo, mijo) para producir galletas italianas y se sometió a cocción a 250 °C durante 15 minutos. Las galletas italianas fabricadas sin fermentación con la MEZCLA 1 se usaron como control. Las galletas se analizaron mediante transferencia de tipo Western con el anticuerpo monoclonal R5 y RAPD PCR en el Centro Nacional de Biotecnología, Unidad de Gluten, CNB (28049 Madrid, España). El anticuerpo monoclonal R5 reconoce posibles péptidos celíacos tóxicos: QQPFP y 33 unidades. Se llevó a cabo RAPD PCR en base a secuencias de ADN específicas que están relacionadas con posibles péptidos tóxicos.

Hidrólisis de proteínas solubles en sal de harina de trigo (albúminas y globulinas)

Las albúminas y las globulinas se extrajeron de la harina de trigo mediante el procedimiento de Weiss (1993). La mezcla de ensayo que contenía 0,8 ml de albúminas/globulinas (aproximadamente 3 mg/ml) en Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, 5 x 10⁹ ufc/ml de la MEZCLA 1 y NaN₃ al 0,05 %. La incubación fue a 37 °C durante 24 horas en condiciones de agitación. Un control sin células microbianas se incluyó en la prueba. Después de la incubación, el sobrenadante se recuperó por centrifugación y se utilizó para electroforesis. Las proteínas de la fracción soluble en agua/sal (albúminas y globulinas) se analizaron mediante inmunotransferencia (Curioni, A., y col., 1999, Clin. Exp. Allergy, 29:407-413) para detectar la unión de IgE de los sueros combinados de pacientes atópicos, previamente caracterizados como pacientes con síntomas gastrointestinales relacionados con la ingestión de trigo. Utilizando una transferencia semiseca, las bandas de proteína, separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a láminas de nitrocelulosa con una Trans-blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Milán, Italia) con un tampón de transferencia que contenía Tris 48 mM, pH 9,2, glicina 39 mM, 20 % de metanol y 0,1 % de SDS, durante 5 horas a la tensión de 50 V.

Las bandas de transferencia se visualizaron empapando las membranas durante unos minutos en Ponceau S (0,1 % en ácido tricloroacético al 3 %) y se marcaron con un lápiz, antes de destintar con agua. Las membranas se bloquearon con TBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (TBS-T) y 5 % de leche desnatada en polvo (M-TBS-T) durante 2 horas y se incubaron durante la noche con sueros combinados de pacientes, diluidos a 1:20 en TBS-T.

Después de lavar cinco veces con M-TBS-T, las transferencias se incubaron durante 1 hora con anticuerpo conjugado con peroxidasa IgE antihumano monoclonal (Sigma Chemical Co), diluido a 1:5000 en M-TBS-T (*Curioni, y col.*; 1999). Después de cuatro lavados en M-TBS-T y uno en TBS, la IgE unida se visualizó mediante quimioluminiscencia usando el kit de detección de Supersignal (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente.

En comparación con el control, los perfiles SDS-PAGE de las fracciones de gliadina extraídas de las masas fermentadas con las cuatro preparaciones celulares mostraron que no todas las preparaciones celulares tenían la misma capacidad para degradar las gliadinas. La hidrólisis fue muy alta para la MEZCLA 1 de la invención, apenas ligera para la MEZCLA 2, mientras que las otras preparaciones de células (MEZCLAS 3 y 4) no causaron una degradación apreciable.

Las diferencias entre las cuatro preparaciones de células se confirmaron mediante el análisis RP-FPLC de las fracciones de proteína soluble en etanol al 70 % que proporcionaba una visión general de los oligopéptidos con masas moleculares aparentes inferiores a las detectables por electroforesis.

Los resultados anteriores dieron una gran evidencia del mayor rendimiento de la MEZCLA 1, que parecía tener una actividad proteolítica dirigida más específicamente a las gliadinas.

Cuando las especies bacterianas que componen la MEZCLA 1 se usaron individualmente a la misma concentración de aproximadamente 10^9 células por g de masa, ninguna de las 8 especies dio una hidrólisis marcada como se muestra en la mezcla. Esta fue la primera evidencia de la actividad proteolítica complementaria entre las especies de al menos 6 cepas que se usan en la MEZCLA 1 en una proporción bien definida.

Las gliadinas y los oligopéptidos relacionados se caracterizan por una gran proporción de restos de prolina dentro de sus secuencias (Wieser, 1996, *Acta Paediatr. Suppl.* 412:3-9). La prolina es única entre los 20 aminoácidos debido a su estructura cíclica. Esta conformación específica impone muchas restricciones sobre los aspectos estructurales de los péptidos y proteínas, lo que los hace extremadamente resistentes a la hidrólisis. Para tratar adecuadamente dichos péptidos, es necesario un grupo de peptidasas específicas para hidrolizar todos los enlaces peptídicos en los que se produce un resto de prolina como sustrato potencial en las diferentes posiciones (Cunningham y Connor, 1997, *Biochim. Biophys. Acta*, 1343:160-186). Preliminarmente, las actividades peptidasas específicas de prolina de la MEZCLA 1 se caracterizaron usando sustratos sintéticos tales como Pro-p-NA, Leu-p-NA, Ala-p-NA, Leu-Leu, Val-Leu, Pro-Gly, Gly-Pro-Ala, Leu-Leu-Leu, Z-Gly-Pro-p-NA y NCBZ-Gly-Gly-Leu-p-NA que son relativamente específicas de las enzimas prolina iminopeptidasa, aminopeptidasa, dipeptidasa, prolinasa, prolidasa, dipeptidil peptidasa, tripeptidasa, prolil-endopeptidasa y endopeptidasa, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1

Actividades enzimáticas de la MEZCLA 1.

Sustrato	Tipo de enzima	Concentración sustrato (mM)	Unidad de actividad (U)
Pro-p-NA	Prolina iminopeptidasa	2	3,2 ± 0,02
Leu-p-NA	Aminopeptidasa	2	8,4 ± 0,04
Ala-p-NA	Aminopeptidasa	2	12,3 ± 0,05
Leu-Leu	Dipeptidasa	2	15,51 ± 0,03
Val-Leu	Dipeptidasa	2	17,22 ± 0,07
Pro-Gly	Prolinasa,	3	8,0 ± 0,02
Val-Pro	Prolidasa	2	3,03 ± 0,02
Gly-Pro-Ala	Dipeptidil peptidasa IV/carboxipeptidasa P	2	2,73 ± 0,01
Leu-Leu-Leu	Tripeptidasa	2	10,63 ± 0,41
Z-Gly-Pro-p-NA	Prolil-endopeptidasa	2	1,3 ± 0,01
NCBZ Gly-Gly-Leu-p-NA	Endopeptidasa	2	1,9 ± 0,02

Cada valor es el promedio de tres ensayos enzimáticos y se calcularon las desviaciones estándar. Una unidad de actividad enzimática (U) en sustratos de p-NA se definió como la cantidad de enzima que producía un aumento en la absorbancia a 410 de 0,01/min. Una unidad en polipéptidos era la cantidad de enzima que libera 1 micromol de sustratos/min.

Todas las actividades enzimáticas anteriores se distribuyeron ampliamente en la preparación de la MEZCLA 1. Dado que es muy raro que una cepa microbiana única pueda poseer todas las actividades enzimáticas previas (Cunningham y O'Connor; 1997; Kunjii, y col.; 1996, Antoine Van Leeuwenhoek 70:187-221; Di Cagno et al.; 2004), solo un conjunto de bacterias seleccionadas tales como las contenidas en la MEZCLA 1 puede tener el patrón completo de peptidasas necesarias para la hidrólisis de oligopéptidos ricos en Pro.

La hidrólisis de los oligopéptidos de gliadina por la preparación de MEZCLA 1 durante la fermentación de la masa se caracterizó adicionalmente mediante análisis 2DE. Se identificaron ochenta y cuatro manchas de proteína en la masa químicamente acidificada utilizada como control (Figura 1A). Setenta y nueve de los 84 manchas de oligopéptidos de gliadina se degradaron notablemente después de la fermentación de la masa con la MEZCLA 1 en comparación con el control (Figura 1B). La Tabla 2 se refiere a los factores de hidrólisis de las manchas identificadas por 2DE. La mayoría de los oligopéptidos degradados (65 de los 79) tenían factores de hidrólisis superiores al 80 % y solo 8 mostraron factores de hidrólisis inferiores al 40 %.

Tabla 2

Propiedades de los polipéptidos solubles en alcohol hidrolizados por la MEZCLA 1 después de la incubación de la masa a 37 °C durante 24 h^a.

Designación de la mancha ^b	pI estimado	Masa molecular estimada (kDa)	Factor de hidrólisis
1	6,84	51,0	54,0
2	7,15	49,8	90,5
3	6,55	49,5	85,0
4	6,38	49,0	92,0
5	7,52	48,9	95,4
6	9,40	48,7	87,0
7	7,64	48,5	90,6
8	7,98	48,4	85,0
9	8,05	48,3	90,8
10	9,52	48,1	96,2
11	9,15	48,0	91,5
12	9,87	47,9	90,0
13	9,70	47,8	97,7
14	6,83	47,7	85,0
15	9,10	47,6	92,5
16	9,69	47,0	90,8
17	9,25	46,3	90,8
18	7,08	46,0	52,5
19	8,70	44,5	93,2
20	6,54	44,0	95,6
21	6,63	43,2	0,0
22	7,10	43,0	10,0
23	6,70	42,9	91,4
24	8,04	42,6	67,0
25	6,35	42,5	0,0
26	6,04	41,8	0,0
27	6,49	41,7	87,7
28	6,40	41,6	16,0
29	6,78	41,4	95,0
30	7,00	41,3	47,5
31	7,58	41,2	93,2
32	8,55	41,1	90,1
33	8,45	41,0	85,4

ES 2 655 697 T3

(continuación)

Propiedades de los polipéptidos solubles en alcohol hidrolizados por la MEZCLA 1 después de la incubación de la masa a 37 °C durante 24 h^a.

Designación de la mancha ^b	pI estimado	Masa molecular estimada (kDa)	Factor de hidrólisis
34	8,25	40,9	86,2
35	8,00	40,8	20,5
36	8,68	40,7	93,1
37	8,85	40,65	88,6
38	8,90	40,6	84,8
39	9,18	40,55	81,5
40	6,37	40,5	45,6
41	6,56	40,4	82,0
42	7,20	40,0	93,0
43	6,05	39,9	95,2
44	6,26	39,8	24,8
45	6,48	39,7	95,0
46	6,57	39,6	44,5
47	6,81	39,5	93,5
48	9,55	39,3	91,7
49	7,57	39,0	92,4
50	7,95	38,9	87,9
51	7,80	38,7	92,0
52	8,05	38,6	58,2
53	9,20	38,5	90,8
54	6,62	38,3	0,0
55	6,26	38,2	90,7
56	7,12	38,1	94,8
57	9,64	38,0	93,1
58	8,08	37,9	94,5
59	6,60	37,8	85,7
60	6,26	37,5	91,5
61	6,40	37,3	90,4
62	7,10	37,1	94,8
63	8,06	36,7	91,2
64	9,20	36,5	90,0
65	6,61	36,3	95,7
66	6,85	36,0	90,0
67	8,75	35,8	95,2
68	6,15	35,7	24,8
69	9,65	35,6	95,0
70	9,00	35,5	44,5
71	8,20	35,2	93,5
72	8,48	34,9	91,7
73	8,60	34,7	95,0
74	8,98	34,5	87,9
75	9,14	34,3	82,0

(continuación)

Propiedades de los polipéptidos solubles en alcohol hidrolizados por la MEZCLA 1 después de la incubación de la masa a 37 °C durante 24 h^a.

Designación de la mancha ^b	pI estimado	Masa molecular estimada (kDa)	Factor de hidrólisis
76	9,37	34,1	85,0
77	9,60	33,9	90,8
78	9,51	33,6	0,0
79	8,90	33,0	90,7
80	7,15	32,2	94,8
81	9,45	30,3	90,5
82	9,46	29,3	88,5
83	9,47	28,0	94,7
84	9,48	26,6	96,5

^aLos análisis se realizaron con el software Image Master (Pharmacia). Se analizaron cuatro geles de réplicas independientes. Para la cuantificación de las manchas y el cálculo del factor de hidrólisis, véase Materiales y procedimientos. Todos los factores de hidrólisis se calcularon en base al promedio de las intensidades de las manchas de cada uno de los cuatro geles, y se calcularon las desviaciones estándar. ^bLa designación de la mancha corresponde a los de los geles en la Figura 1A y 1B.

5 Los resultados anteriores mostraron que la MEZCLA 1 tenía la capacidad de hidrolizar casi totalmente los oligopéptidos de gliadina.

10 La actividad de la MEZCLA 1 se caracterizó además in vitro hacia algunos de los oligopéptidos descritos en la literatura como los principales responsables de CQ: el fragmento 62-75 de la A-gliadina (*Silano y De Vincenzi; 1999*) y el epítipo de 33 unidades (*Shan, et al.; 2002*). Como se muestra por el análisis RP-FPLC, el fragmento 62-75 de la A-gliadina, a una concentración de 450 µM, se hidrolizó por completo después de 6 horas de incubación con 5 x 10⁹ ufc/ml de células de la MEZCLA 1. El epítipo de 33 unidades, a una concentración de 200 µM, se hidrolizó por completo después de 24 horas de incubación con la misma concentración celular de la MEZCLA 1 (Figura 2). La cinética de hidrólisis del epítipo de 33 unidades se determinó mediante el gráfico Lineweaver-Burk que muestra una V_{max} de 0,26 µmol por mililitro por minuto y una K_m de 216 µM. Como se ha indicado previamente en la bibliografía, debe observarse que el epítipo de 33 unidades tiene las siguientes propiedades: (i) permanece intacto a pesar de la 15 exposición prolongada a proteasas gástricas y pancreáticas; (ii) muestra una hidrólisis inferior al 20 % durante 20 horas de incubación con pequeñas enzimas de la membrana del borde en cepillo; y (iii) permanece intacto durante un largo tiempo (aproximadamente 24 horas) en el intestino delgado e incluso a baja concentración actúa como antígeno potencial para la proliferación de células T (*Shan, et al., 2002*). Los resultados anteriores mostraron que la MEZCLA 1 contenía el conjunto complejo de actividades enzimáticas necesarias para hidrolizar por completo el 20 epítipo de 33 unidades y que estas actividades son marcadamente más altas que las localizadas a nivel gastrointestinal.

25 En comparación con las referencias de gliadina europeas, la transferencia de tipo Western con el anticuerpo monoclonal R5 de galletas italianas tenía el perfil típico de la gliadina intacta. Una ventaja principal del anticuerpo monoclonal R5 es su capacidad de reconocer la secuencia de aminoácidos de consenso QXPW/FP (*Osman, y col.; 2001, Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13: 1189-1193*). correspondiente múltiple repeticiones del epítipo inmunorreactivo, que se producen en α-, γ- y ω-gliadinas, así como en diferentes variedades de trigo (*Shewry, y col.; 1992, Cereal's proteins and celiac disease. En: Celiac disease, Marsh M. [ed], Oxford, Blackwell Scientific Publications pp.305-348*). La mayor reactividad se ha asociado con la secuencia de aminoácidos de QQPFP, pero las repeticiones homólogas tales como LQPFP, QLPYP, QLPTF, QQSFP, QQTFP, PQPPP, QQPYP y PQPFP 30 también se reconocen con una reactividad más débil al anticuerpo R5 (*Osman, y col.; 2001*). Es interesante observar que tres de estos epítipos (LQPFP, QLPYP y PQPFP) se colocan en la secuencia del potente inductor de líneas de células T humanas derivadas del intestino de pacientes celíacos del péptido A-gliadina de 33 unidades (*Shan, et al., 2002*). La transferencia de tipo Western de la galleta italiana con la MEZCLA 1 mostró una casi degradación de α-, β- y γ-gliadinas reconocidas por el anticuerpo monoclonal R5.

35 Los mismos resultados se confirmaron mediante análisis RAPD PCR.

40 Los experimentos preliminares para la identificación de fracciones de alérgenos de albúminas y globulinas de trigo indicaron que el 100 % de los sueros analizados eran positivos frente a las fracciones de albúmina y globulina. Se encontraron respuestas contra los componentes proteicos con masas moleculares aparentes que variaron de 15 a 70 KDa, con una intensa tinción para algunos sueros de aproximadamente 15 a 45 KDa. Como se determinó mediante SDS-PAGE monodimensional, la comparación de albúminas y globulinas no tratadas con la hidrolizada por la preparación de la MEZCLA 1 puso de relieve la hidrólisis de varios polipéptidos alérgicos potenciales.

Ejemplo 2

La masa madre preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 se usó en la fabricación de productos horneados.

5 Los productos horneados como se desvela en los Ejemplos de la patente de Estados Unidos 6.884.443 se prepararon usando la composición de masa de acuerdo con la presente invención en lugar de la de la patente. La fermentación se llevó a cabo a 37 °C durante 24 horas como se desvela en el Ejemplo 1 anterior y se usó la MEZCLA 1.

Los productos resultaron más digeribles y adecuados para los sujetos afectados por la enfermedad celíaca.

Ejemplo 3

La masa madre preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 con la MEZCLA 2 se usó en la fabricación de pasta.

10 La pasta resultó más digerible y la pueden tomar los sujetos afectados por la enfermedad celíaca.

Ejemplo 4

La MEZCLA 1 de acuerdo con el Ejemplo 1 se usó en la fabricación de fideos según las enseñanzas del documento US 2002/0160093.

15 Se repitieron los Ejemplos 1-4 del documento US 2002/0160093, excepto que se añadió un paquete que contenía una MEZCLA 1 de acuerdo con la presente invención a la mezcla de harina y kansui. Después de amasar, la mezcla se dejó en reposo a 37 °C durante 24 horas. Luego se prepararon fideos como se describe en la referencia.

El producto resultó más digerible y adecuado para los sujetos afectados por la enfermedad celíaca.

Ejemplo 5

20 La MEZCLA 2 de acuerdo con el Ejemplo 1 se usó en la fabricación de fideos según las enseñanzas del documento US 99/65331.

Se repitieron los Ejemplos 1-2 del documento WO 99/65331, excepto que se añadió un paquete que contenía una MEZCLA 2 de acuerdo con la presente invención al ingrediente para la masa. Después de la mezcla, la masa se dejó en reposo a 37 °C durante 24 horas. Luego se prepararon fideos como se describe en la referencia.

El producto resultó más digerible y adecuado para los sujetos afectados por la enfermedad celíaca.

Ejemplo 6

La MEZCLA 1 de acuerdo con el Ejemplo 1 se usó en la fabricación de derivados de pan según las enseñanzas del documento EP 0 614 609.

30 Se repitieron los Ejemplos 1-5 del documento EP 0 614 609, excepto que se añadió un paquete que contenía una MEZCLA 1 de acuerdo con la presente invención a la preparación de la masa. Después de amasar, la masa se dejó en reposo a 37 °C durante 24 horas. Luego se prepararon los productos como se describe en la referencia.

El producto resultó más digerible y adecuado para los sujetos afectados por la enfermedad celíaca.

Ejemplo 7

La MEZCLA 2 de acuerdo con el Ejemplo 1 se usó en la fabricación de espagueti según las enseñanzas del documento EP 1 338 209.

35 Se repitió el Ejemplo del documento EP 1 338 209, excepto que se añadió un paquete que contenía una MEZCLA 2 de acuerdo con la presente invención al ingrediente para la masa. Después de la mezcla, la masa se dejó en reposo a 37 °C durante 24 horas. Luego se prepararon fideos como se describe en la referencia.

El producto resultó más digerible y adecuado para los sujetos afectados por la enfermedad celíaca.

Ejemplo 8

40 Ramyun

Composición:

1. Fideos

Harina:	83-85 %
Aceite refinado:	15-18 %

Sal:	1 %
Otros:	0,6-1 %

2. Base de sopa seca

Copos de carne desecada Sala de soja, Glutamato monosódico, Glutamato disódico, Aditivo aromatizante, Glucosa, Ajo, Cebolla, Cebolla verde, Polvo de pimiento rojo, Otro ingrediente para el sabor

Procedimiento de fabricación de Ramyun

- 5 Se mezclan harina (en ocasiones se puede usar almidón, harina de arroz, harina de cebada en una proporción diferente) y agua de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se añadió MEZCLA 1 a la masa y se dejó reposar a 37 °C durante 24 horas.
- 10 Enrollar la masa mezclada con el rodillo de presión y luego colocar la masa en la máquina para hacer la tira individual de fideos. La forma y el grosor de los fideos pueden modificarse según el grosor y la forma deseados ajustando el tamaño de la ranura de la trituradora y también la velocidad de la cinta transportadora que lleva los fideos.
- Los fideos pasan a través de la caja de vapor cuya temperatura es superior a 100 °C para inducir al almidón pregelatinizado (almidón) para facilitar la digestión.
- Después del procedimiento de cocción al vapor, los fideos se forman en la forma determinada por la caja de moldeo.
- 15 Procedimiento de fritura profunda: Dependiendo del tipo de Ramyun, la deshidratación se produce mediante un procedimiento de fritura profunda. El fideo pasa por un procedimiento de fritura profunda a 150 °C. Algunos Ramyun no pasan por este procedimiento de fritura profunda.
- Después del procedimiento de fritura profunda, el Ramyun pasa por un procedimiento de enfriamiento.
- 20 De acuerdo con la presente invención, la mezcla específica de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias es adecuada para la fabricación de alimentos a base de cereales, en particular productos horneados, que pueden ser más tolerados por pacientes con CQ. En particular, En particular, se proporcionan las siguientes ventajas:,
 - (i) capacidad marcada para degradar los oligopéptidos de gliadina durante la fermentación de la masa;
 - ii) hidrólisis de 79 de los 84 oligopéptidos de gliadina identificados mediante análisis 2DE;
 - (iii) actividades enzimáticas complementarias y grandes hacia péptidos sintéticos que incluían prolina en las diferentes posiciones;
 - 25 (iv) capacidad de hidrólisis completa de oligopéptidos (fragmentos 62-75 de A-gliadina y epítipo de 33 unidades) que son responsables de CQ;
 - (v) capacidad para disminuir marcadamente α -, β - y γ -gliadinas que reaccionaron con el anticuerpo monoclonal R5;
 - 30 (vi) capacidad para hidrolizar varios polipéptidos alergénicos.
 - (vii) cuando la actividad de las bacterias anteriores se complementa con proteasas fúngicas y se utiliza para producir harina de trigo al 20% en fermentación líquida, aumenta fuertemente la producción de harina de trigo sin gluten.

REIVINDICACIONES

1. Una masa madre que comprende una mezcla de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infants*, y *Bifidobacterium longum*, y una enzima proteolítica microbiana de uso en la industria de panificación.
2. La masa madre según la reivindicación 1, en la que la enzima proteolítica se obtiene de *Aspergillus sp.*
3. La masa madre de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que además comprende un agente de fermentación.
4. Un alimento que comprende la masa madre de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. El alimento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho alimento se selecciona del grupo que consiste en galletas, hojaldres, pasteles, tartas, pizza, galletas saladas, colines, fideos, espagueti y pasta, ramyun.
6. Un paquete que comprende:
una mezcla de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infants* y *Bifidobacterium longum*, en el que dicha mezcla está en un único recipiente solo o mezclado con una enzima proteolítica microbiana de uso en la industria de la panificación.
7. La masa madre de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o del alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-5 para su uso como producto dietético y no alergénico para dietas entéricas.
8. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso adicional en inducir o mantener la tolerancia al gluten en un sujeto que padece celiaquía.
9. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso posterior en la disminución del riesgo de alergias debido a albúminas y albúminas de harina de trigo.
10. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso adicional en el tratamiento de síntomas esquizofrénicos en un paciente celíaco o un paciente no celíaco.
11. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso adicional en la reducción del factor agregante de plaquetas (PAF) y/o citocinas inflamatorias en enfermedades gastrointestinales.
12. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha enfermedad es una enfermedad inflamatoria.
13. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en necrosis intestinal isquémica, úlcera gástrica, rectocolitis hemorrágica, enterocolitis necrotizante, enterocolitis necrosante del neonato, enfermedad inflamatoria intestinal y reservoritis

FIGURA 1

Análisis 2DE de fracciones de la proteína gliadina de diferentes masas hechas con harina de trigo. (A) Masa acidificada químicamente (control). Masa incubada durante 24 horas a 37 °C con la MEZCLA 1. Mr, masa molecular

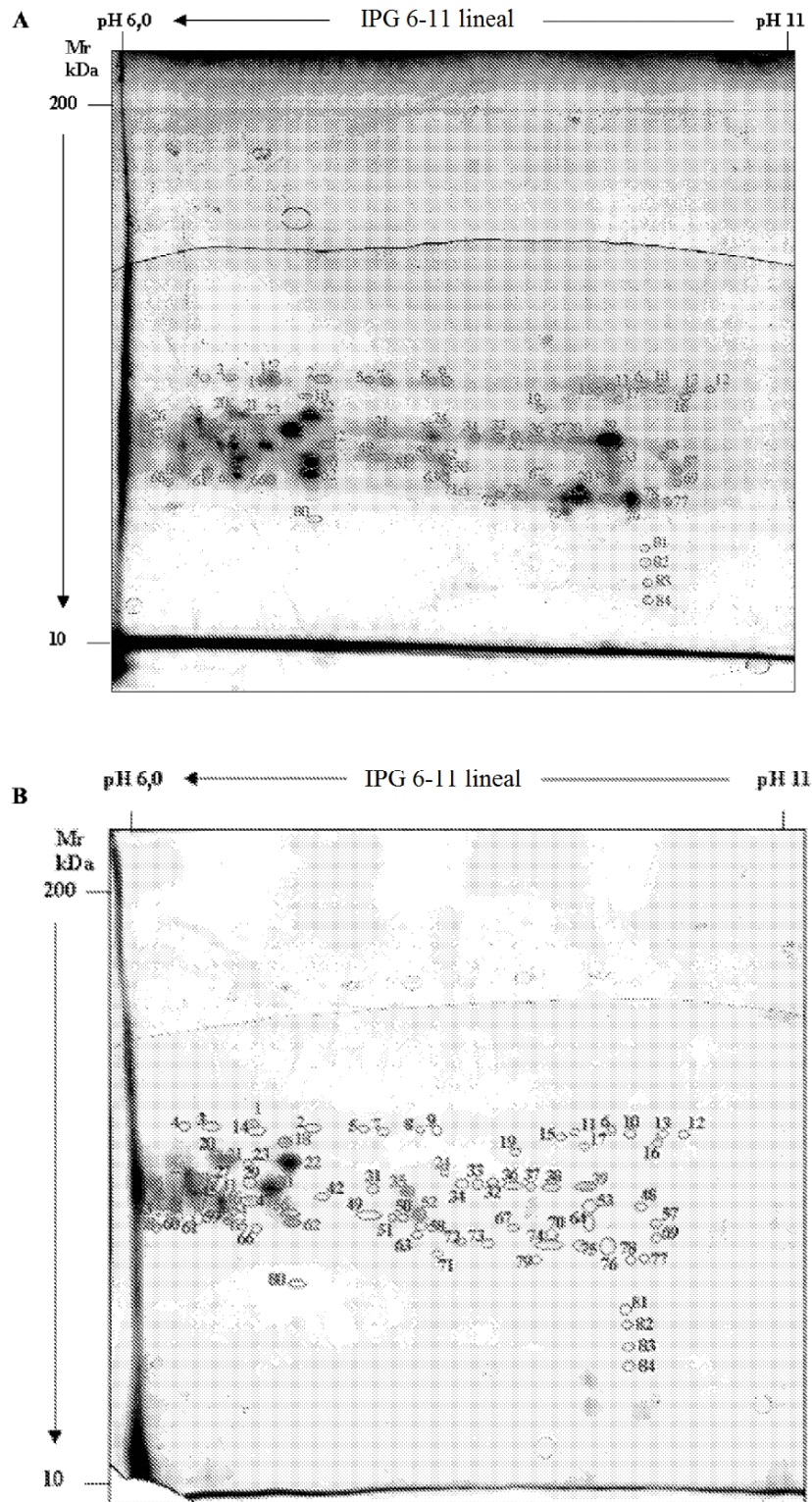


FIGURA 2

Hidrólisis del péptido de 33 unidades mediante MEZCLA 1 (10^9 ufc/ml): sin inóculo microbiano (A) y tras la hidrólisis por MEZCLA 1 (B)

