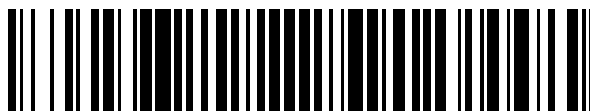


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 271**

51 Int. Cl.:

A23L 5/30	(2006.01) A23L 33/00	(2006.01)
A21D 13/06	(2007.01)	
C12C 1/02	(2006.01)	
A23L 5/20	(2006.01)	
A23L 7/10	(2006.01)	
A23L 7/196	(2006.01)	
A21D 13/066	(2007.01)	
A23L 3/3463	(2006.01)	
A23L 3/3472	(2006.01)	
A23B 9/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016** **PCT/EP2016/081589**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017** **WO17103214**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016** **E 16823236 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 3389400**

54 Título: **Procedimiento de eliminación de toxinas de proteínas del gluten de granos de cereales y sus usos en el campo médico**

30 Prioridad:

17.12.2015 IT UB20159442

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2020

73 Titular/es:

NEW GLUTEN WORLD S.R.L. (100.0%)
Viale Michelangelo 177
71121 Foggia, IT

72 Inventor/es:

LAMACCHIA, CARMELA

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 753 271 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

Procedimiento de eliminación de toxinas de proteínas del gluten de granos de cereales y sus usos en el campo médico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para eliminar toxinas de proteínas del gluten de granos de cereales que hace posible obtener harinas desintoxicadas con una reducción de la antigenicidad de los epítopos tóxicos de las proteínas del gluten a un intervalo entre 0 y 20 ppm y de manera que puede usarse ventajosamente para la preparación de productos alimenticios (por ejemplo, productos panificables, pasta o
10 productos lácteos) que tienen un efecto preventivo y/o terapéutico manifiesto para la disbiosis intestinal causada por agentes infecciosos bacterianos o víricos o por patologías con un fuerte componente inflamatorio o autoinmune tal como la enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome de intestino irritable.

15 El gluten es un complejo alimenticio que consiste principalmente en proteínas. Las prolaminas constituyen aproximadamente el 80 % de la fracción proteica completa presente en la cariósida de los cereales y se clasifican en función de su solubilidad en solución hidroalcohólica en gliadina y gluteninas. Las gliadinas, solubles en soluciones hidroalcohólicas, son moléculas monoméricas clasificadas normalmente como alfa, beta, gamma y omega (de acuerdo con la movilidad electroforética) para las cuales la condición monomérica se debe a la ausencia de restos de cisteína, como en el caso de las omega-gliadinas, o a la presencia de solo enlaces disulfuro
20 intramoleculares (las gliadinas restantes).

Las gluteninas, en cambio, son un complejo polimérico, insoluble en soluciones hidroalcohólicas constituidas por subunidades con alto (HMW-GS) y bajo (LMW-GS) peso molecular, estabilizadas por puentes disulfuro intermoleculares.

25 Las gliadinas y las gluteninas proporcionan harinas con propiedades tecnológicas; las gliadinas contribuyen a la viscosidad de la masa, mientras que las gluteninas son responsables de su elasticidad y firmeza.

30 En particular, la cantidad y las dimensiones de los polímeros de glutenina se correlacionan positivamente con las propiedades tecnológicas de las masas.

Por lo tanto, estas características de los polímeros de glutenina dependen de la capacidad de las subunidades de componentes individuales para formar polímeros más o menos extendidos.

35 El gluten, en particular, no está presente como tal en la cariósida del cereal, pero se forma más adelante; el gluten como complejo proteico se forma después de la hidratación y la acción mecánica del amasado y es un elemento esencial para el procesamiento de harinas y para la elaboración de pan, ya que proporciona viscosidad y elasticidad a la masa.

40 Como es bien sabido, cuando se añade agua a la harina, las gliadinas (formadas por una sola cadena de proteínas) comienzan a hidratarse formando fibrillas (fibras pequeñas y delgadas) que proporcionan extensibilidad a la malla de gluten. De forma simultánea, las gluteninas (que comprenden varias subunidades de proteínas) también se ensamblan, originando una malla y formando una estructura estable y altamente cohesiva, que proporciona a la masa consistencia y cierta resistencia a la extensión y elasticidad.

45 La intensidad y el grado de fermentación dependen, por lo tanto, de la proporción entre el contenido de gliadina y glutenina de la harina. La relación entre las dos clases de proteínas depende de la variedad de cereal considerada y proporciona al gluten la capacidad de deformarse y resistir el estiramiento. Durante la acción mecánica de amasado, las fibrillas de gliadina y los polímeros de glutenina comienzan a entrelazarse entre sí, formando una malla tridimensional que incorpora gránulos de almidón, lípidos, sales minerales, agua y burbujas de aire, siendo estas últimas muy importantes para la fermentación alcohólica de las levaduras que luego se añaden y que, a través de la producción de alcohol y dióxido de carbono, determinan la expansión de las mallas del gluten, que se expanden y estiran haciendo que aumente el volumen de la masa. La cocción posterior determina la
50 desnaturalización/coagulación de las proteínas y, por lo tanto, el gluten, al perder su capacidad de estiramiento, estabiliza irreversiblemente la estructura y la forma de la masa.

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

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

Por otro lado, el gluten es capaz de realizar actividad tóxica, en particular con respecto a la mucosa intestinal; la intolerancia permanente al gluten de trigo y a las proteínas correspondientes de centeno, cebada y avena, como para desencadenar la cascada inflamatoria de las citocinas que causan daño citológico, se define como enfermedad celíaca.
65

Inicialmente, se pensaba que la acción tóxica del gluten era causada por la fracción alfa de gliadina; posteriormente, se demostró que las omega gliadinas y las gluteninas también pueden causar daño a la mucosa intestinal, al igual que las prolaminas de cereales similares como la cebada (hordeína), el centeno (secalina) y la avena (avenina).

De reciente interés ha sido el estudio de un péptido de 33 aminoácidos de alfa-gliadinas conocido como 33-mer; dicho péptido es capaz de resistir la acción proteolítica de las enzimas digestivas, llegando enteramente a la mucosa intestinal donde, teniendo una alta afinidad por la transglutaminasa tisular, ejerce una poderosa acción inmunogénica en individuos sensibles; esta acción se determinaría, como resultado de la desamidación de los epítomos tóxicos del péptido, mediante una activación intensa de los linfocitos T CD4 que liberan citocinas inflamatorias que causan daño citológico (Shuppan D. et al., 2009).

También se ha demostrado que otros epítomos tóxicos de alfa-gliadina aparentemente son capaces de inducir apoptosis de enterocitos que se originan a partir de explantes de mucosa intestinal de pacientes celíacos.

Por lo tanto, el gluten tiene un efecto nocivo en la mucosa intestinal al desencadenar la cascada inflamatoria de las citocinas y causar un efecto tóxico directo.

Aproximadamente el 30 % de la población general tiene genes de susceptibilidad a la enfermedad celíaca, HLA-DQ2/8; sin embargo, solo el 2-5 % de estos individuos desarrollarán la enfermedad celíaca, lo que sugiere que factores ambientales adicionales contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Rossi M. et al., 2010). Se desconocen los factores adicionales que influyen en el desarrollo de la enfermedad celíaca, pero podrían incluir la alteración de la microbiota intestinal. De hecho, algunos estudios han demostrado que los pacientes con enfermedad celíaca en curso tenían una composición cualitativa cuantitativa alterada de la microbiota fecal y duodenal en comparación con un individuo sano, posteriormente restaurado parcialmente después del tratamiento con una dieta libre de gluten. En particular, los cambios más importantes se refieren a variaciones en la cantidad de *Firmicutes* y *Proteobacterias* en niños y adultos con enfermedad celíaca activa (Sanchez E. et al., 2013; Wacklin P. et al., 2013). Otros estudios han informado una disminución en la concentración de bacterias protectoras con efectos antiinflamatorios, tales como *Bifidobacterium*, y un aumento de bacterias Gramnegativas, tales como *Bacteroides* y *Escherichia coli* en pacientes con enfermedad celíaca activa (Collado M. et al., 2009; Collado M. et al., 2008; Di Cagno R. et al., 2011).

Por otro lado, los niños afectados por la enfermedad celíaca generalmente exhiben un aumento de *Staphylococcus* spp. (Collado M. et al., 2009; Collado M. et al., 2008; Di Cagno R. et al., 2011, *Clostridium* spp. (Di Cagno R. et al., 2011; De Palma G. et al., 2010) y una disminución de *Lactobacillus* spp. (Di Cagno R. et al., 2011, Sanz Y. et al 2007; Nadal M. et al., 2007). Además, los pacientes con enfermedad celíaca exhibieron una composición y una función metabólica alterada de la microbiota en términos de producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, de sus siglas en inglés) (Di Cagno R. et al., 2011; Schippa S. et al., 2010). Un estudio ha demostrado que la composición microbiana intestinal en pacientes afectados por enfermedad celíaca se asoció con la manifestación clínica de la enfermedad. La flora intestinal en pacientes en presencia de síntomas gastrointestinales está dominada por *Proteobacterias*, mientras que la microbiota de pacientes con Dermatitis Herpetiforme o de individuos que viven en dispepsia (controles) han visto la prevalencia de *Firmicutes* (Wacklin P. et al., 2013).

Hasta la fecha, el único tratamiento para pacientes celíacos es la exclusión completa del gluten de la dieta. Una dieta llamada "sin gluten" alivia muchos de los síntomas, pero sorprendentemente los estudios sugieren que dicho tratamiento no permite restaurar completamente los perfiles de la microbiota presente en sujetos sanos (Wacklin P. et al., 2014).

Parece que la dieta en sí misma impide la restauración completa de acuerdo con los modelos microbianos normales. También en pacientes sanos sometidos a una dieta libre de gluten, además, el delicado equilibrio entre microorganismos grampositivos y gramnegativos falla, con las bacterias útiles reemplazadas rápidamente por patógenos oportunistas. El resultado a largo plazo puede conducir a un debilitamiento de las defensas inmunes y a un estado de inflamación crónica. Esto genera una situación en la que los pacientes celíacos, si bien se adhieren a una rigurosa dieta sin gluten, aún están expuestos al riesgo de inflamación e infecciones, y podrían sufrir síntomas bastante desagradables y un aumento de los riesgos para la salud.

El potencial uso de probióticos en el tratamiento de la enfermedad celíaca está respaldado por la disbiosis intestinal generalmente asociada a la enfermedad celíaca y al papel atribuido a estas bacterias potencialmente beneficiosas (es decir, "probióticos") para mantener el funcionamiento de la barrera intestinal y regular la respuesta innata y adaptativa del sistema inmunitario. La Figura 1 muestra un modelo que ilustra la patogenia de la enfermedad celíaca. La composición genética específica del hospedador y los factores ambientales podrían promover la colonización de patobiontes y reducir los simbiosis, determinando así la disbiosis. La disbiosis puede contribuir a interrumpir la homeostasis y la integridad inmunitaria del intestino, promoviendo así la insurgencia de la enfermedad celíaca y la patogenia agravante (Cenit M.C. et al., 2015). Basándose en esta hipótesis, hasta la fecha se han llevado a cabo tres estudios sobre tantas intervenciones en pacientes celíacos seleccionados al azar, controlados con placebos en un procedimiento doble ciego. En una de estas intervenciones, se administró *Bifidobacterium infantis* NLS a pacientes celíacos no tratados para evaluar el efecto del probiótico independientemente de la dieta libre de gluten. Este estudio ha mostrado una mejora en algunos síntomas gastrointestinales, específicamente indigestión y

estreñimiento, en pacientes no tratados con enfermedad celíaca después de la administración de *Bifidobacterium infantis* NLS. Además, no mejoró la situación de diarrea o de dolores abdominales, o modificó la permeabilidad intestinal o el estado proinflamatorio medido como en los niveles séricos de algunas citocinas y quimiocinas (Smecuol E. et al., 2013). Otro estudio sobre intervenciones analizó la influencia de *Bifidobacterium longum* CECT 7347 en niños celíacos con una dieta libre de gluten, para evaluar si estas bacterias bífidas probióticas podrían mejorar la eficacia de la dieta libre de gluten. Este estudio reveló una disminución en los linfocitos T periféricos CD3+ y una tendencia a la reducción de los niveles séricos de TNF- α después de la administración de *Bifidobacterium longum* CECT 7347 y también una reducción significativa en el número de *Bacteroides fragilis* y sIgA en las heces en comparación con el grupo tratado con placebo (Olivares M. et al., 2014). Un reciente estudio de tres meses de duración evaluó el efecto de la combinación de las cepas *Bifidobacterium breve* BR03 y *Bifidobacterium breve* B632, en comparación con el placebo, en niños con enfermedad celíaca con una dieta libre de gluten. El estudio informó que las cepas de *Bifidobacterium breve* reducen la producción de citocinas TNF- α proinflamatorias en niños con enfermedad celíaca con una dieta libre de gluten (Klemenak M. et al., 2015).

Las limitaciones en el uso de probióticos como terapia en la prevención y el cuidado de la enfermedad celíaca residen en el hecho de que son microorganismos que deben llegar vivos al intestino y deben adherirse a las células intestinales. Por otro lado, los probióticos son microorganismos exógenos cuya colonización podría ser transitoria y los modestos resultados de los probióticos obtenidos en los estudios antes mencionados también pueden explicarse por el número relativamente bajo de bacterias presentes en las preparaciones comerciales, también por el hecho de que las especies individuales pueden no ser capaces de competir con la flora intestinal que comprende miles de bacterias pertenecientes a más de 40.000 especies diferentes.

A partir de esta necesidad - es decir, la necesidad de ser capaces de producir productos alimenticios que sean típicos de la dieta mediterránea, como el pan y pastas procedentes del trigo, en los que el gluten presente no solo no es inmunogénico, sino que en realidad es capaz de fortalecer la microflora intestinal del paciente celíaco que sirve como agente protector con respecto a los microorganismos útiles hasta que se restablece el equilibrio de la microbiota, que puede usarse en la prevención y en la terapia dietética de la enfermedad celíaca, causada por la pérdida de la homeostasis generada por una microflora útil débil - se deriva esta invención.

La solicitud de patente internacional WO2014/053891 describe un procedimiento para la eliminación de toxinas de proteínas del gluten de granos de cereales para hacerlas no inmunogénicas para pacientes celíacos y para reducir la antigenicidad de los epítomos tóxicos a un intervalo entre 60 y 40 ppm (Lamacchia C. et al., 2016).

El autor de la presente invención ha ideado un procedimiento mejorado para eliminar toxinas de proteínas del gluten de granos de cereales dirigidos a obtener harinas que no están solo desintoxicadas, sino también harinas en las que la antigenicidad de las proteínas se reduce aún más a un intervalo entre 0 y 20 ppm, y con efecto terapéutico en la prevención y en el tratamiento terapéutico de la disbiosis intestinal causada por una microflora útil débil como resultado de inflamación y/o infección en una gama mucho más amplia de pacientes. En particular, el autor de la presente invención ha identificado un estado de transición vítrea que las proteínas del gluten son capaces de alcanzar mediante una alternancia específica de etapas del procedimiento para procesar los granos hidratados antes de la molienda de acuerdo con la presente invención: calentamiento rápido por microondas y evaporación del agua libre y aglomerada contenida en los granos.

Más específicamente, a través de la alternancia de las etapas de calentamiento rápido por microondas y de evaporación lenta del agua contenida en los granos, es posible resolver el problema de la producción de harinas con gluten que, además de no ser inmunogénicas y tóxicas para pacientes celíacos, exhibe una reducción de la antigenicidad de los epítomos tóxicos del gluten a un intervalo entre 0 y 20 ppm y es capaz de fortalecer, de manera sorprendente e inesperada, la microflora intestinal útil del mismo paciente celíaco, restaurando su equilibrio y previniendo la insurgencia y/o la perpetuación de la inflamación intestinal presente también en muchas otras afecciones crónicas.

Por lo tanto, a través del procedimiento de la presente invención es posible producir diferentes productos alimenticios (es decir, productos de panadería o panificables o pastas), que pueden usarse en la prevención y en la terapia dietética de patologías inflamatorias intestinales crónicas tales como enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable causado por la pérdida de la homeostasis generada por una microflora probiótica débil.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la eliminación de toxinas del gluten de granos de cereales, que comprende las siguientes etapas:

- a) hidratar los granos de cereal con agua hasta un grado de humedad de los granos comprendido entre un 15 y un 18 %;
- b) tratar los granos hidratados mediante ondas electromagnéticas, preferentemente microondas o infrarrojos, durante un tiempo y con una potencia necesaria para alcanzar una temperatura de los granos comprendida entre 60 y 70 °C;
- c) suspender la irradiación hasta que se alcance una temperatura comprendida entre 50 y 60 °C y la evaporación

simultánea de agua con una pérdida de humedad de los granos comprendida entre un 14 y un 16 % en comparación con la etapa a);

d) tratar los granos hidratados mediante ondas electromagnéticas, preferentemente microondas o infrarrojos, durante un tiempo y con una potencia necesaria para alcanzar una temperatura de los granos comprendida entre 80 y 90 °C;

e) suspender la irradiación hasta una temperatura comprendida entre 70 y 80 °C y la evaporación simultánea de agua con una pérdida de humedad de los granos comprendida entre un 40 y un 44 % en comparación con la etapa a);

f) tratar los granos hidratados mediante ondas electromagnéticas, preferentemente microondas o infrarrojos, durante un tiempo y con una potencia necesaria para alcanzar una temperatura de los granos comprendida entre 110 y 120 °C;

g) suspender la irradiación dentro del horno de microondas hasta una temperatura comprendida entre 80 y 90 °C y la evaporación simultánea de agua con una pérdida de humedad de los granos comprendida entre un 50 y un 60 % en comparación con la etapa a);

h) enfriar lentamente los granos desintoxicados a temperatura ambiente.

El procedimiento antes mencionado se lleva a cabo preferentemente usando microondas, más específicamente, usando un horno de microondas como un dispositivo para emitir dichas microondas en las diferentes etapas de procesamiento de los granos hidratados.

Alternativamente, se puede usar un dispositivo láser para emitir las ondas electromagnéticas.

De acuerdo con una realización preferente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa adicional i) de moler el grano de la etapa h) para obtener la harina o la sémola. De acuerdo con una realización alternativa, el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende una etapa adicional 1) de extracción con disolvente (es decir, agua/solución salina de cloruro de sodio) de las harinas o sémola de la etapa i) para obtener el gluten desintoxicado.

La expresión "temperatura ambiente" significa, preferentemente, un intervalo de temperatura entre 20 °C y 25 °C. Preferentemente, los granos son cereales, más preferentemente trigo, cebada, centeno o avena.

En las etapas b), d), f) del procedimiento de acuerdo con la invención, lo importante es la temperatura alcanzada dentro de los granos, no la potencia de las ondas electromagnéticas que, a través del agua contenida en los granos, permiten alcanzar altas temperaturas en poco tiempo.

Las imágenes que se muestran en la Figura 2 demuestran que las microondas en sí mismas no determinan el cambio en la estructura de la proteína del gluten, sino más bien el logro de las condiciones de temperatura y humedad dadas, en particular en la última etapa de suspender la irradiación-evaporación del agua (etapa g) del procedimiento) en la que el contenido de humedad de los granos alcanzó un 5-7 % y la temperatura alcanza aproximadamente 100 °C. De la Figura 2 también es evidente que, en esta etapa solamente, las proteínas del gluten ya no son totalmente reconocibles por los anticuerpos fluorescentes dentro de los granos.

Todas las etapas descritas anteriormente son necesarias: hidratar los granos a una humedad entre un 15 y un 18 % de la etapa a) permite que las semillas acumulen la cantidad de agua necesaria para transformar las ondas electromagnéticas, preferentemente microondas, en energía térmica en un procedimiento de termalización. Las moléculas de agua pueden rotar, vibrar y alinearse bajo la acción de los campos eléctricos. En su movimiento, chocan con las moléculas vecinas y este tipo de roce molecular provoca el calentamiento de la masa irradiada.

La posterior irradiación de la etapa b) con microondas permite calentar la muestra que en la primera etapa de irradiación debe alcanzar una temperatura entre 60 y 70 °C. Cuanto mayor sea el grado de humedad, menor será la potencia aplicada en un determinado intervalo de tiempo para alcanzar la temperatura deseada. El intervalo de tiempo para alcanzar la temperatura deseada será una función de la masa a irradiar.

A modo de ejemplo: 100 g de granos con una humedad del 15-18 % alcanzarán la temperatura de 60-70 °C en 1 minuto aplicando una potencia de 750 W.

Por lo tanto, mientras que el grado de humedad está inversamente correlacionado con la potencia a aplicar, el tiempo de irradiación es directamente proporcional a la masa de la muestra a irradiar.

La etapa de suspender la irradiación-evaporación debe llevarse a cabo preferentemente dentro del horno de microondas para permitir un procedimiento de transferencia del agua desde la capa más interna de los granos a la periferia y desde la periferia a la superficie y desde la superficie de los granos a la superficie al ambiente exterior. El procedimiento debe realizarse lentamente y sin exponer los granos a la temperatura externa del dispositivo que se utiliza para calentar, es decir, el horno de microondas. Esto podría causar solo una evaporación del agua en la superficie de los granos, sin permitir la eliminación de una parte del agua unida a las moléculas.

La etapa de irradiar y suspender la irradiación-evaporación se repite n veces, alternativamente, hasta alcanzar el estado de transición vítrea de las proteínas del gluten, es decir, el estado en el que, en determinadas condiciones de humedad y temperatura, las proteínas del gluten se vuelven plásticas (véase Figura 3).

5 Cada proteína tiene su propia conformación, es decir, una característica forma tridimensional, en la que se pueden identificar diferentes niveles de organización. Como se muestra, la estructura primaria está dada por la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica, unidos entre sí mediante enlaces covalentes. El siguiente nivel es la estructura secundaria, que se forma cuando se establecen enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos de la estructura primaria, causando su torsión. La estructura terciaria de una proteína se produce por la interacción entre
10 los aminoácidos ubicados en diferentes puntos de la estructura secundaria y se debe principalmente a los pliegues de la cadena polipeptídica en los segmentos de unión entre las hélices alfa y las hojas plegadas de la estructura secundaria. La estructura cuaternaria es el resultado de la forma en que dos de las cadenas polipeptídicas, llamadas subunidades, se unen e interactúan entre sí. El procedimiento de la presente invención permite que las proteínas del gluten alcancen un estado de transición vítrea en el que las moléculas no vibran, sino que se mueven gracias a la
15 ruptura de los enlaces de la estructura secundaria y terciaria y las moléculas se vuelven plásticas/gomosas (Noel TR et al. 1995; Micard V. y Guilbert S., 2000). En particular, los enlaces de hidrógeno y los enlaces iónicos que unen grupos con carga opuesta, pero también los enlaces de disulfuro que permiten a las proteínas mantener su conformación secundaria y terciaria, rompen las moléculas que se mueven en el espacio, modificando su estructura secundaria y terciaria.

20 La proteína del gluten hecha plástica por este procedimiento tenderá a agregarse de una manera no convencional, porque están presentes en forma natural en los cuerpos proteicos de los granos maduros (Tosi P. et al., 2011) como se muestra en la Figura 4. La Figura 4 muestra que después del tratamiento con el procedimiento de la invención, no solo las proteínas no son reconocibles por sus propios anticuerpos, sino que es evidente una agregación de las
25 proteínas en el cuerpo proteico de las semillas tratadas con respecto a las semillas de control. En particular, las proteínas no se agregarán por medio de enlaces covalentes (Figura 5), como ocurre en una estructura del gluten ya formada y sometida a altas temperaturas (cocinando la masa en el horno, secando la pasta; Lamacchia C. et al., 2007; Gerrard J.A., 2000), sino mediante enlaces iónicos que unen grupos con carga opuesta generados por el cambio de la estructura secundaria y terciaria de la molécula cuando está presente en forma natural en los cuerpos
30 proteicos de los granos maduros. La Figura 5 muestra una electroforesis en gel realizada en condiciones reductoras que no muestra ninguna diferencia en los pesos moleculares de las proteínas extraídas de las harinas de las semillas de control y las semillas tratadas con el procedimiento de la presente invención, destacando que la proteína no solo no experimenta cambios en la estructura primaria, sino también que la agregación visible en los cuerpos proteicos de las semillas después del tratamiento térmico de acuerdo con el procedimiento de la presente invención
35 no puede ser a través de enlaces covalentes, de díptirosina y/o isopeptídicos (Gerrard JA, 2000; Lamacchia C. et al., 2007; Tilley K.A. et al., 2001). En este caso, debería haberse observado un desplazamiento de las bandas de proteínas hacia pesos moleculares más altos. Por lo tanto, la agregación observada en los cuerpos proteicos de las semillas tratadas, no puede ser covalente, es decir, no se logra mediante la formación de enlaces covalentes.

40 La etapa h) de enfriamiento lento a temperatura ambiente del procedimiento de acuerdo con la invención permite que las moléculas cristalicen en este estado de agregación no convencional.

Los puntos clave de este procedimiento mejorado están representados por:

45 1) uso de agua, que cumple una doble función. La primera es transformar las ondas electromagnéticas, preferentemente las microondas, en energía térmica en un procedimiento de termalización. La segunda es permitir que las proteínas del gluten alcancen un estado de transición vítrea, un estado que las hace plásticas, que evapora lentamente y arrastra con ellas también una parte del agua unida. Se prefiere particularmente el uso de microondas, ya que no son radiaciones ionizantes y no pueden romper
50 enlaces. Por lo tanto, su única función es permitir que las moléculas de agua vibren y generen calor en poco tiempo.

3) generación del calor, que también tiene una doble función. Permite que el agua libre y unida se evapore y que las proteínas del gluten, encerradas en los cuerpos proteicos de los granos maduros en forma natural, alcancen un estado en el que las proteínas no vibran, sino que se mueven.

55 Este movimiento está habilitado por la ruptura de puentes de hidrógeno y enlaces iónicos que causan el cambio de la estructura secundaria y terciaria de las propias proteínas, haciéndolas plásticas (Figura 3). Este cambio lleva manifiestamente a una exposición de cargas por parte de la proteína, justificada por el hecho de que el gluten con este procedimiento se vuelve soluble en agua. La exposición de las cargas debido a una pérdida de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas conduce a una agregación entre las proteínas presentes en el
60 mismo cuerpo proteico y con una carga diferente. La figura 6 muestra esquemáticamente el caso en el que antes de la aplicación del procedimiento de la presente invención las proteínas del gluten están encerradas en cuerpos proteicos de los granos de trigo asumiendo su estructura tridimensional natural. Después de la aplicación del procedimiento de la presente invención, las proteínas alcanzan el estado de transición vítrea, se vuelven plásticas y pierden su estructura tridimensional. Este cambio conduce a una exposición de cargas por la proteína, justificada por el hecho de que el gluten, con este procedimiento, se vuelve soluble en agua. La exposición de las
65 cargas debido a una pérdida de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas conduce a una agregación

entre las proteínas presentes en el mismo cuerpo proteico y con una carga diferente. Se podría hipotetizar gliadina (-) + LMW (+), albúmina (+) + gliadina (-), globulina (+) + gliadina (-), como se muestra en la imagen representada en la Figura 6.

Para confirmar aún más la hipótesis anterior, además del análisis de inmunofluorescencia de las seis etapas A-F del proceso de eliminación de toxinas en el panel a) de la Figura 21, el panel b) muestra el análisis de umbral de imagen de las etapas anteriores utilizando el programa informático "Image J" (<http://imagej.nih.gov/ij>). El panel c) muestra los resultados de la SDS-PAGE de las fracciones de proteína de gliadina en relación con cada etapa y de la harina de peso de control (HPC) extraída en EtOH al 70 %. El panel d) muestra una tabla de resumen del % de disminución en relación con los valores de VGM (valor gris medio) obtenido del análisis de las etapas de imagen de microscopía y la densidad óptica (DO) en relación con las fracciones de proteína gliadina expresadas en SDS-PAGE. A partir del análisis de imagen de las seis etapas A-F ilustradas en el panel b), es posible observar a simple vista una disminución regular del brillo, es decir, de la fluorescencia debida al marcado por el anticuerpo 0610, que reconoce la fracción de proteína gliadina y LMW-GS, en cada etapa. La disminución se confirma mediante el análisis de los valores grises medios informados en la tabla ilustrada en el panel c), en donde se ha llevado a cabo una comparación entre cada etapa. La disminución regular y significativa en cada etapa es representativa como un cambio estructural de las proteínas, que los anticuerpos ya no reconocen. La disminución es regular porque en cada etapa corresponde un valor de temperatura y humedad, en el cual una clase de proteína precisa registra su cambio estructural, es decir, su "transición" de estado sólido a gomoso/plástico. En otras palabras, cada clase de proteína presentará su propia temperatura de transición vítrea relativa (Tg) basada en su estructura química, más allá de eso las cadenas de polímero serán libres de moverse y modificar la conformación. En particular, a temperaturas más bajas (entre 50-65 °C), por lo tanto, en las etapas iniciales del procedimiento, las albúminas, las globulinas y las proteínas LMW serán las primeras en encontrar un cambio junto con las HMW (según lo observado por Lamacchia C. et al. 2007); a una temperatura de aproximadamente 70 °C, las gliadinas comenzarán primero a cambiar su conformación estructural y terminarán en las etapas finales del procedimiento (80-90 °C). Para demostrar este evento, se ha llevado a cabo un análisis SDS-PAGE de gliadinas extraídas en etanol de los granos en cualquier procedimiento por etapas. El análisis SDS-PAGE muestra en particular una disminución de la banda en las etapas A a F y con respecto al control, mostrando cómo las gliadinas, que no presentan restos de cisteína disponibles para crear enlaces disulfuro entre cadenas en su conformación natural, están implicadas en este tipo de enlace durante las etapas intermedias y finales del procedimiento debido a un cambio conformacional que causa una exposición de restos de cisteína.

Es posible observar que la reducción de banda (DO) no es comparable a la reducción de brillo (VGM) observada durante las seis etapas del procedimiento mediante la técnica de microscopía, lo que confirma que la reducción de la reactividad cruzada de las proteínas del gluten contra el anticuerpo 0610 es debido a un cambio conformacional de las proteínas y/o por la cobertura del epítipo, que es causada por una fuerte agregación entre las proteínas durante las etapas del procedimiento (como se muestra en la Figura 4), generada por enlaces iónicos que conectan grupos de carga opuestos que ocurren después del cambio de estructura terciaria después de la transición vítrea y no por enlaces covalentes (véase Figuras 5 y 21).

4) mediante enfriamiento lento, lo que permite que la nueva estructura de la proteína permanezca cristalizada en este nuevo estado. La presente invención también se refiere a granos, harina o sémola o gluten desintoxicados obtenibles con el procedimiento de acuerdo con la invención. La harina o la sémola pueden ser de trigo, centeno, cebada o avena y se pueden obtener después de la molienda de la etapa adicional i). El gluten puede ser de trigo, centeno, cebada o avena, obtenible después de la extracción con disolvente de las harinas y/o de la sémola de la etapa adicional 1).

El término "desintoxicado", en el contexto de la presente invención cuando se refiere a harinas o sémola, significa un nivel de epítomos de gluten tóxico reducido a un intervalo entre 0 y 20 ppm. Esto hace posible considerar que estas harinas o sémolas están "libres de gluten" para todos los propósitos de la ley, aunque el gluten todavía está presente dentro de ellas.

La invención se refiere a un producto alimenticio que comprende harina de trigo, sémola de trigo, cebada o avena, seleccionado entre pan, pasta, productos panificables, cereales para el desayuno y cerveza.

Alternativamente, la invención se refiere a productos lácteos (es decir, yogur, helado, leche fermentada, queso, mozzarella, mantequilla, crema, ricota) a los que se puede añadir el gluten desintoxicado obtenido de acuerdo con la etapa 1) del procedimiento de la invención.

En particular, el gluten desintoxicado obtenido de acuerdo con la etapa 1) del procedimiento de la invención puede usarse ventajosamente como un agente espesante para la preparación de productos alimenticios, no solo lácteos, sino también en otras categorías de productos tales como fiambres, helado, alimentos para bebés, salsas y zumos. Por lo tanto, dichos productos alimenticios también están incluidos en el alcance de protección de la presente invención en la medida en que están destinados a aquellas poblaciones de individuos con una dieta libre de gluten o baja en lactosa.

En resumen, una primera ventaja es que a partir de la sémola y de las harinas producidas de acuerdo con el procedimiento de la invención, será posible producir alimentos para pacientes celíacos con antigenicidad de los epítomos tóxicos del gluten reducidos entre 0 y 20 ppm, con características organolépticas que son equivalentes en

sabor y apariencia a los comúnmente utilizados en la dieta mediterránea, pero también terapéuticos con respecto a la microflora intestinal del paciente celíaco, restaurando su equilibrio, protegiendo y fortaleciendo la microflora útil.

Por lo tanto, la presente invención se refiere además a los granos, harina, sémola o gluten desintoxicados o un producto alimenticio basado en uno de ellos o complementado con uno de ellos para su uso en el campo médico para la prevención o el tratamiento de la disbiosis intestinal.

Una segunda ventaja es que a partir de los granos, de la sémola, de las harinas o del gluten así producido, será posible producir alimentos para la terapia dietética de todas aquellas patologías en las que la alteración de la microbiota intestinal aumenta el riesgo de desarrollar una susceptibilidad a enfermedades intestinales crónicas de naturaleza inflamatoria y/o autoinmune, seleccionadas, a modo de ejemplo no exhaustivo, del grupo que consiste en enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y el síndrome del intestino, así como enfermedades metabólicas sistémicas como la obesidad, diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, estas harinas y sémolas desintoxicadas, o gluten desintoxicado o productos alimenticios obtenidos a través de su uso, pueden usarse ventajosamente como agentes protectores con respecto a microorganismos probióticos tales como los que pertenecen al género *Lactobacilli*, por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* (en particular si se añade a productos lácteos para pacientes con intolerancia a la lactosa) y/o con agentes antimicrobianos con respecto a bacterias Gramnegativas y/o Grampositivas. Preferentemente, dichas bacterias Gramnegativas pertenecen al género *Salmonella*, aún más preferentemente a la especie *Salmonella typhimurium* y dichas bacterias Grampositivas pertenecen al género *Staphylococcus*, aún más preferentemente a la especie *Staphylococcus aureus*.

La presente invención se describirá ahora a modo de ilustración no limitativa, sobre la base de los resultados indicados en los siguientes ejemplos y en las figuras adjuntas, en las que:

- La figura 1 muestra un diagrama ilustrativo de la patogénesis de la enfermedad celíaca (MC).
- La Figura 2 muestra las secciones de trigo (1 μ M) relacionadas con las etapas del procedimiento de tratamiento después de marcar con el anticuerpo 06010 que reconoce las fracciones de proteínas de las gliadinas y las gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS, de sus siglas en inglés). Panel A: Etapa b; panel B: Etapa c; Panel C: Etapa d; panel D: Etapa e; panel E: etapa f; panel F: etapa f del procedimiento de acuerdo con la invención.
- La Figura 3 representa la estructura de la proteína antes y después del tratamiento térmico de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.
- La Figura 4 muestra el control de las secciones de trigo (1 μ m) y después del tratamiento del procedimiento de la presente invención. (1) Sección de trigo de control, con una matriz proteica no homogénea (Pb 1); (2) Sección de trigo después del tratamiento, con una matriz proteica homogénea y confluyente (Pb 2). La prueba de Friedman no paramétrica aplicada a 6 semillas diferentes (4 secciones para cada semilla) detectó diferencias altamente significativas entre los dos tipos de cuerpos proteicos (Pb1 y Pb2) en las semillas de las muestras de control y después del tratamiento.
- La Figura 5 muestra la extracción de las fracciones de proteínas y la separación a través de SDS-PAGE en condiciones reductoras. Carril 1, gliadinas extraídas de harina procedente de semillas de control, que no han sido sometidas al tratamiento térmico de la presente invención; carril 2, gliadinas extraídas de harinas procedentes de semillas tratadas con el procedimiento de la presente invención; carril 3, HMW-GS y gliadinas extraídas de harina procedente de semillas de control que no han sido sometidas al tratamiento térmico de la presente invención; carril 4, HMW-GS gliadinas extraídas de harinas procedentes de semillas tratadas con el procedimiento de la presente invención; carril 5, gluteninas extraídas de harina procedente de semillas de control que no han sido sometidas al tratamiento térmico de la presente invención; carril 6, gluteninas extraídas de harinas procedentes de semillas tratadas con el procedimiento de la presente invención; carril 7, proteínas totales extraídas de harina procedente de semillas de control que no han sido sometidas al tratamiento térmico de la presente invención; carril 8, proteínas totales extraídas de harinas procedentes de semillas tratadas con el procedimiento de la presente invención.
- La Figura 6 muestra una hipótesis de agregación entre las proteínas presentes en el mismo cuerpo proteico y con diferente carga.
- La Figura 7 muestra los histogramas resumidos del ensayo ELISA con el anticuerpo monoclonal R5 Ridascreen Gliadin realizado en muestras de harina de control y después del tratamiento de acuerdo con el procedimiento de la solicitud de patente internacional WO2014/053891 en comparación con el procedimiento de la presente invención.
- La Figura 8 muestra las secciones de trigo de control (Control) y después del tratamiento (Tratado) del procedimiento descrito en la presente invención, cortado transversalmente y examinado a través de SEM-Immunogold, inmunomarcando con anticuerpo 0610 y γ -gliadina. 1. Control marcado con el anticuerpo 0610; 2. Control después de marcar con anticuerpo anti- γ -gliadina; 3. Tratado marcado con el anticuerpo 0610; 4. Tratado marcado con anticuerpo anti- γ -gliadina. La flecha en la figura representa las partículas de plata (AgNp) detectadas a través del análisis EDE (espectroscopía de dispersión de energía).
- Figura 9 muestra las secciones de control de trigo (1 μ m) (Control) y después del tratamiento (Tratado) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, marcado con el anticuerpo 0610, HMW-G y γ -gliadina. 1. Control marcado con el anticuerpo 0610; 2. Control después de marcar con anticuerpo- γ -gliadina; 3. Control

marcado con anticuerpo HMW-GS; 4. Tratado marcado con el anticuerpo 0610; 5. Tratado después de marcar con el anticuerpo γ -gliadina; 6. Tratado después de marcar con el anticuerpo HMW-GS.

- Figura 10 muestra el análisis colorimétrico realizado con el anticuerpo monoclonal R5-HRP conjugado, en secciones de control y después del tratamiento de semillas. 1. Subaleurona de la semilla de control; 2. Subaleurona de la semilla después del tratamiento de acuerdo con el procedimiento de la presente invención; 3. Pliegue de la semilla de control; 4. Pliegue de la semilla después del tratamiento de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Las barras en la figura corresponden a 100 μ m.
- Figura 11 muestra el análisis cinético de la muerte de *Lactobacillus acidophilus* en solución salina después de la adición tanto del pan de control como del pan modificado (0,8 g/l). Las líneas representan el mejor ajuste a través de la distribución Weibull.
- La Figura 12 muestra el recuento vital de *Staphylococcus aureus* en solución salina con la adición del pan de control o del pan tratado (0,2, 0,4 o 0,8 g/l). Los valores medios $\pm$ desviación estándar. Los símbolos "*" y "**" identifican las diferencias significativas (ANOVA unidireccional y prueba de Tukey).
- Figura 13 muestra el recuento vital de *Salmonella* sp. en solución salina con 0,8 g/l de pan de control o pan modificado añadido. Los valores medios $\pm$ desviación estándar.
- Figura 14 muestra el análisis de los componentes principales relacionados con los resultados de SCFA y FISH después de 6 horas de fermentación. Panel A) Proyección de las variables; panel B) Proyección de los casos. Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, control negativo de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado. Variables: 1, Bif164; 2, Erec482; 3, Bac; 5, lab158; AC: ácido acético; BUT: ácido butírico; PROP: propiónico.
- Figura 15 muestra el análisis de los componentes principales relacionados con los resultados de SCFA y FISH después de 24 horas de fermentación. Panel A) Proyección de las variables; panel B) Proyección de los casos. Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, control negativo de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado. Variables: 1, Bif164; 2, Erec482; 3, Bac; 5, lab158; AC: ácido acético; BUT: ácido butírico; PROP: propiónico.
- Figura 16 muestra el análisis de los componentes principales relacionados con los resultados de SCFA y FISH después de 48 horas de fermentación. Panel A) Proyección de las variables; panel B) Proyección de los casos. Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, control negativo de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado. Variables: 1, Bif164; 2, Erec482; 3, Bac; 5, lab158; AC: ácido acético; BUT: ácido butírico; PROP: propiónico.
- La Figura 17 muestra los grupos de bacterias recuperados del caldo de cultivo de tres recipientes diferentes (V1, V2 y V3) del sistema modelo que simula las partes del colon antes (SS1) y después (SS2) de la adición de (A) pan de control y (B) pan modificado en voluntarios sanos. Los resultados se informan como media de datos de dos sistemas modelo $\pm$ EEM (n = 2).
- La Figura 18 muestra los grupos de bacterias recuperados del caldo de cultivo de tres recipientes diferentes (V1, V2 y V3) del sistema modelo que simula las partes del colon antes (SS1) y después (SS2) de la adición de pan modificado en (A) pacientes sanos y (B) celíacos. Los resultados se informan como media de datos de dos sistemas modelo $\pm$ EEM (n = 2).
- La Figura 19 muestra los ácidos grasos de cadena corta SCFA recuperados del caldo de cultivo de tres recipientes diferentes (V1, V2 y V3) del sistema modelo que simula las partes del colon antes (SS1) y después (SS2) de la adición de (A) pan de control y (B) pan modificado en voluntarios sanos. Los resultados se informan como media de datos de dos sistemas modelo $\pm$ EEM (n = 2).
- La Figura 20 muestra los ácidos grasos de cadena corta SCFA recuperados del caldo de cultivo de tres recipientes diferentes (V1, V2 y V3) del sistema modelo que simula las partes del colon antes (SS1) y después (SS2) de la adición de pan modificado en (A) pacientes sanos y (B) celíacos. Los resultados se informan como media de datos de dos sistemas modelo $\pm$ EEM (n = 2).
- La Figura 21, panel a) muestra secciones de trigo blando (1 μ m) en relación con las etapas del tratamiento después de la conjugación con el anticuerpo 0610, que reconoce las fracciones de proteínas de las gliadinas y LMW-GS. (A) Etapa b; (B) Etapa c; (C) Etapa d; (D) Etapa e; (E) Etapa f; (F) Etapa g; el panel b) muestra el análisis de umbral de imagen de las etapas anteriores mediante el uso del programa informático Image J; el panel c) muestra el análisis SDS-PAGE de las fracciones de proteínas de gliadinas y la harina de control de peso (HPC) relacionada extraída en EtOH al 70 %. (A) gliadina de la etapa b; (B) gliadina de la etapa c; (C) gliadina de la etapa d; (D) gliadina de la etapa e; (E) gliadina de la etapa f; (F) gliadina de la etapa g; el panel d) muestra una tabla de resumen del % de disminución en relación con los valores de VGM (valor gris medio) obtenido del análisis de las etapas de imagen de microscopía y la densidad óptica (DO) en relación con las fracciones de proteína gliadina expresadas en SDS-PAGE.

Ejemplos

Ejemplo 1: Reducción de la antigenicidad de las proteínas del gluten después del tratamiento con el procedimiento de acuerdo con la invención

Después de someter los granos de trigo al procedimiento de eliminación de toxinas de acuerdo con la invención, la

reducción de la antigenicidad de los epítomos tóxicos de la proteína del gluten en las harinas se probó utilizando el procedimiento oficial (ensayo ELISA con anticuerpo R5) adoptado por los laboratorios Ear prescritos para el reconocimiento del gluten en harinas y productos destinados a pacientes celíacos.

- 5 En particular, las proteínas del gluten desnaturalizadas previamente con el cóctel Mendez se extrajeron de las harinas por medio de una solución de alcohol y se probaron de acuerdo con el procedimiento ELISA sandwich R5 (véase Figura 7) usando el anticuerpo monoclonal R5 que reconoce la secuencia de péptidos tóxicos QQPFP, que se encuentra repetida en las proteínas del gluten. La Figura 7, (panel A) muestra los histogramas de resumen del ensayo ELISA con R5 Ridascreen Gliadin, de las muestras tratadas con el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional WO2014/053891 en comparación con el procedimiento de la presente invención (panel B). A propósito, las muestras de harina procedentes de los granos tratados con el procedimiento descrito en la solicitud de patente internacional WO2014/053891 exhibieron una reducción en la antigenicidad del epítomo tóxico QQPFP en el intervalo entre 60 y 40 ppm (panel A, Figura 7; Lamacchia C. et al. 2016). En cambio, las harinas procedentes de los granos tratados con el procedimiento de la presente invención muestran una reducción significativa en la antigenicidad del epítomo tóxico de $13,83 \pm 7,22$ ppm, permitiendo que estas harinas sean consideradas, para todos los propósitos de la ley, harinas "sin gluten", aunque el gluten todavía está presente dentro de ellas.

La mejora de la eliminación de toxinas de la proteína del gluten de los granos de cereales de acuerdo con la presente invención consiste en la reducción de la antigenicidad de los epítomos tóxicos del gluten a un intervalo entre 0 y 20 ppm, haciéndolos mucho más seguros para los pacientes celíacos. Esta reducción no se logró a través del procedimiento de la solicitud de patente internacional WO2014/053891 porque en este procedimiento la etapa de microondas durante 120 segundos, seguida de un enfriamiento lento a temperatura ambiente, no asegura la modificación completa de las proteínas a la forma plástica, que, en cambio, se alcanza completamente gracias a las etapas del procedimiento descrito en la presente invención.

Los cambios inducidos por el procedimiento de acuerdo con la presente invención permiten la reducción de la antigenicidad de las proteínas del gluten para que ya no sean reconocibles incluso por sus propios anticuerpos. Para demostrar esto, tres muestras de semillas de control (CWS) y semillas tratadas (TWS) se cortaron transversalmente y se examinaron a través de inmunogold (Figura 8), inmunofluorescencia (Figura 9) y microscopía colorimétrica (Figura 10) usando tres anticuerpos monoclonales específicos para la fracción de gliadina:

- IFRN 0610, anticuerpo monoclonal que reconoce un epítomo (QQSF) común a muchas gliadinas;
- LMW-GS, anticuerpos monoclonales murinos, que reconocen un dominio repetitivo presente en la fracción de y gliadina (PEQPFPQGC);
- R5, los anticuerpos monoclonales R5 reconocen la secuencia altamente tóxica QQPFP, que está presente repetida en proteínas del gluten.

La Figura 8 muestra las secciones de trigo de control (Control) y después del tratamiento (Tratado) del procedimiento de acuerdo con la presente invención, cortado transversalmente y examinado a través de SEM-Immunogold, inmunomarcando con anticuerpo 0610 y γ -gliadina. Los valores obtenidos en 5 secciones procedentes de 5 semillas diferentes de control y tratadas se compararon con la prueba T de Student. Se encontró que las diferencias observadas con los dos tipos de anticuerpos eran altamente significativas ($p < 0,001$). Con el anticuerpo 0610, se obtuvo una disminución del 89 % en las semillas tratadas en comparación con las semillas de control y se obtuvo una disminución del 87,5 % en comparación con el anticuerpo γ -gliadina.

La Figura 9 muestra las secciones de control de trigo (1 μ m) (Control) y después del tratamiento (Tratado) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, marcado con el anticuerpo 0610, HMW-G y γ -gliadina. Se analizaron tres muestras diferentes (3 secciones para cada semilla) procedentes de muestras de semillas de control y después del tratamiento utilizando el programa informático Image J. Para cada imagen, convertida a escala de grises, se obtuvieron los respectivos VMG (valores medios de gris). Con el anticuerpo 0610, se observó una disminución del 91,7 % en las semillas tratadas en comparación con las semillas de control y se observó una disminución del 90,6 % en comparación con el anticuerpo γ -gliadina. A continuación, se realizó la prueba de Anova bidireccional, con hipótesis de descomposición para dos variables (tipo de muestra y tipo de tratamiento). Entre los parámetros analizados, el tipo de tratamiento experimentado por la semilla fue el factor más importante. Se encontró que los datos obtenidos fueron altamente significativos ($p < 0,001$).

La Figura 10 muestra el análisis colorimétrico realizado con el anticuerpo monoclonal R5-HRP conjugado, en secciones de control y después del tratamiento de semillas. Se analizaron tres muestras diferentes (3 secciones para cada semilla) procedentes de muestras de semillas de control y después del tratamiento utilizando el programa informático Image J. Para cada imagen, convertida a escala de grises, en formato binario, se obtuvieron los respectivos VMG (valores medios de gris). Se observó una disminución del 89,2 % en la semilla después del tratamiento en comparación con la semilla de control, a nivel de la región subaleurónica, y se observó una disminución del 82 % a nivel del pliegue. A continuación, se realizó la prueba de Anova bidireccional, con hipótesis de descomposición para dos variables (tipo de muestra y tipo de tratamiento). Entre los parámetros analizados, el tipo de tratamiento experimentado por la semilla fue el factor más importante. Se encontró que los datos obtenidos fueron altamente significativos ($p < 0,001$).

Ejemplo 2: Estudio *in vitro* sobre el efecto protector del pan digerido preparado con las harinas tratadas de acuerdo con el procedimiento con respecto a *Lactobacillus acidophilus* y sobre el efecto antimicrobiano con respecto a *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*.

Se llevaron a cabo dos series diferentes de experimentos, como se muestra en la siguiente Tabla 1. En particular, las alícuotas de solución fisiológica (NaCl al 0,9 %) (50 ml) se complementaron con diferentes alícuotas de pan de control o pan cuya harina procede de la molienda de las semillas cuyo gluten se modificó con el procedimiento descrito anteriormente, digerido *in vitro* en condiciones apropiadas de acuerdo con los procedimientos descritos por Maccaferri S. et al. (2012) deshidratados e inoculados a 8 log de ufc/ml; luego, las muestras se analizaron para evaluar periódicamente el recuento vital mediante placas en agar MRS (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis*) o TSA (patógenos) y se incubaron a 37 °C durante 2-4 días. Las bacterias lácticas se analizaron en condiciones anaeróbicas.

Tabla 1

Cinética de la muerte	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>	Solución salina y muestras con la adición de 0,4 o 0,8 g/l de pan de control o pan preparado con harina de semillas tratadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención	7 días (recuento de microorganismos cada 6-10 horas)
Efecto de la concentración	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>	Solución salina y muestras con la adición de 0,8 o 5 g/l de pan de control o pan preparado con harina de semillas tratadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención	24 horas
Patógenos	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Solución salina y muestras con la adición de 0,2, 0,4 o 0,8 g/l de pan de control o pan preparado con harina de semillas tratadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención	7 días (recuento de microorganismos después de 1 y 7 días)

La Tabla 2 muestra los parámetros de aptitud para la distribución de Weibull para la cinética de la muerte de *Lactobacillus acidophilus* (media $\pm$ valores estándar). Para cada parámetro, las letras indican las diferencias significativas (ANOVA y la prueba de Tukey, $P < 0,05$). La cinética de la muerte mostró una curva descendente con un parámetro de forma > 1 .

Tabla 2

Muestras	log N ₀ *	Δ	p	d.e.	R
Control 0,4 g/l	8,43 $\pm$ 0,14A	17,99 $\pm$ 0,90A	1,62 $\pm$ 0,15A	67,46 $\pm$ 2,06A	0,995
Detox 0,4 g/l	8,38 $\pm$ 0,13A	17,43 $\pm$ 2,06A	1,40 $\pm$ 0,14A	80,53 $\pm$ 2,03B	0,994
Control 0,8 g/l	8,19 $\pm$ 0,12A	23,40 $\pm$ 2,00B	1,94 $\pm$ 0,20A	70,28 $\pm$ 2,63A	0,993
Detox 0,8 g/l	8,56 $\pm$ 0,14A	17,57 $\pm$ 2,70A	1,27 $\pm$ 0,17A	93,96 $\pm$ 4,00C	0,990

La adición de la solución salina tanto en el pan de control como en el pan modificado no tuvo impacto en la forma de la curva. Por otro lado, el tipo de pan tuvo un efecto significativo sobre la cinética de la muerte de la población bacteriana, que se prolongó de 67,46 a 80,53 a 0,4 g/l y de 70,28 a 93,96 a 0,8 g/l cuando se utilizó el pan preparado con harina cuyas semillas se trataron con el procedimiento descrito anteriormente.

El efecto del pan preparado con harina cuyas semillas se trataron con el procedimiento descrito anteriormente, sobre la cinética de la muerte, pero no sobre el parámetro de forma, es una consecuencia de una probable reducción de la mortalidad en la última parte de la curva de la muerte, como se sugiere por la cinética de la muerte de *Lactobacillus acidophilus* en solución salina después de la adición tanto del pan de control como del pan tratado (0,8 g/l) que se muestra en la Figura 11. Las líneas representan el mejor ajuste a través de la ecuación de Weibull. Se realizó una segunda prueba para determinar si la concentración de pan modificado podría causar o ejercer un efecto nocivo tanto en *Lactobacillus acidophilus* como en *Bifidobacterium animalis*; se añadió la solución salina con la cantidad utilizada para el primer experimento (0,8 g/l) y con una concentración más alta (5,0 g/l) para simular un aumento local del pan debido a un tránsito lento en el intestino. El conteo vital no fue influenciado por la concentración del pan digerido y la cinética de la muerte mostró una tendencia similar a la que se muestra en la Figura 11.

Finalmente, la solución salina se inoculó con un patógeno Grampositivo o Gramnegativo (*Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*); los resultados de *Staphylococcus aureus* se muestran en la Figura 12, que muestra los recuentos vitales en solución salina con la adición del pan de control o del pan tratado (0,2, 0,4 o 0,8 g/l). Los valores medios $\pm$ desviación estándar. Los símbolos "*" y "*" identifican las diferencias significativas (ANOVA unidireccional y prueba de Tukey).

Se observó una diferencia significativa para la muestra con la adición de 0,8 g/l de pan preparado con harina cuyas semillas se trataron de acuerdo con el procedimiento descrito, que mostró una tasa de recuento vital inferior por 1-log en comparación con la muestra a la que se añadió pan de control. En presencia de *Salmonella sp.* se observó

una reducción de 3-log en la misma muestra después de 7 días, mientras que el pan de control determinó una reducción de 1-log (Figura 13).

Ejemplo 3: Estudio sobre el efecto terapéutico en la restauración del equilibrio de la flora intestinal del paciente celíaco en sistemas modelo que simulan la parte distal del colon.

Se realizó una evaluación tanto del pan de control como del pan preparado con harina cuyas semillas se trataron de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, en los cultivos de fermentación discontinua (sistemas modelo con pH controlado que simulan la parte distal del colon que permite estudiar el efecto de compuestos individuales o de fibras).

Las muestras fecales se obtuvieron de tres voluntarios humanos sanos (dos hombres, una mujer, con edades entre 30 y 38 años; IMC: 18,5-25) exentos de enfermedades metabólicas y gastrointestinales conocidas (por ejemplo, diabetes, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, úlcera péptica y cáncer). Todos los donantes sanos recibieron un cuestionario estándar para recopilar información sobre el estado de salud, el consumo de fármacos, la anamnesis clínica y el estilo de vida antes de que se le pidiera al donante que proporcionara una muestra fecal. Para donantes celíacos (dos mujeres, un hombre, de edades comprendidas entre 30 y 38; IMC: 18,5-25), se obtuvo un consentimiento informado por escrito en cada caso y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Reading, Reino Unido (UREC 15/20: centro de recolección de muestras fecales donadas para los sistemas modelo *in vitro* del colon humano). Todas las muestras fecales recolectadas de donantes sanos y celíacos se recolectaron en el sitio, se conservaron en una vitrina anaeróbica (H_2 al 10 %- CO_2 al 10 %- N_2 al 80 %) y se usaron a más tarde de 15 minutos después de la recolección. Las muestras se diluyeron 1:10 (p/v) en una solución anaeróbica de PBS (solución 0,1 M de tampón fosfato, pH 7,4) y se homogeneizaron durante 2 minutos. Los recipientes para la fermentación de cultivos en cultivo discontinuo (280 ml) previamente esterilizados se llenaron con 45 ml de un medio de crecimiento complejo modelo del colon (Tejero-Sarinena S., et al., 2012). A continuación, los recipientes se conectaron a un baño de agua en circulación a 37 °C y se inyectó el gas N_2 que carecía de O_2 para hacerlos anaeróbicos antes de la inoculación. El pH se tamponó a 6,7 y 6,9 usando un medidor de pH con soluciones de NaOH o HCl (Electrolab260; Electrolab Ltd, Tewkesbury, Reino Unido). Luego, se añadieron al medio de cultivo 5 ml de homogeneizado fecal, preparado como se describe anteriormente, y 1 ml de pan digerido.

Para cada donante, se prepararon 3 recipientes diferentes:

- control negativo (en el que no se añadió el pan digerido) llamado A para los sujetos sanos y D para los celíacos;
- recipiente con la adición de pan de control llamado B para los sujetos sanos y E para los celíacos;
- recipiente con la adición de pan preparado con harina cuyas semillas se trataron con el procedimiento descrito anteriormente llamado C para los sujetos sanos y F para los celíacos.

Los cultivos discontinuos se analizaron durante 48 horas, extrayendo en el momento de la inoculación y después de 6, 24 y 48 horas las muestras necesarias para la evaluación de la microbiota mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, de sus siglas en inglés). Las Figuras 14, 15 y 16 muestran los resultados de los análisis de los componentes principales relacionados con los resultados de SCFA y FISH después de 6, 24 y 48 horas de fermentación.

Los resultados obtenidos de los experimentos FISH y SCFA se estandarizaron como aumento/disminución referido a t_0 (inoculación) del control negativo, para excluir la variabilidad debida al tipo de donante; por lo tanto, los resultados muestran la modificación del sistema con respecto al inicio del experimento y deben leerse como el aumento (valor positivo) o la disminución (valores negativos) de la población microbiana o de los productos del metabolismo microbiano. El aumento/disminución se refiere a la inoculación del control negativo (registro de células/ml).

Además, cada parámetro se analizó mediante la prueba ANOVA para identificar las diferencias significativas; el uso del enfoque para grupos homogéneos se aplicó como un instrumento adicional para establecer una posible tendencia en el tiempo. La Tabla 3 a continuación muestra los resultados de la prueba ANOVA unidireccional para grupos homogéneos en los datos de FISH de bifidobacterias después de 6, 24 y 48 h de fermentación.

Tabla 3

		Grupos homogéneos		
6 horas		I	II	III
Muestra	FISH			
E	0,147100	****		
F	0,264242	****		
D	0,489640	****		
B	0,604836	****		
A	0,632162	****		

(continuación)

		Grupos homogéneos		
C	0,700706	****		
24 horas				
E	0,371967	****		
F	0,490137	****		
D	0,507300	****		
A	0,716912	****		
B	0,734684	****		
C	0,909206	****		
48 horas				
E	0,273558			****
A	0,654479	****		
F	0,681301	****	****	
D	0,707120	****	****	
B	0,715355	****	****	
C	0,925907		****	
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado				

Las diferencias entre las muestras no fueron significativas después de 6 horas o después de 24 horas. En cambio, después de 48 horas se observaron dos grupos estadísticos: el primer grupo consistió solo en la muestra E (donante celíaco con pan de control) y el segundo grupo consistió en todas las demás muestras.

La muestra E no exhibió ningún aumento significativo en la población de bifidobacterias (aumento de 0,27 log de células/ml), probablemente debido a un efecto negativo ejercido por el pan en la microflora, mientras que ocurrió un aumento de 0,7 a 0,9 log de células/ml en las otras muestras. Los datos interesantes residían, de hecho, en la inclusión de la muestra F con las muestras del sujeto sano, lo que sugiere un efecto beneficioso del pan preparado con harina cuyas semillas habían sido tratadas con el procedimiento descrito anteriormente, capaz de restaurar una tendencia normal en la población de bifidobacterias.

Las tablas 4 y 5 muestran los resultados de las pruebas ANOVA unidireccionales para grupos homogéneos en los datos de FISH relacionados con los grupos bacterianos Erec482 (Franks AH et al., 1998), Bac303 (Manz W. et al., 1996) después de 6, 24 y 48 horas de fermentación (log de células/ml). Los grupos bacterianos se identificaron usando sondas de oligonucleótidos sintéticos destinados a regiones específicas de ARN 16S (Langendijk PS et al., 1995) marcadas con el colorante fluorescente Cy3 como se informa en probeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase>).

Tabla 4

	Grupos homogéneos			
6 horas		I	II	III
Muestra	FISH			
B	0,001945	****		
A	0,087913	****		
C	0,130655	****		
E	0,159812	****		
D	0,370365	****		
F	0,382277	****		
24 horas				
F	-0,065175		****	
A	0,077214	****	****	
E	0,169113	****	****	
C	0,286015	****	****	
D	0,443906	****		
B	0,481756	****		
48 horas				
D	-0,017101	****		
c	0,051435	****	****	

(continuación)

	Grupos homogéneos			
F	0,064366	****	****	
A	0,150569	****	****	****
E	0,223303		****	****
B	0,267762			****
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.				

Tabla 5

	Grupos homogéneos				
6 horas		I	II	III	IV
Muestra	FISH				
A	-0,094164	****			
D	-0,043412	****			
E	0,080924	****			
B	0,106672	****			
C	0,133569	****			
F	0,176720	****			
24 horas					
D	-0,189282	****			
E	-0,172388	****			
F	0,028873	****	****		
A	0,414786		****	****	
B	0,433302		****	****	
C	0,636738			****	
48 horas					
B	-0,330564	****			
F	-0,313381	****	****		
E	-0,307379	****	****		
D	-0,193349		****	****	
C	-0,110862			****	****
A	-0,034976				****
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.					

- 5 El análisis estadístico destacó una distribución continua de las muestras, con 2-4 grupos homogéneos superpuestos, según el tiempo y el tipo de microorganismos. La distribución estadística de las muestras cambió con el tiempo; sin embargo, el aumento/disminución en el recuento vital (-0-33-0,26 log de células/ml) fueron de tamaño moderado en valores absolutos. Los efectos de la adición de pan sobre los grupos bacterianos Chis150 (Franks A.H. et al., 1998) se muestran en la Tabla 6 a continuación.

10

Tabla 6

	Grupos homogéneos			
6 horas		I	II	III
Muestra	FISH			
B	-0,266858	****		
A	-0,180315	****		
C	-0,103523	****	****	
D	0,153936		****	****
F	0,171644		****	****
E	0,316956			****
24 horas				
C	-0,162934	****		
F	-0,120933	****		

(continuación)

	Grupos homogéneos			
A	-0,083551	****		
B	-0,030945	****		
E	0,072539	****		
D	0,096110	****		
48 horas				
A	-0,305986	****		
C	-0,234457	****		
B	0,060428	****		
D	0,166901	****		
F	0,190838	****		
E	0,216414	****		
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.				

- Después de 6 horas, se observó una distribución continua de las muestras con 2 grupos bien definidos (1^{er} grupo con las muestras A y B; 2^o grupo que contiene la muestra E) y una clase intermedia (muestras C, D, F). Finalmente, la muestra E (donante celíaco con pan de control) no fue estadísticamente diferente de las muestras D y F (control negativo y donante celíaco con pan "modificado") también estadísticamente diferente de las muestras de donantes sanos. Sin embargo, en las muestras F y D se observó un cambio estadístico hacia la muestra C. Este cambio no se observó después de 24 y 48 horas. Las bacterias lácticas exhibieron una tendencia característica a lo largo del tiempo, como se muestra en la Tabla 7 a continuación, que ilustra los resultados de la prueba ANOVA unidireccional para grupos homogéneos en los datos de FISH del Laboratorio 158 después de 6, 24 y 48 horas de fermentación (log de células/ml).

Tabla 7

	Grupos homogéneos			
6 horas		I	II	III
Muestra	FISH			
F	-0,639714		****	
E	-0,565338		****	
D	-0,327822	****	****	
C	-0,122414	****		
A	0,001010	****		
B	0,038547	****		
24 horas				
E	-0,591904		****	
F	0,014006	****		
D	0,015039	****		
A	0,165791	****		
C	0,267343	****		
B	0,288811	****		
48 horas				
E	-0,526397			****
D	-0,289074	****		****
F	-0,022714	****	****	****
A	0,135032	****	****	
B	0,188054	****	****	
C	0,304061		****	
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.				

- Después de 6 horas de fermentación, se observó una disminución en la población láctica en las muestras E y F (0,57-0,64 log de células/ml). Después de 24 horas, esta tendencia negativa se observó en la muestra E, pero no en la muestra F, en la que la población láctica aumentó y mostró una tendencia similar a la de los sujetos sanos, lo que

sugiere un efecto interesante y beneficioso del pan preparado con harina cuyas proteínas del gluten se modificaron.

Después de 48 horas, su distribución fue continua; la muestra F, en particular, se posicionó en un grupo intermedio entre los sujetos sanos y la muestra E.

5 Los resultados estadísticos para los grupos bacterianos Eu (Eub338 I, Eub338 II, Eub338 III (usados juntos) (Daims H. et al., 1999), mostraron una distribución constante, sin diferencias significativas entre las diferentes muestras.

10 La Tabla 8 a continuación muestra los resultados de la prueba ANOVA unidireccional para grupos homogéneos en los datos de FISH de Eu después de 6, 24 y 48 horas de fermentación (log de células/ml).

Tabla 8

	Grupos homogéneos		
6 horas		I	II
Muestra	FISH		
B	-0,132923	****	
A	-0,061032	****	
C	0,056311	****	
F	0,238798	****	
D	0,336604	****	
E	0,435467	****	
24 horas			
A	0,274960		****
B	0,488056	****	****
C	0,496600	****	****
F	0,599021	****	****
D	0,720836	****	
E	0,825880	****	
48 horas			
C	-0,197966		****
B	-0,005315	****	****
A	0,102244	****	****
D	0,265949	****	****
F	0,345989	****	
E	0,434101	****	
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.			

15 Se utilizó el mismo enfoque para analizar los resultados de los SCFA (ácidos grasos de cadena corta). Los SCFA generalmente mostraron una distribución discreta de los resultados con grupos estadísticos bien definidos y diferencias significativas. Los resultados se ilustran en las tablas 9, 10 y 11 a continuación.

La Tabla 9 muestra la prueba ANOVA unidireccional para grupos homogéneos de ácido butírico después de 24 y 48 horas; se indica el aumento medio en comparación con el control negativo (mM).

20

Tabla 9

		Grupos homogéneos					
24 horas		I	II	III	IV	V	VI
Muestra	SCFA						
C	43,3736		****				
A	45,3854			****			
D	52,3644	****					
F	52,3767	****					
E	62,2977				****		
B	174,0981					****	
48 horas							
A	43,8577	****					
F	52,9641		****				
E	57,6583			****			

(continuación)

		Grupos homogéneos					
D	61,8410				****		
C	62,4645					****	
B	258,4700						****
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.							

La Tabla 10 muestra la prueba ANOVA unidireccional para grupos homogéneos de ácido propiónico después de 24 y 48 horas; se indica el aumento medio en comparación con el control negativo (mM).

5 Con respecto al ácido propiónico, el aumento fue pequeño en las muestras de donantes sanos (tanto después de 24 horas como de 48 horas), mientras que su concentración aumentó en 23-37 mM en las muestras de los donantes celíacos.

10 Tabla 10

		Grupos homogéneos					
24 horas		I	II	III	IV	V	VI
Muestra	SCFA						
B	-4,30662	****					
A	-0,75728		****				
C	0,96521			****			
D	23,15887				****		
E	31,18544					****	
F	32,70900						****
48 horas							
A	0,39286	****					
B	1,71661		****				
C	4,68863			****			
D	22,58833				****		
F	37,13872					****	
E	37,45659						****
Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.							

La Tabla 11 muestra la prueba ANOVA unidireccional para grupos homogéneos de ácido butírico después de 24 y 48 horas; se indica el aumento medio en comparación con el control negativo (mM).

15 Tabla 11

		Grupos homogéneos					
24 horas		I	II	III	IV	V	VI
Muestra	SCFA						
C	-3,63255	****					
B	-0,38556		****				
A	2,43478			****			
F	4,07283				****		
E	7,59356					****	
D	17,42258						****
48 horas							
A	2,24822	****					
B	4,01809		****				
F	4,27836			****			
C	6,58688				****		
E	10,66568					****	
D	15,03661						****

Muestras: A, control negativo de donantes sanos; B, donantes sanos + pan de control; C, donantes sanos + pan modificado; D, controles negativos de donantes celíacos; E, donantes celíacos + pan de control; F, donantes celíacos + pan modificado.

Después de 24 horas, el ácido butírico aumentó en 17 mM en el control negativo D, que registró el mayor aumento, seguido por las otras dos muestras de donantes celíacos (respectivamente E, 7,6 mM y F, 4,1 mM); los resultados después de 48 horas mostraron una tendencia interesante, ya que la muestra F mostró un perfil similar a las muestras de los donantes sanos, con un aumento neto de 4,28 mM en ácido butírico. Las Figuras 15, 16 y 17 muestran el estudio de las diferencias globales relacionadas con los cultivos discontinuos procedentes de donantes sanos y celíacos a través de un análisis de los componentes principales; los resultados de los SCFA y del FISH se utilizaron como entradas; para cada tiempo de análisis, se realizó un análisis diferente.

Después de 6 horas, se pudieron identificar dos grupos estadísticos en el espacio multifactorial: el primero consistió en las muestras de los sujetos sanos (A, B y C) y el segundo de las muestras E y F.

El control negativo de los donantes celíacos (muestra D) se situó en una región diferente del espacio (Figura 14).

Después de 24 horas, la distribución del espacio cambió drásticamente (Figura 15); el grupo procedente de donantes sanos se dividió en dos subgrupos, porque la muestra B se desplazó a una región diferente del espacio, pero el resultado interesante implicó a la muestra F que se desplazó de la región factorial ocupada por las muestras de los sujetos celíacos y se movió hacia la región de las muestras de los sujetos sanos A y C. Se observó un efecto similar después de 48 horas (Figura 16).

Ejemplo 4: Estudio sobre el efecto terapéutico en la mejora de la composición y el metabolismo de la flora intestinal en pacientes sanos y celíacos en sistemas modelo que simulan la parte proximal, transversal y distal del colon.

El efecto del pan de control y modificado cuyos granos han sido tratados de acuerdo con el procedimiento de eliminación de toxinas de epítomos del gluten de la invención se ha evaluado, en un cultivo de fermentación continua de tres etapas que simula la parte proximal, transversal y distal del colon humano (recipientes 1, 2 y 3, respectivamente).

Se obtuvieron muestras fecales de dos voluntarios sanos y dos celíacos voluntarios (hombres y mujeres de edades comprendidas entre 30 y 50 años; IMC: 18,5-25) sin enfermedades metabólicas o gastrointestinales conocidas (tales como diabetes, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome del colon irritable, úlcera péptica y cáncer) que no tomaron ningún complemento probiótico o prebiótico ni antibióticos 6 meses antes del injerto de la muestra fecal.

Se envió un cuestionario estándar a los donantes sanos para recopilar información sobre el estado saludable, el consumo de fármacos, el historial de casos y el estilo de vida antes de requerir la muestra fecal. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Roehampton (UREC 15/20).

Las muestras fecales se han almacenado en un recipiente anaeróbico (AnaeroJar™ 2,5 L, Oxoid Ltd) que incluye un kit de regeneración de gas (AnaeroGen™, Oxoid) para reproducir condiciones anaeróbicas dentro de la habitación. Se diluyó una alícuota de 20 g de cada muestra en 100 ml de solución anaeróbica de PBS (solución de fosfato 0,1 M, pH 7,4, p/p) y se homogeneizó durante 2 minutos (Stomacher 400, Seward, West Sussex, Reino Unido). Se han añadido muestras a los fermentadores anaeróbicos dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación. Las condiciones físico-químicas del colon se han repetido en un sistema continuo de tres etapas hecho por tres fermentadores de vidrio con volumen creciente y conectados en serie. Por primera vez en este estudio, se ha utilizado una versión a pequeña escala del sistema validado por Macfarlane et al. (1998), en donde la parte proximal del colon estaba representada por el recipiente 1 (V1, 80 ml), la parte transversal del colon por el recipiente 2 (V2, 100 ml) y la parte distal por el recipiente 3 (V3, 120 ml) inoculados con un 20 % (p/v) de homogeneizado fecal de voluntarios sanos y celíacos en un medio de crecimiento contenía los siguientes ingredientes: almidón, 5 g/l; mucina, 4 g/l; caseína, 3 g/l; agua de peptona, 5 g/l; agua de triptona, 5 g/l; sales biliares, 0,4 g/l; extracto de levadura, 4,5 g/l; FeSO₄, 0,005 g/l; NaCl, 4,5 g/l; KCl, 4,5 g/l; KH₂PO₄, 0,5 g/l; MgSO₄·7H₂O, 1,25 g/l; CaCl₂ · 6H₂O, 0,15 g/l; NaHCO₃, 1,5 g/l; Tween 80, 1 ml; hemina, 0,05 g/l; y cisteína HCl, 0,8 g/l.

Después del inóculo, la población bacteriana se ha estabilizado como cultivo discontinuo durante 24 horas. Después de 24 horas (T0), el sistema modelo funciona durante 8 rondas de volumen completas para permitir el logro del estado estacionario (SS1) (verificado a través de la estabilización de los perfiles de SCFA (+/- 5 %)).

Teniendo en cuenta el volumen de trabajo (300 ml) y el tiempo de retención (48 h, velocidad de flujo 6,25 ml/h) del sistema modelo, se han añadido diariamente en el recipiente V1 pan de control digerido *in vitro* o pan modificado (3,75 ml) en condiciones adecuadas de acuerdo con el procedimiento divulgado por Maccaferri S. et al. (2012). El pan se ha añadido al sistema durante 8 rondas de volumen completas adicionales hasta el logro del estado estable 2 (SS2).

Se extrajeron alícuotas de 4,5 ml y se analizaron en SS1 (día T₀) y SS2 (día T₃₀).

Los cambios en las composiciones bacterianas del sistema modelo que simulan las tres partes del colon se han evaluado mediante análisis FISH (Figuras 17 y 18), mientras que los cambios del metabolismo de la microflora se han evaluado mediante la determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (Figuras 19 y 20) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los resultados del efecto del pan de control en voluntarios sanos representados en la Figura 17 mostraron una disminución significativa en el número de *Lactobacillus/Enterococcus* spp. (detectado por la sonda Lab158) (recipientes V1 y V2), grupo *Bacteroides-Prevotella* (V2) (detectado por la sonda Bac303) y grupos de *Clostridium* XIVa+b (V1) (detectado por la sonda Erec482).

Se ha observado una tendencia a la disminución total de bacterias en todas las etapas del sistema modelo también si dichas diferencias no han resultado ser tan significativas. Entonces, el pan de control no tuvo un impacto positivo en la modulación y composición de la microflora fecal.

En cambio, la administración del pan tratado de acuerdo con el procedimiento de la invención, condujo a un aumento significativo de las bifidobacterias (detectadas por la sonda Bif164) tanto en voluntarios celíacos como sanos.

En particular, en sujetos celíacos se ha observado un aumento significativo de bifidobacterias de 8,42 a 8,90 Log de UFC/ml ($P < 0,05$) en la segunda etapa del sistema modelo (recipiente 2) y de 8,60 a 9,20 Log de UFC/ml ($P < 0,05$) en el recipiente 3, respectivamente.

En sujetos sanos, se observó un aumento significativo en el número de bifidobacterias de 7,90 a 8,40 Log de UFC/ml ($P < 0,05$) en el recipiente 3 (Figura 18).

Además, en los voluntarios celíacos se ha observado un aumento significativo del grupo de *Clostridium* de 8,85 a 9,50 Log de UFC/ml ($P < 0,05$); de 9,1 a 9,60 Log de UFC/ml ($P < 0,01$) y de 9 a 9,50 Log de UFC/ml ($P < 0,05$) en todos los recipientes, respectivamente.

La tendencia general de la mejora en todos los grupos bacterianos y en todos los recipientes se ha detectado tanto en sujetos sanos como celíacos, sin diferencias significativas.

Los SCFA se han medido mediante HPLC en SS1 y SS2 en los tres recipientes diferentes del sistema modelo (Figuras 19 y 20). La administración de pan de control induce una disminución significativa del acetato (V1 y V2) y del propionato (V1), y un aumento del butirato en todos los recipientes (Figura 19).

En sujetos sanos, la fermentación del pan modificado condujo a una producción significativa de acetato de 28,80 a 22,10 mM ($P < 0,01$) en V1, de 44,40 a 56,94 mM ($P < 0,01$) en V2 y de 46 a 76,50 mM ($P < 0,001$) en V3, respectivamente. Además, se ha observado un aumento significativo de la concentración de propionato de 70,46 a 89,81 mM ($P < 0,05$) en V1, y de la concentración de butirato de 40,35 a 77,09 mM ($P < 0,05$) en V3. En voluntarios celíacos, se ha observado un aumento significativo de los niveles de propionato de 45,10 a 69,20 mM ($P < 0,01$) en el recipiente 1 y de 50,80 a 70,20 mM ($P < 0,05$) en el recipiente 2, respectivamente.

Por otro lado, se ha detectado un aumento significativo de la concentración de acetato en el recipiente 1 de 41,20 a 89 mM ($P < 0,01$) (Figura 20).

A partir de los resultados, se infiere que la fermentación *in vitro* del pan modificado indujo una modulación de la microbiota del colon con un aumento de la concentración de acetato y propionato que, no se observó con el pan de control en sujetos sanos.

La ruta metabólica más conocida en las bacterias gastrointestinales para la producción de acetato y propionato se refiere al metabolismo de polisacáridos.

La producción de acetato se logra principalmente a través de la ruta metabólica de la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa por las bifidobacterias, y la producción principal de dicho ácido está estrictamente correlacionada con el aumento de bacterias (Miller T.L. et al., 1996).

De acuerdo con Hosseini E. et al. (2011), el propionato puede ser producido por carbohidratos fermentables a través de dos rutas metabólicas. El primero prevé la descarboxilación de succinato en presencia de *Bacteroides fragilis* y *Propionibacterium* spp., mientras que el segundo prevé la ruta metabólica del acrilato, en donde el piruvato se reduce a lactato por la lactato deshidrogenasa en presencia de algunos grupos de *Clostridi*. Durante la fermentación del pan modificado se ha observado un aumento significativo de bifidobacterias, grupos de *Bacteroides* y *E. rectale*.

El pan modificado mostró una modulación positiva de la composición de la microbiota, así como un aumento de la concentración de SCFA en donantes sanos y celíacos.

Después, la fermentación del pan modificado crea una modulación positiva en términos de efecto bifidogénico en sujetos sanos y celíacos y en términos de número de crecimiento de *Clostridium* XIVa+b en sujetos celíacos.

- 5 Aunque en sujetos sanos los niveles de ácido acético y propiónico se redujeron en el recipiente 1, los niveles de ácido acético aumentaron considerablemente en los recipientes V2 y V3, y los niveles de ácido butírico aumentaron en el recipiente V3. Además, en cuanto a los sujetos celíacos, se han observado altas concentraciones de ácido acético y propiónico en el recipiente V1, y de propionato en el recipiente V2.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Shuppan, D., Yunker, Y., Barisani, D. 2009. *Gastroenterology*, 137(6):1912-33.
- Rossi, M. Schwartz, K. B. J. *Leukoc. Biol.* 87, 749-751 (2010).
- Sanchez, E., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Fernandez Murga, M. L. Sanz, Y. 2013. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5472-5479.
- Wacklin, P. et al. 2013. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 934-941.
- Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. 2009. *J. Clin. Pathol.* 62, 264-269.
- Collado, M., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. 2008. *BMC Microbiol.* 8, 232.
- Di Cagno, R. et al. 2011. *BMC Microbiol.* 11, 219.
- De Palma, G. et al. 2010. *BMC Microbiol.* 10, 63.
- Sanz, Y. et al. 2007. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 562-568.
- Nadal, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M. & Sanz, Y. 2007. *J. Med. Microbiol.* 56, 1669-1674.
- Schippa, S. et al. 2010. *BMC Microbiol.* 10, 175.
- Wacklin, P. et al. 2014. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1933-1941.
- Cenit, M.C., Olivares, M., Codoner-Franch, P., Sanz, Y. 2015. *Nutrients*, 7, 6900-6923.
- Smecuol, E.; Hwang, H.J.; Sugai, E.; Corso, L.; Cherňavsky, A.C.; Bellavite, F.P.; González, A.; Vodánovich, F.; Moreno, M.L.; Vázquez, H. 2013. *J. Clin. Gastroenterol.*, 47, 139-147.
- Olivares, M.; Castillejo, G.; Varea, V.; Sanz, Y. 2014. *Br. J. Nutr.*, 112, 30-40.
- Klemenak, M.; Dolinsek, J.; Langerholc, T.; Di Gioia, D. *Dig. Dis. Sci.*, 7, 3454-3460.
- Lamacchia C., Landriscina L., D'Agnello P. 2016. *Food Chemistry*, 197, 634-640.
- Documento WO 2014/053891
- Noel TR, Parker R, Ring SG, Tatham AS. 1995. *Int J Biol Macromol*, 17:81
- Micard, V., y Guilbert, S. 2000. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 229-236.
- Tosi, P., Gritsch, C.S., He, J., Shewry, P.R. 2011. *Annals of Botany*, 108, 23-25.
- Lamacchia C., Di Luccia, A., Baiano, A., Gambacorta, G., La Gatta, B., Pati, S., La Notte, E. 2007. *Journal of Cereal Science*, 46, 58-63.
- Gerrard, J.A. 2000. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 391-399.
- Tilley, K.A., Benjamin, R.E., Bagorogoza, K.E., Okoy-Kotber, B. M., Prakash, O., Kwen, H. 2001. 49 (5), 2627-2632.
- Maccaferri S, Klinder A, Cacciatore S, Chitarrari R, Honda H, et al. 2012. *Molecular Nutrition and Food Research* 56, 1342-1352.
- Tejero-Sarinena, S., Barlow, J., Costabile, A. Gibson, G.R. y Rowland, I. 2012. *Anaerobe*, vol. 18, n.º 5, págs. 530-538.
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, et al. 1998. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3336-3345.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. 1996. *Microbiology* 142, 1097-1106.
- Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, et al. 1995. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3069-3075.
- Maccaferri S, Klinder A, Cacciatore S, Chitarrari R, Honda H, Luchinat C, Bertini I, Carnevali P, Gibson GR, Brigidi P, Costabile A. *Mol Nutr Food Res* 2012, 56:1342-52.
- Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. *Microb Ecol* 1998, 35:180-7.
- Hosseini E, Grootaert C, Verstraete W, Wiele TV. *Nutr Rev* 2011, 69(5):245-58.
- Miller TL, Wolin MJ. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62 (5):1589-92.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de eliminación de toxinas de gluten de granos de cereales, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) hidratar los granos de cereal con agua hasta un grado de humedad de los granos comprendido entre un 15 y un 18 %;
- b) tratar los granos hidratados mediante ondas electromagnéticas durante un tiempo y con una potencia necesaria para alcanzar una temperatura de los granos comprendida entre 60 y 70 °C;
- 10 c) suspender la irradiación hasta que se alcance una temperatura comprendida entre 50 y 60 °C y la evaporación simultánea de agua con una pérdida de humedad de los granos comprendida entre un 14 y un 16 % en comparación con la etapa a);
- d) tratar los granos hidratados mediante ondas electromagnéticas durante un tiempo y con una potencia necesaria para alcanzar una temperatura de los granos comprendida entre 80 y 90 °C;
- 15 e) suspender la irradiación hasta una temperatura comprendida entre 70 y 80 °C y la evaporación simultánea de agua con una pérdida de humedad de los granos comprendida entre un 40 y un 44 % en comparación con la etapa a);
- f) tratar los granos hidratados mediante ondas electromagnéticas durante un tiempo y con una potencia necesaria para alcanzar una temperatura de los granos comprendida entre 110 y 120 °C;
- 20 g) suspender la irradiación hasta una temperatura comprendida entre 80 y 90 °C y la evaporación simultánea de agua con una pérdida de humedad de los granos comprendida entre un 50 y un 60 % en comparación con la etapa a);
- h) enfriar lentamente los granos desintoxicados a temperatura ambiente.

25 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas ondas electromagnéticas son microondas o infrarrojos.

3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que cuando se emplean microondas, las etapas de tratamiento de los granos hidratados se llevan a cabo en un horno de microondas.

30 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una etapa adicional i) de molienda de los granos obtenidos en la etapa h) para obtener harinas o sémola desintoxicada.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además la etapa de extracción de gluten de harinas o sémola desintoxicadas obtenida en la etapa i) con disolventes.

35 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los cereales se seleccionan entre trigo, cebada, orzo, centeno o avena.

40 7. Granos, harina, sémola o gluten desintoxicados obtenibles mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. Producto alimenticio que comprende granos, harina, sémola o gluten desintoxicados de acuerdo con la reivindicación 7, seleccionado entre pan, pasta, productos panificables, cereales de desayuno, cerveza, helados, productos lácteos, salsas, zumo, alimentos para bebés y salami.

45 9. Granos, harina, sémola o gluten desintoxicados de acuerdo con la reivindicación 7 o producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en la prevención o en el tratamiento de la disbiosis intestinal.

50 10. Granos, harina, sémola o gluten desintoxicados de acuerdo con la reivindicación 7 o producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en la prevención o en el tratamiento de enfermedades crónicas intestinales inflamatorias o autoinmunes, seleccionadas del grupo de enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome de intestino irritable.

55 11. Granos, harina, sémola o gluten desintoxicados de acuerdo con la reivindicación 7 o producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en la prevención o en el tratamiento de enfermedades metabólicas sistémicas seleccionadas entre obesidad, diabetes de tipo 1 y diabetes de tipo 2.

60 12. Uso de los granos, harina, sémola o gluten desintoxicados de acuerdo con la reivindicación 7 o producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso como agente antimicrobiano contra bacterias Gramnegativas y Grampositivas.

65 13. Uso de los granos, harina, sémola, gluten desintoxicados o producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dichas bacterias Gramnegativas pertenecen al género *Salmonella*, preferentemente a la especie *Salmonella Typhimurium* y dichas bacterias Grampositivas pertenecen al género *Staphylococcus*, preferentemente a la especie *Staphylococcus aureus*.

14. Uso de los granos, harina, sémola o gluten desintoxicados de acuerdo con la reivindicación 7 o producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso como agente protector para especies probióticas beneficiosas.
- 5 15. Uso de los granos, harina, sémola, gluten desintoxicados o producto alimenticio desintoxicados de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dichas especies probióticas pertenecen al género *Lactobacilli*, preferentemente a la especie *Lactobacillus acidophilus*.
- 10 16. Uso del gluten desintoxicado de acuerdo con la reivindicación 7 como agente espesante para la preparación de productos alimenticios.

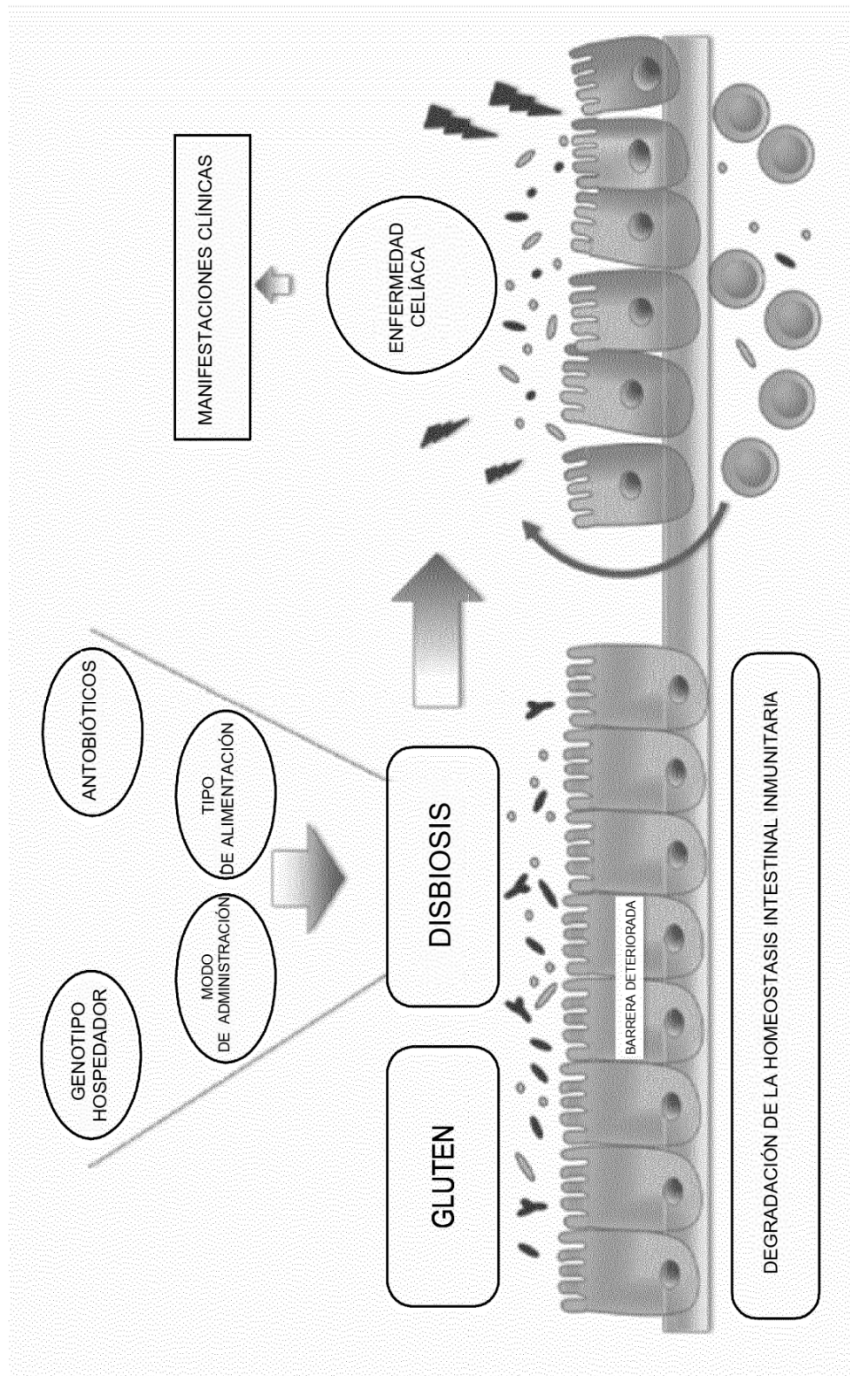


FIG.1

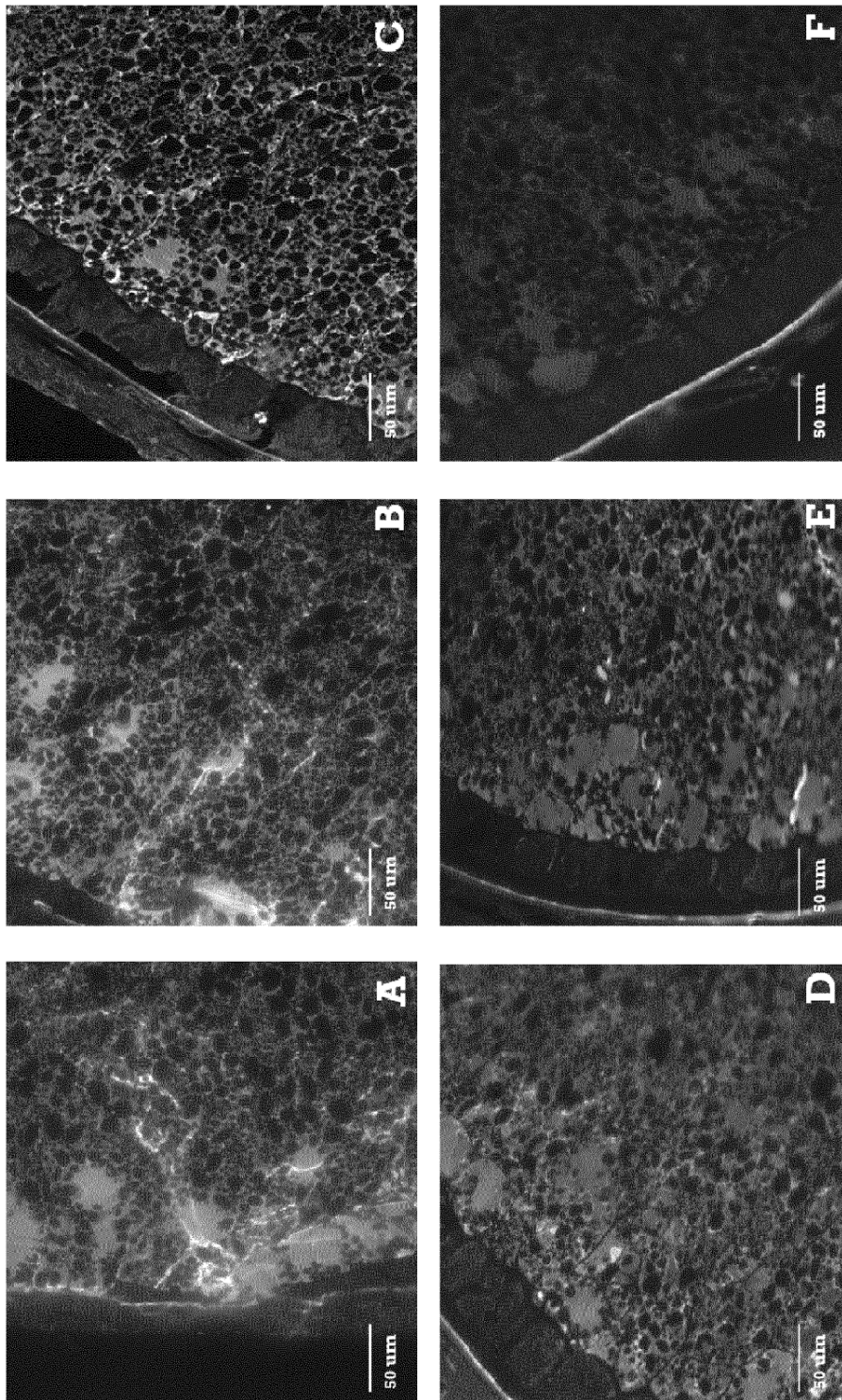
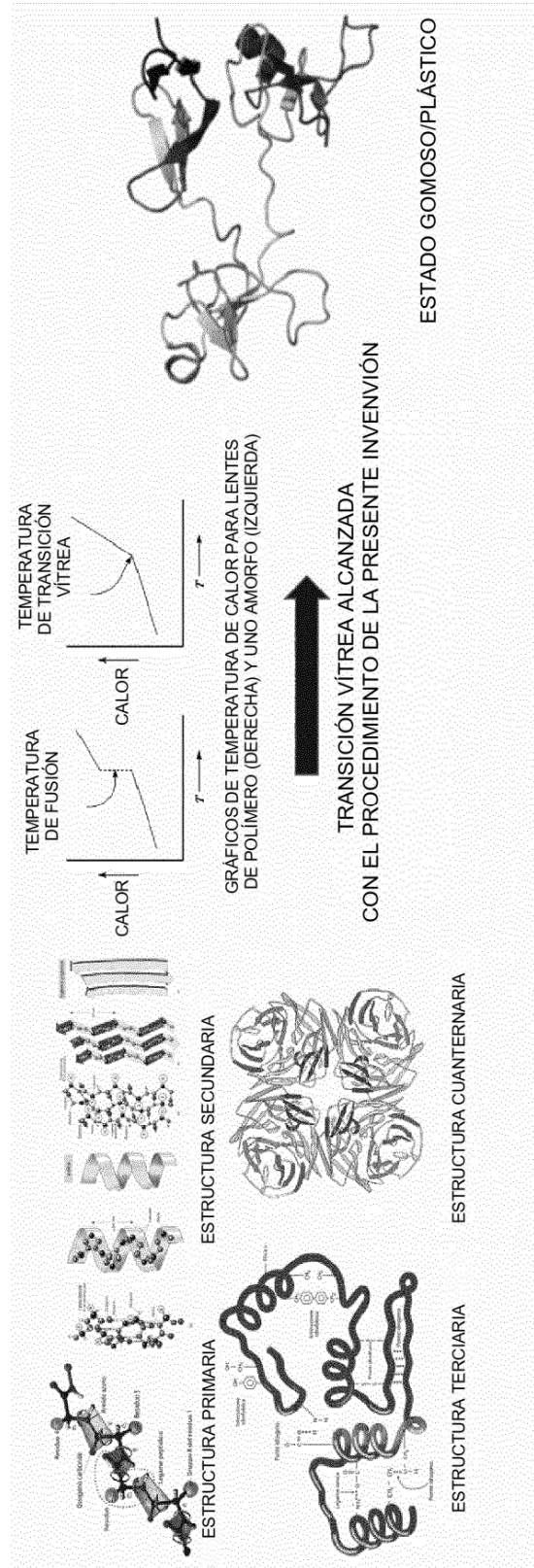


FIG.2



ESTRUCTURA NATURAL DE PROTEÍNA

FIG.3

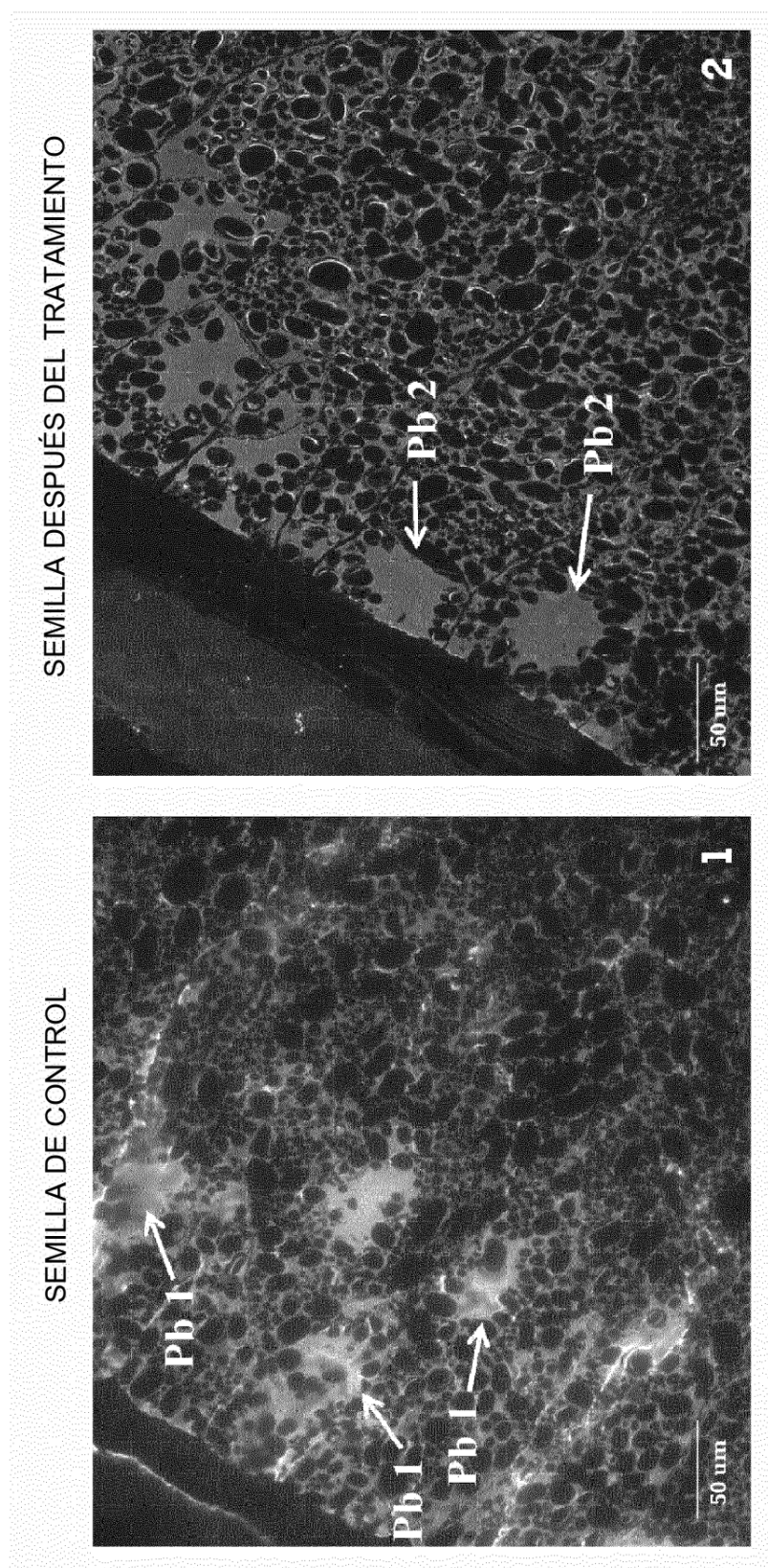


FIG.4

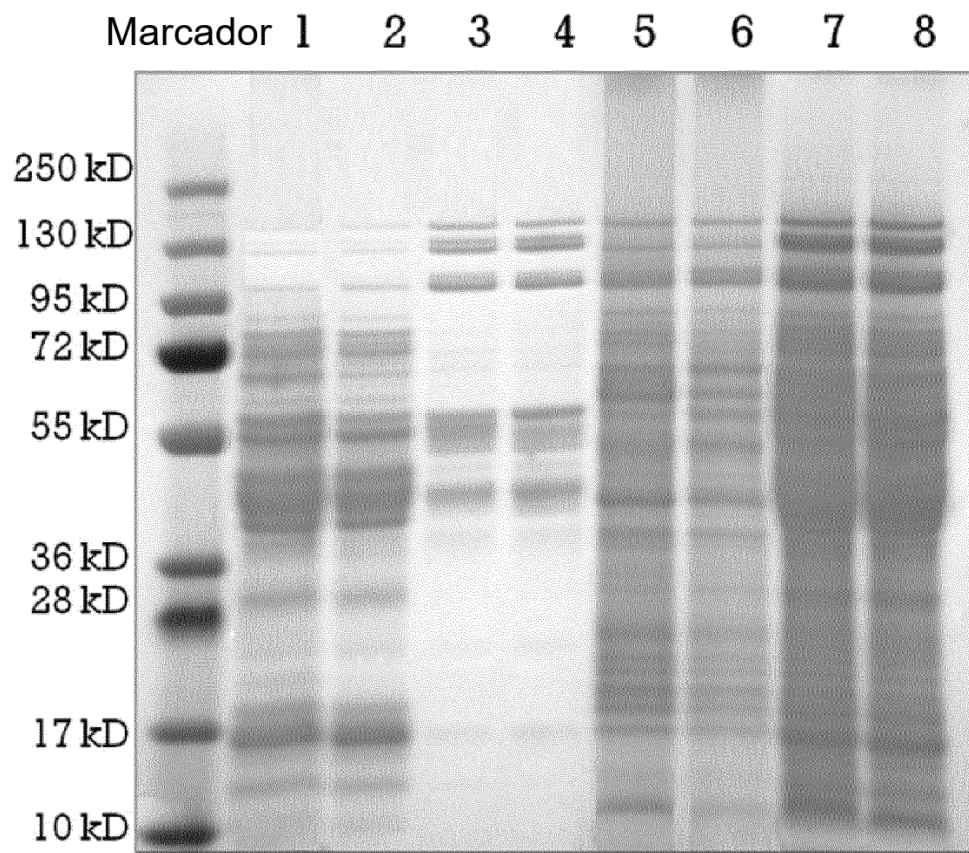


FIG.5

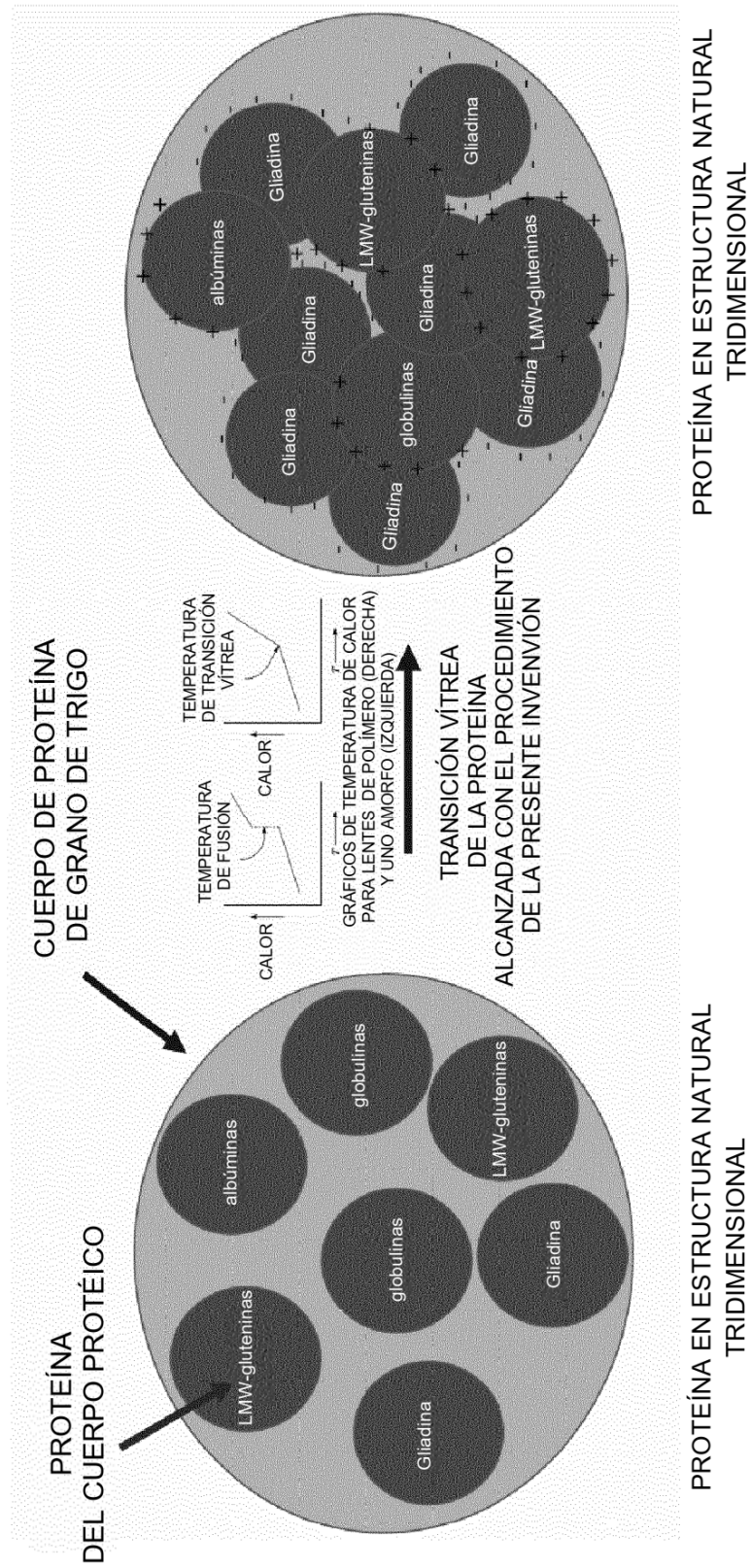


FIG.6

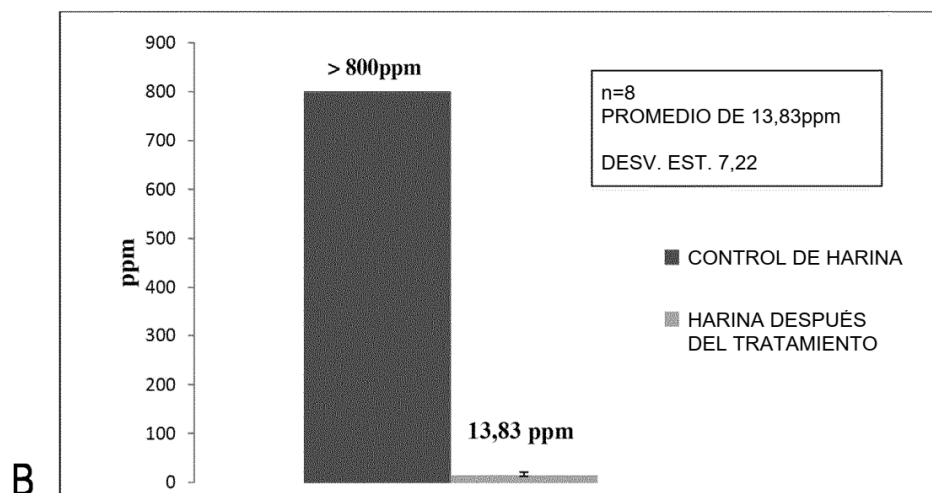
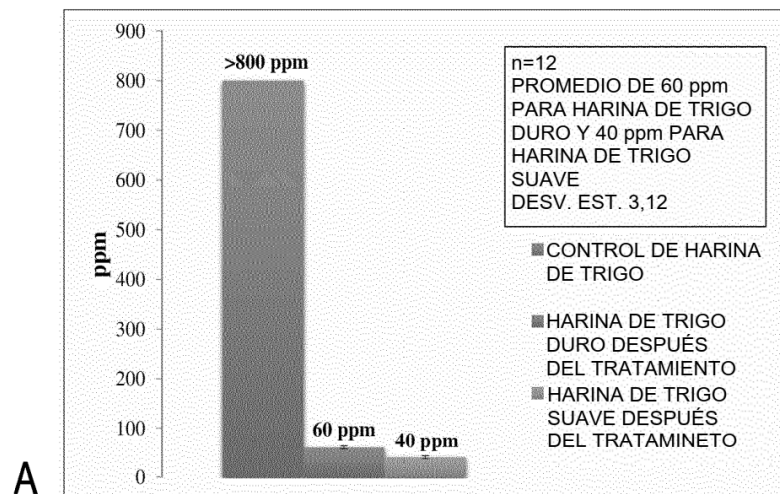


FIG.7

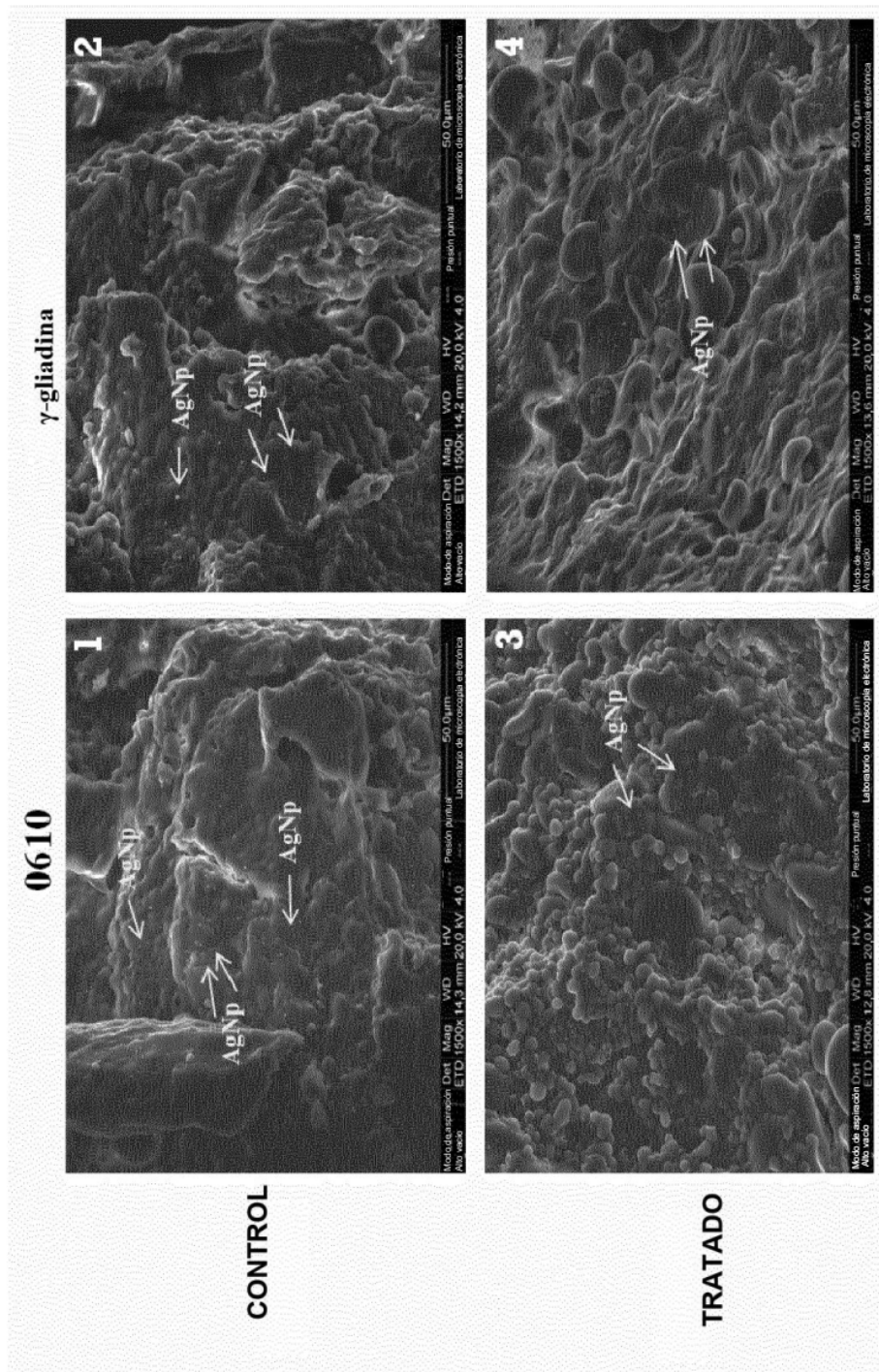


FIG.8

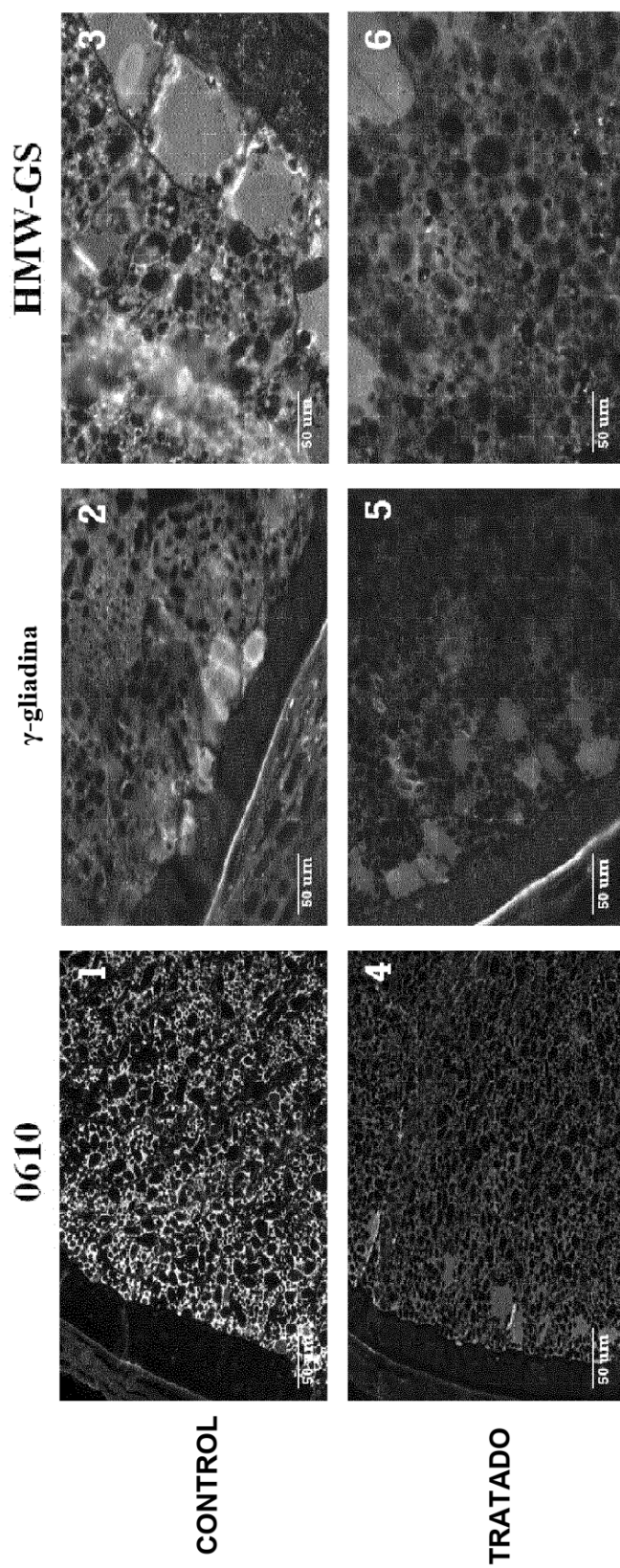


FIG. 9

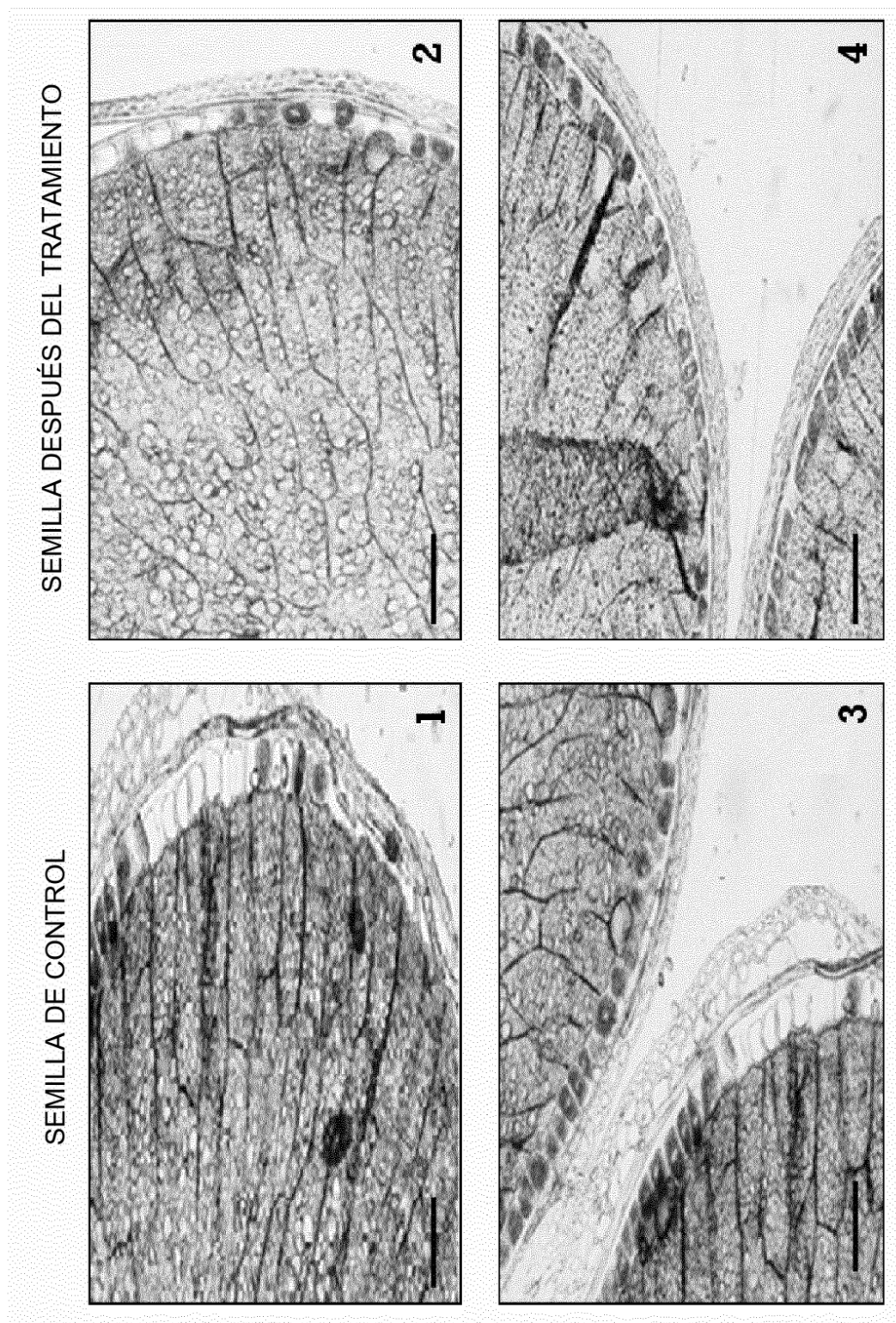


FIG.10

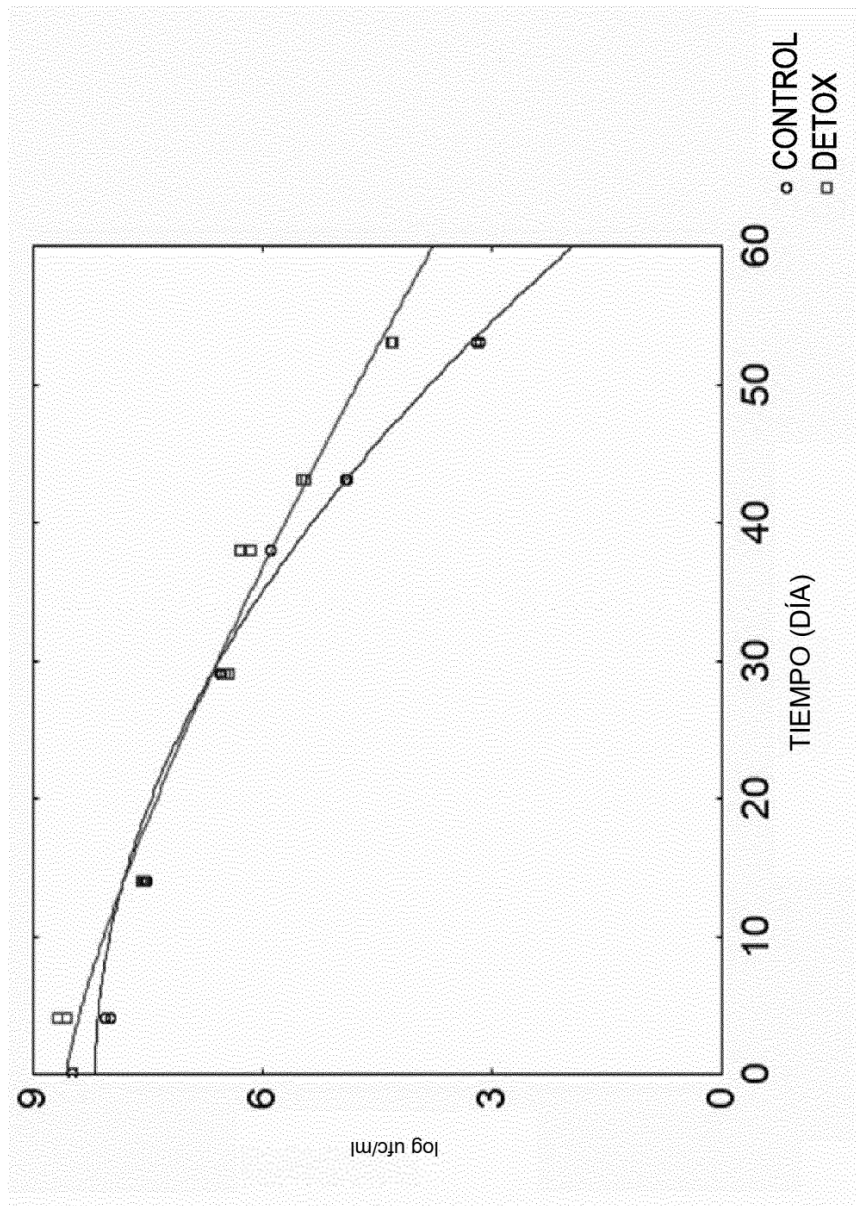


FIG.11

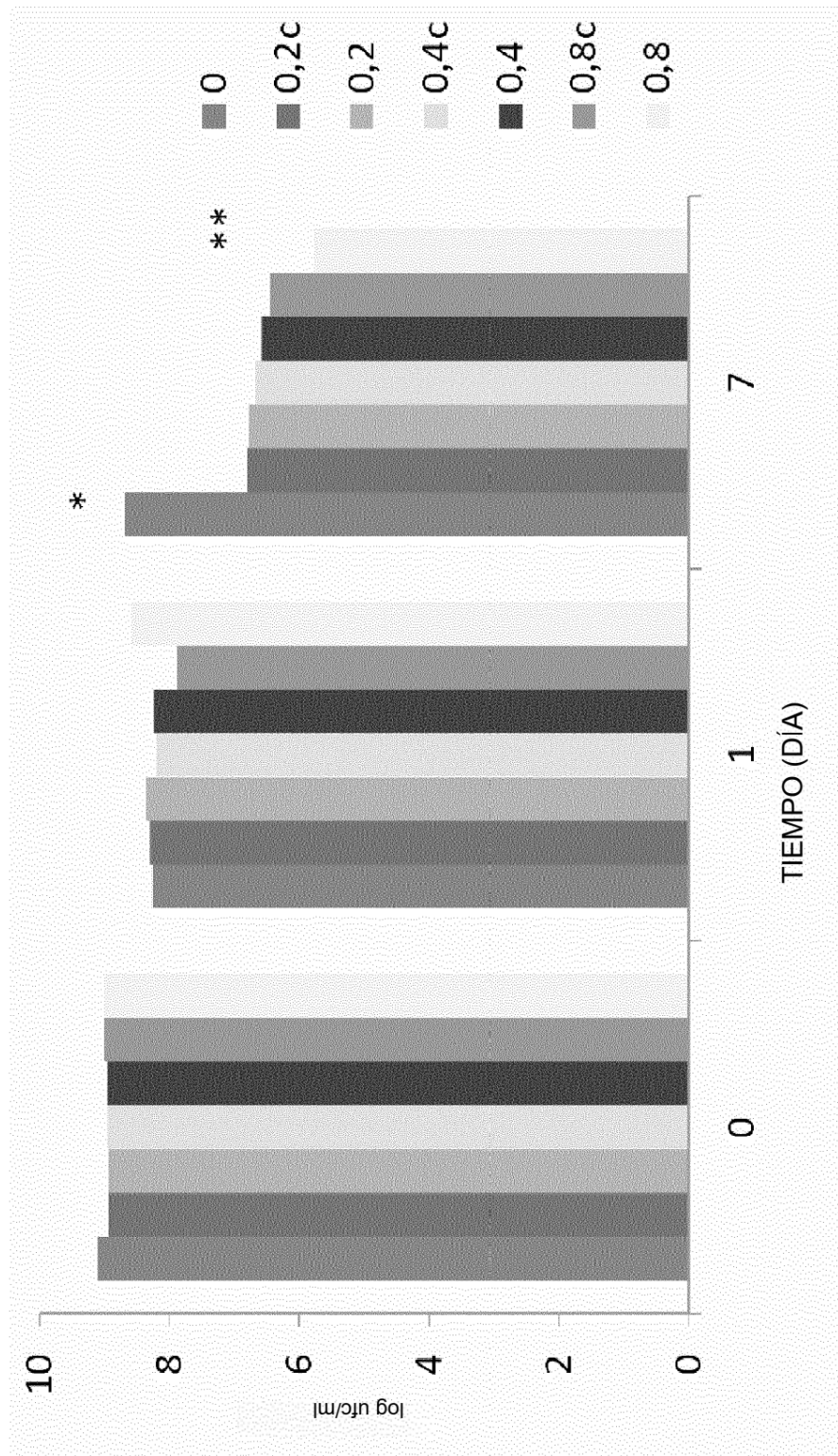


FIG.12

EP 3 389 400 B1

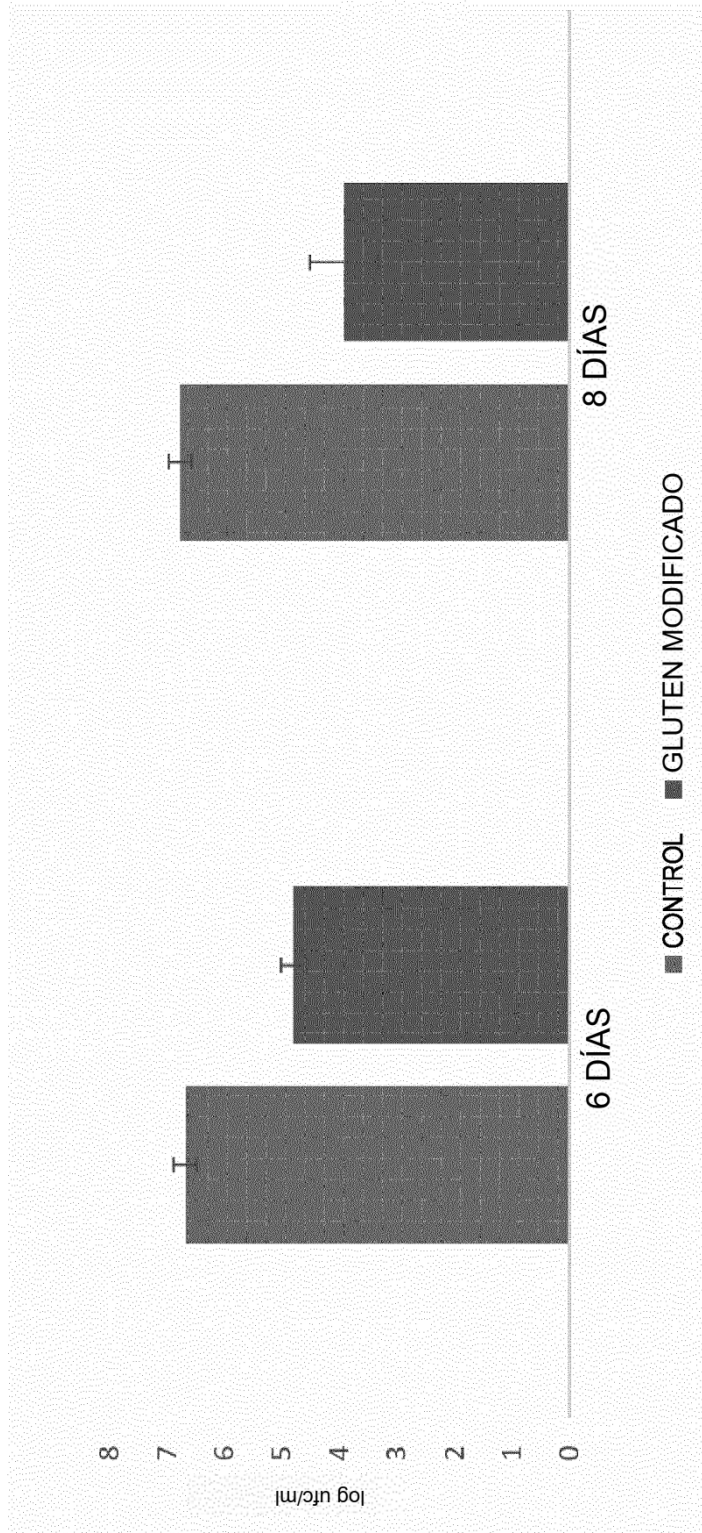


FIG.13

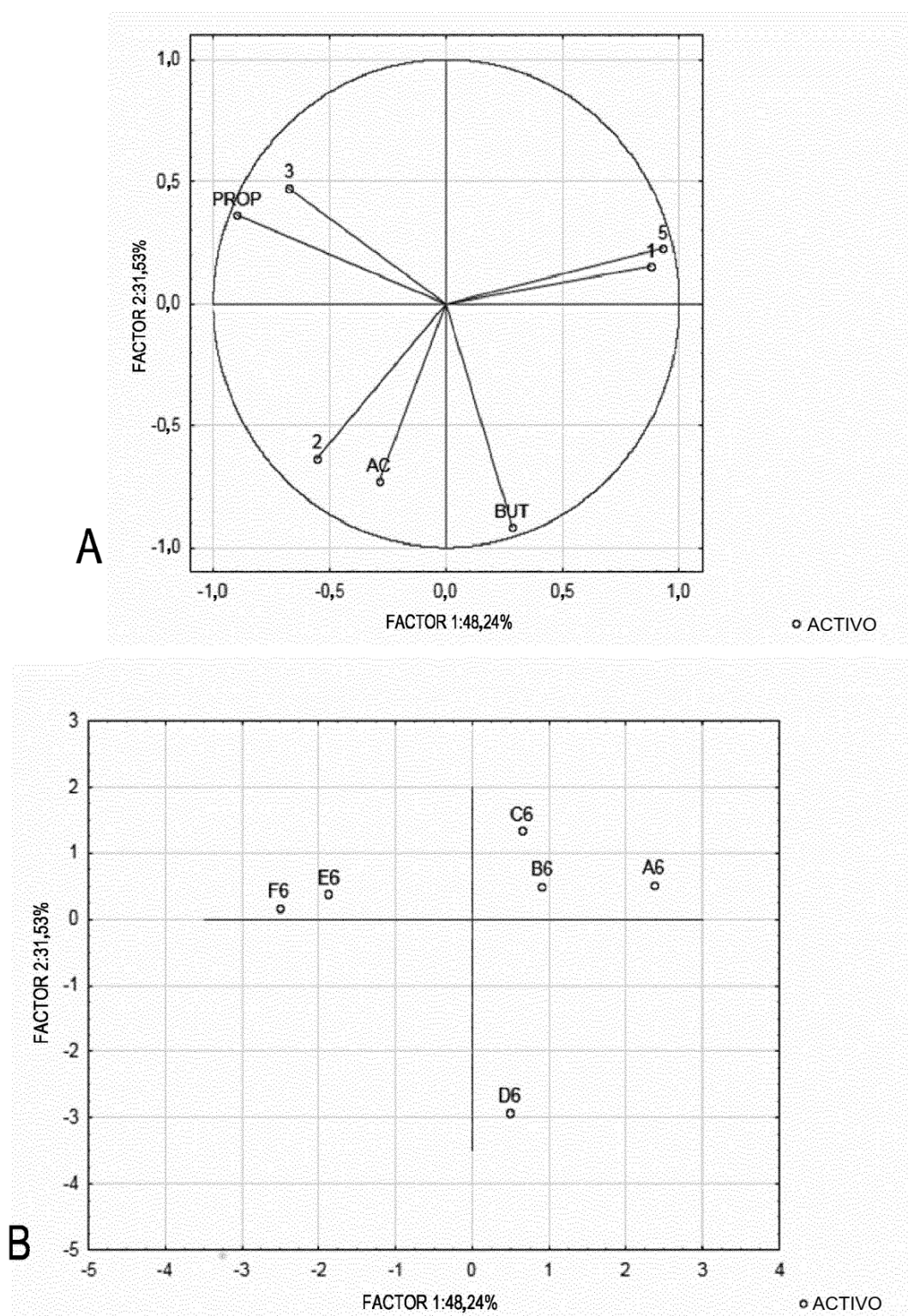


FIG.14

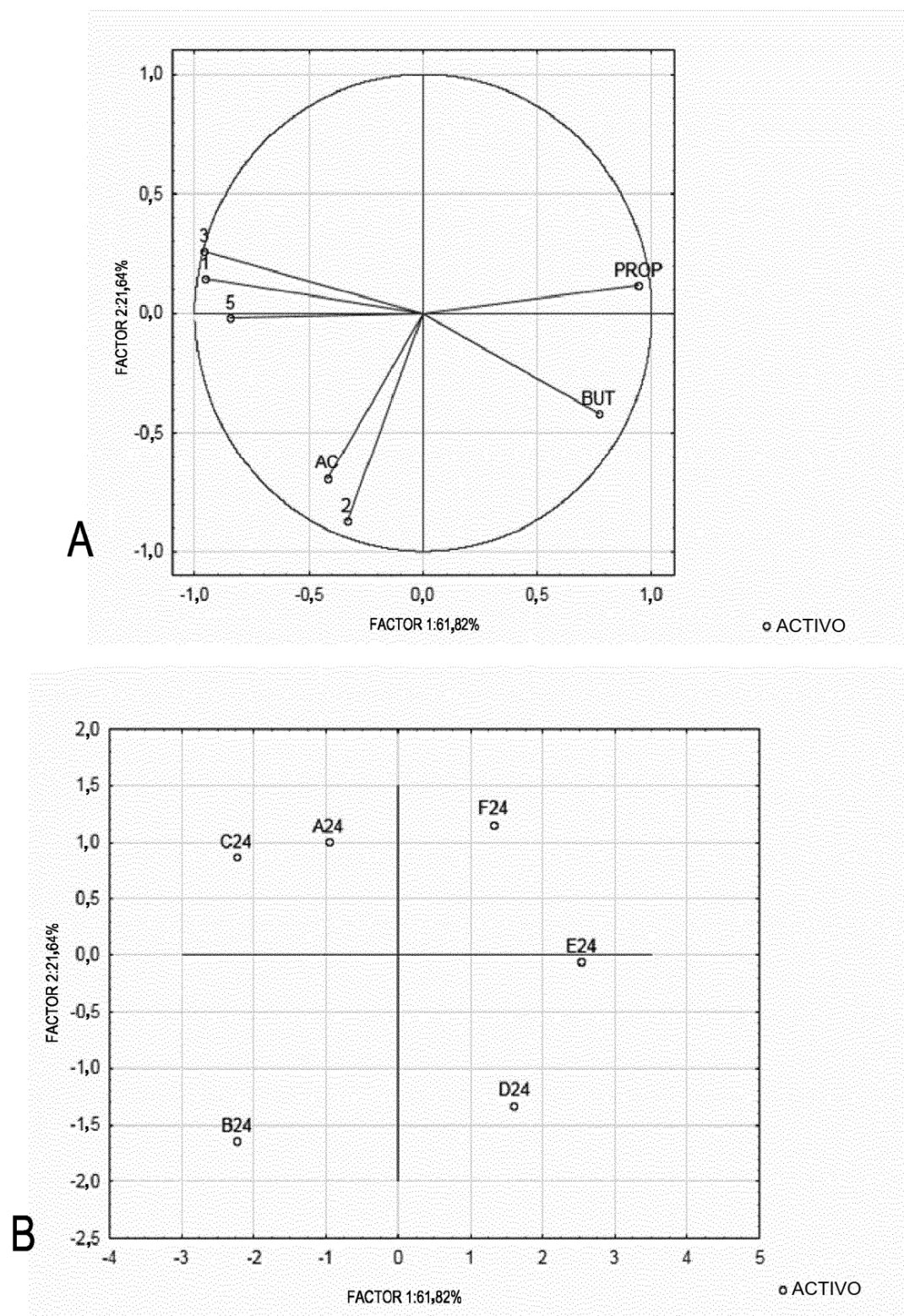


FIG.15

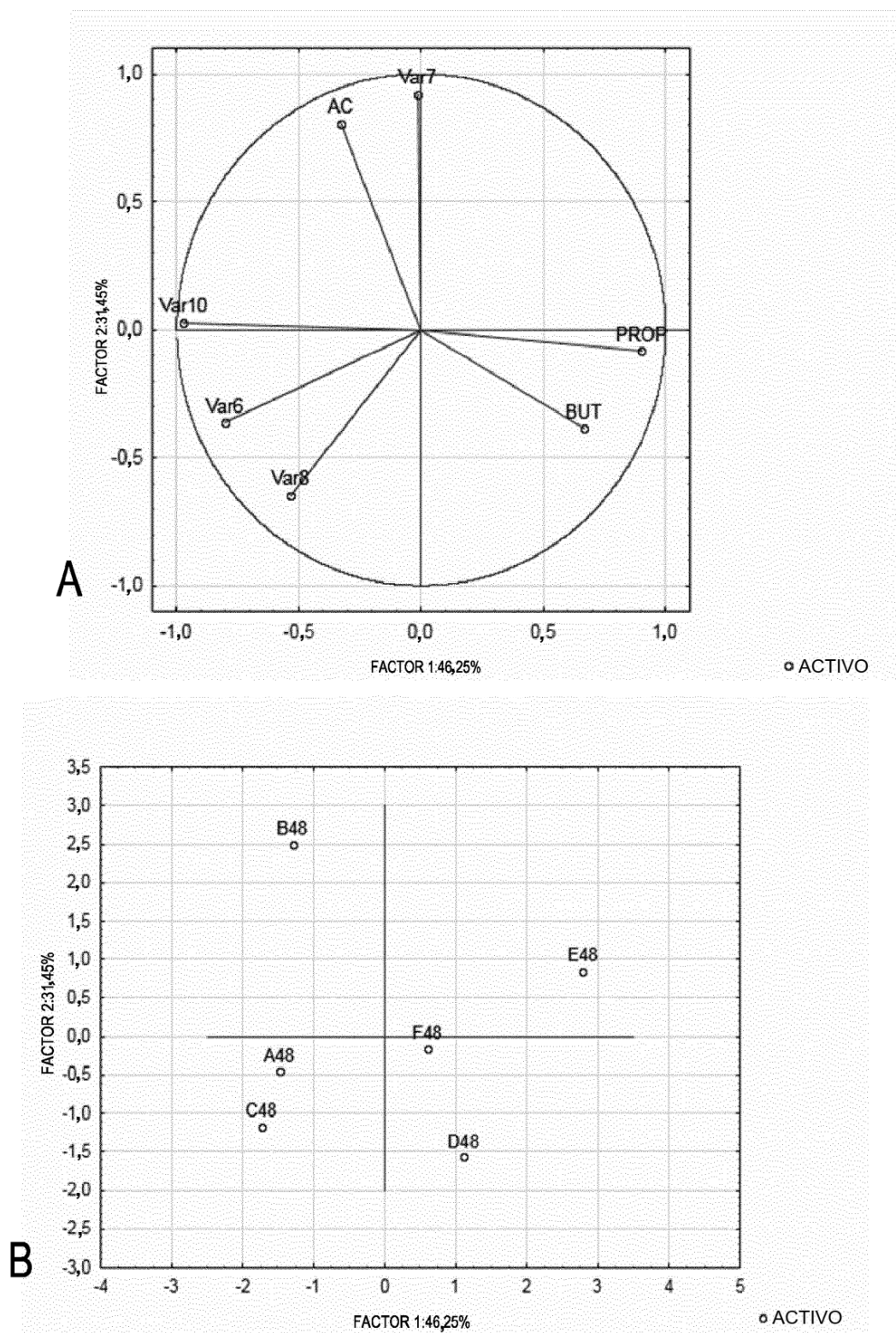


FIG.16

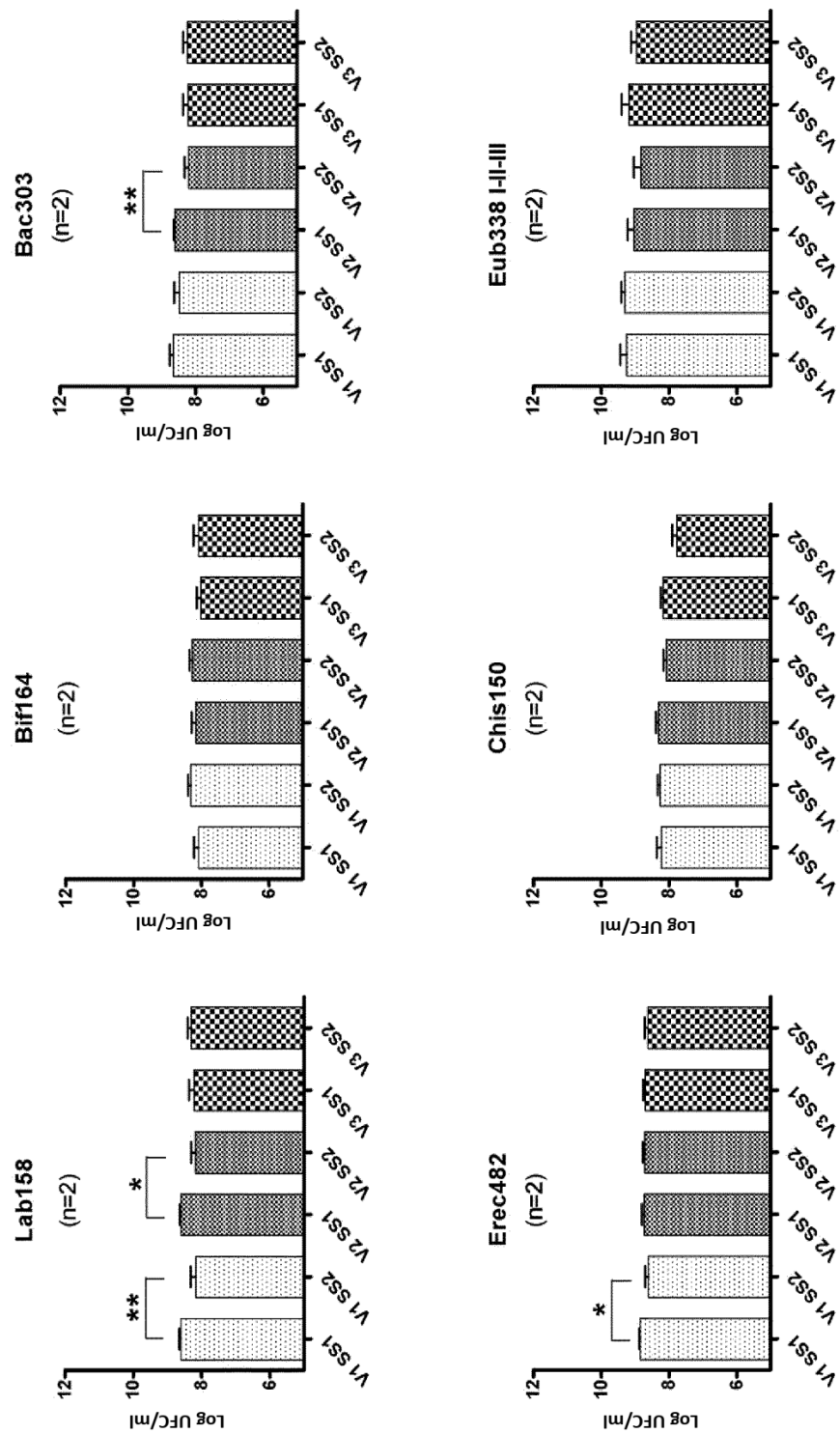


FIG.17a

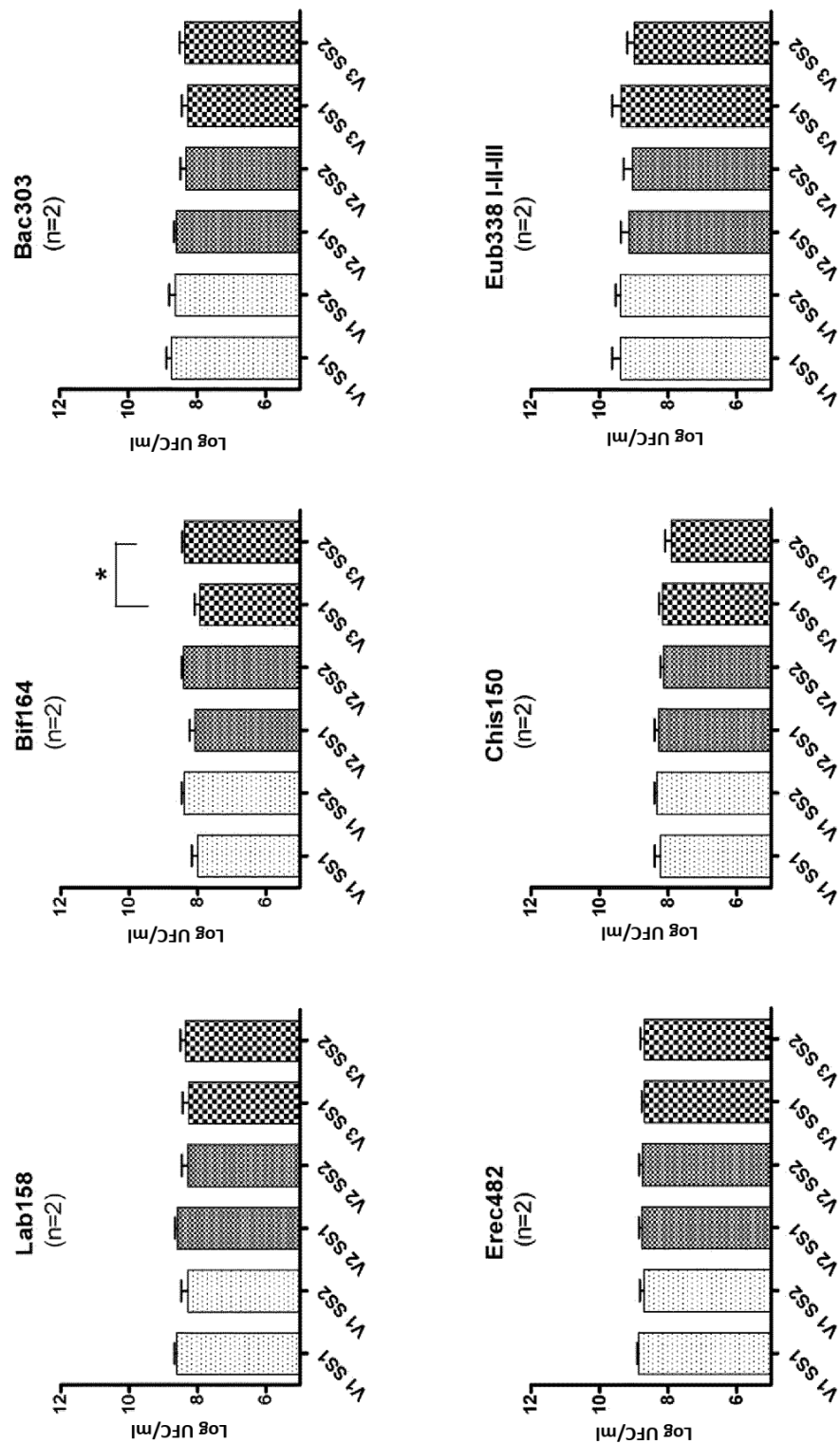


FIG.17b

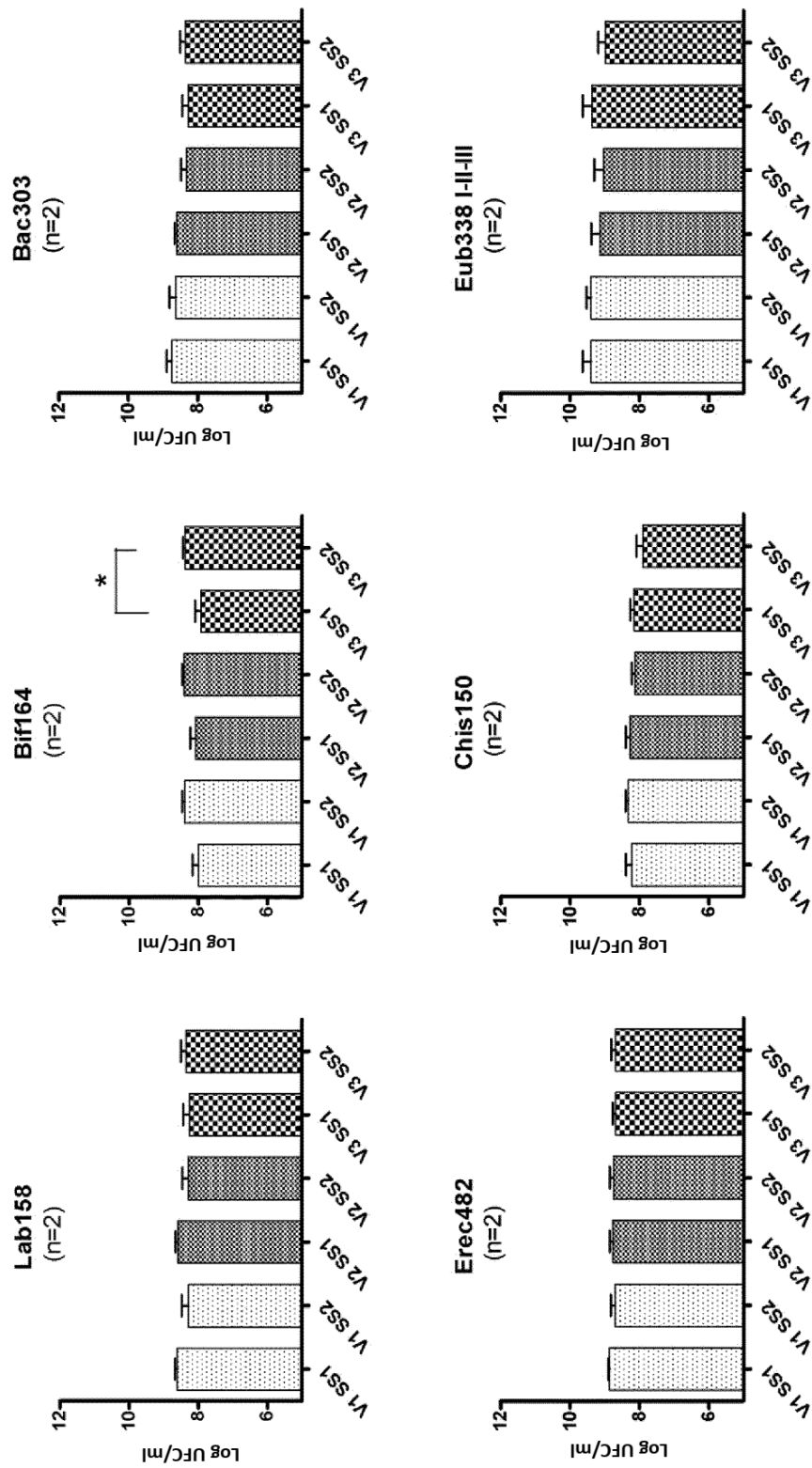


FIG.18a

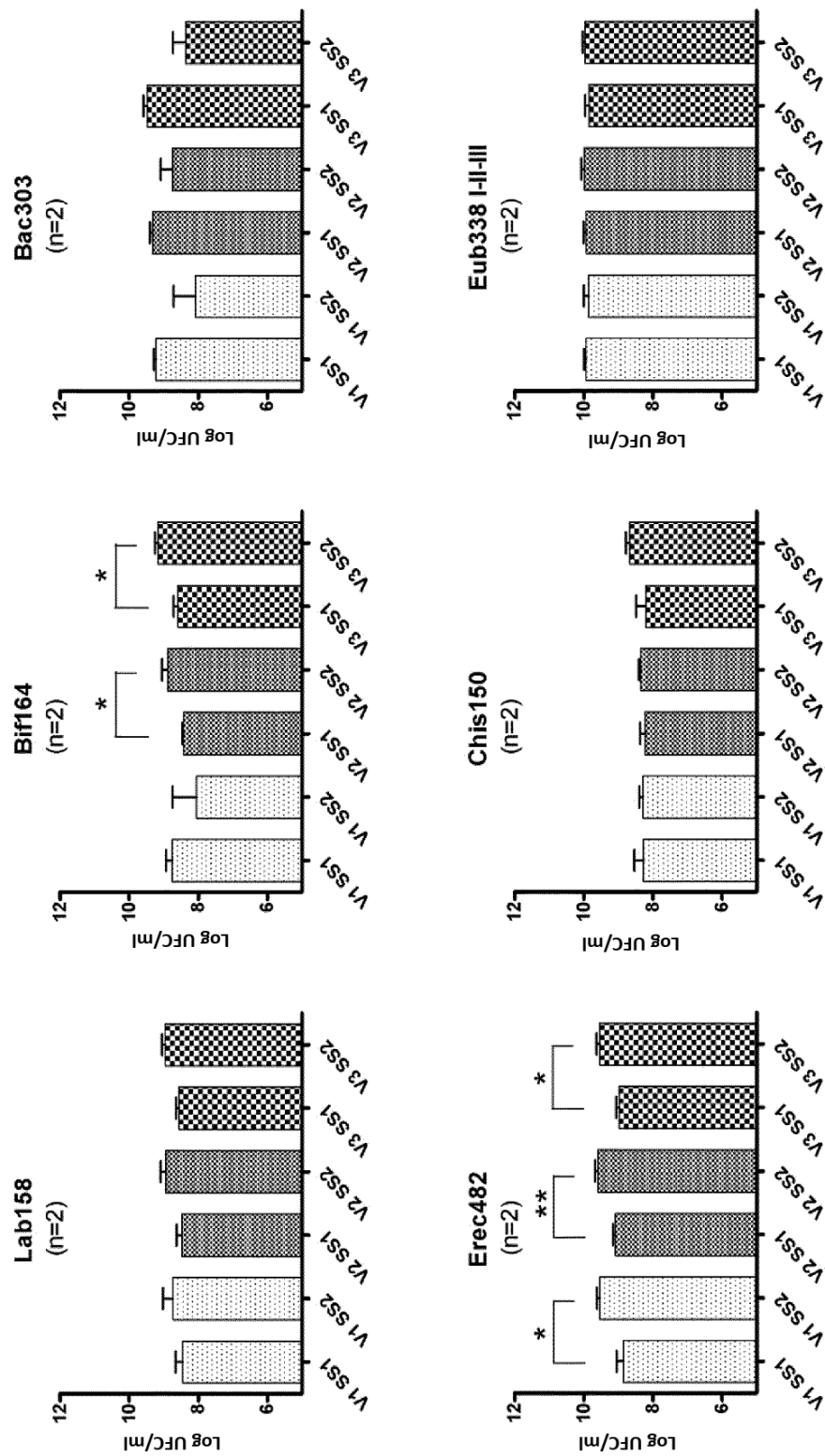


FIG.18b

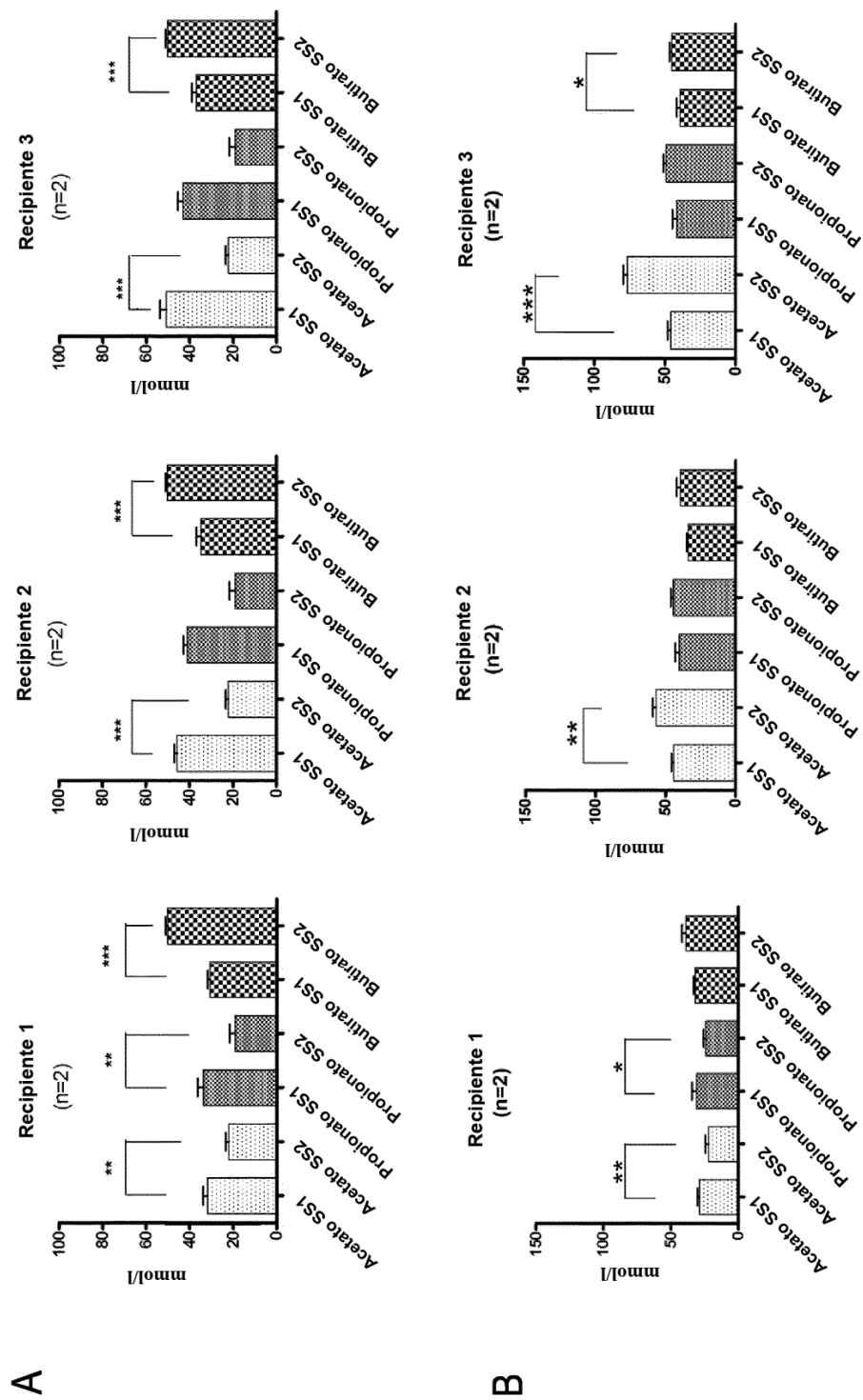


FIG.19

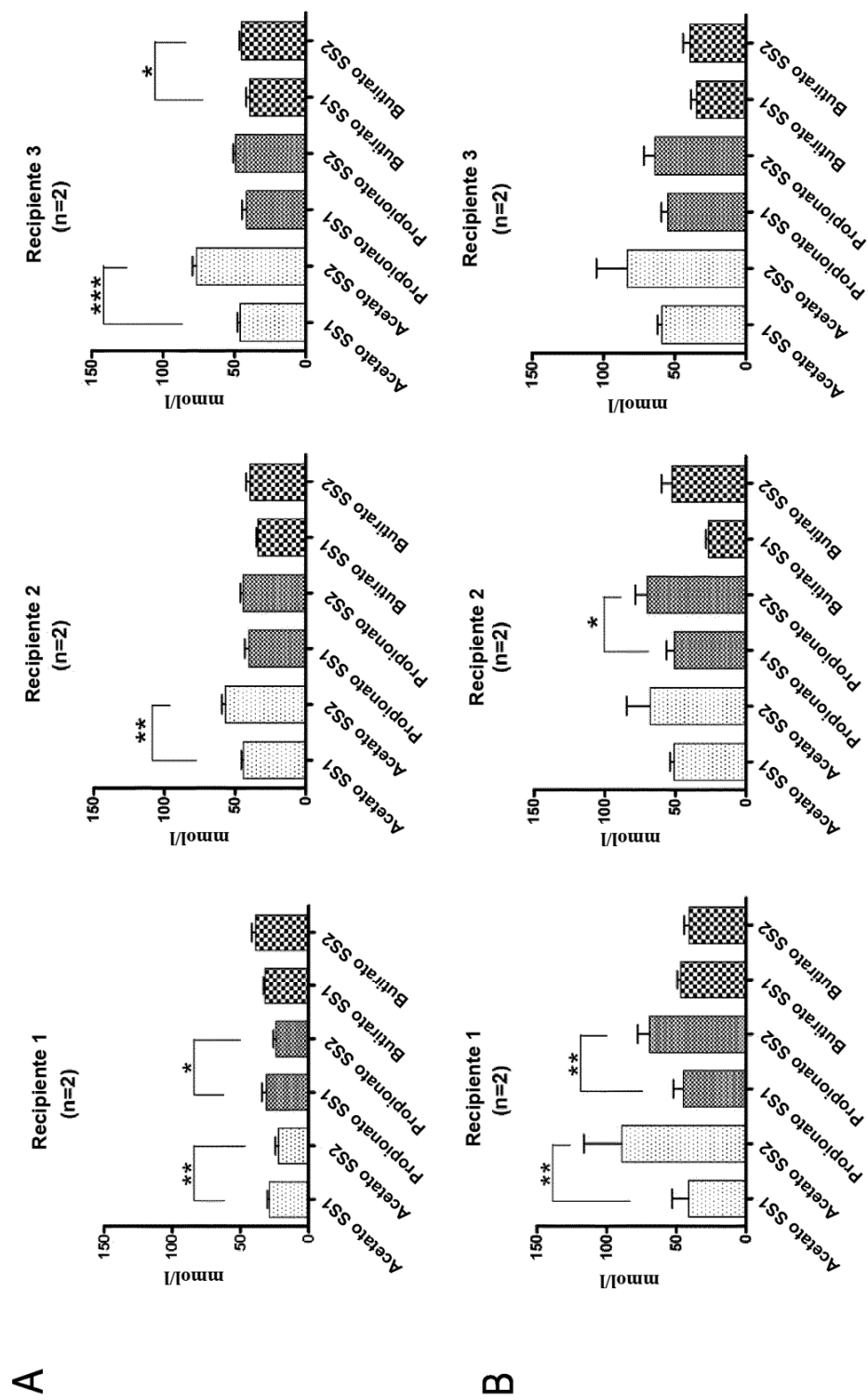


FIG.20

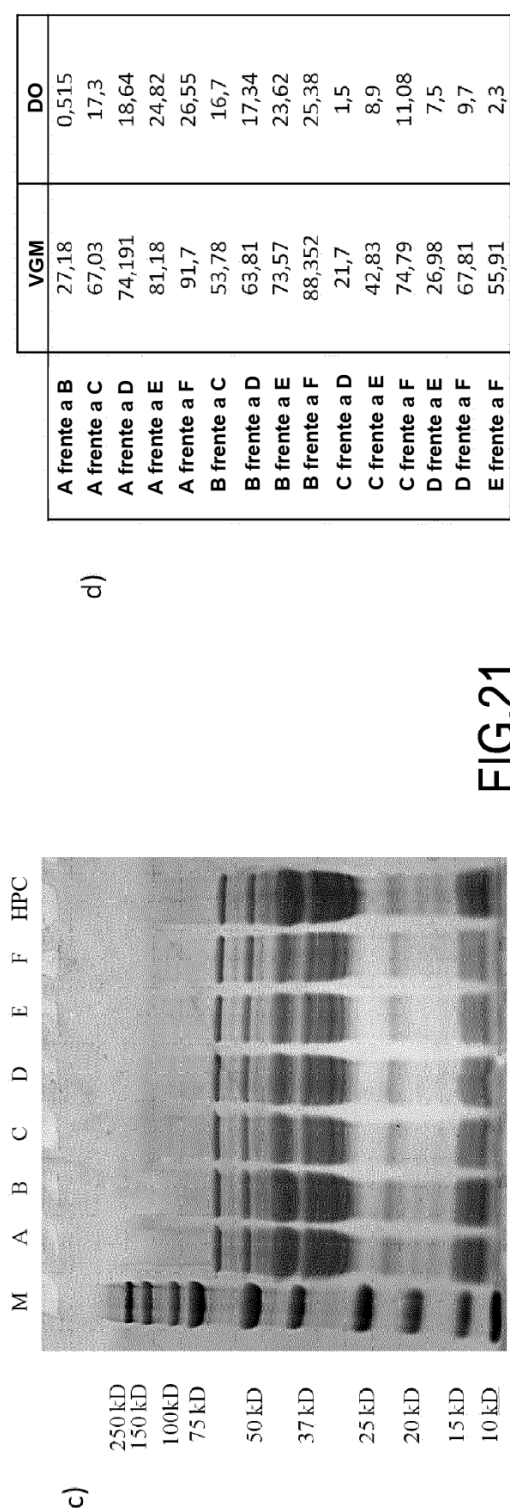
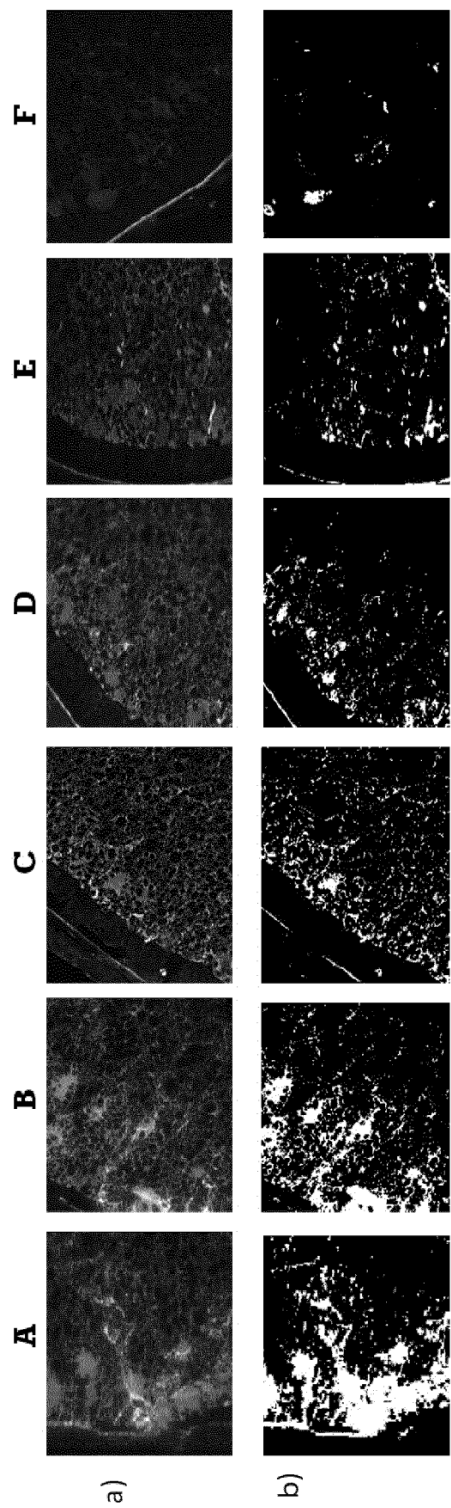


FIG.21