

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102013902196878A1

Publication Date

20150408

Applicant

CORMACI GIANFRANCESCO EMANUELE

Title

NUOVO PROCESSO INDUSTRIALE DI LAVORAZIONE PER LA
PRODUZIONE DI ALIMENTI FARINACEI, DESTINATI A SOGGETTI CON
MALATTIA CELIACA CLINICAMENTE MANIFESTA, A BASE DI FARINE COMUNI.

DESCRIZIONE

Dell'invenzione industriale dal Titolo: **Nuovo processo industriale di lavorazione per la produzione di alimenti farinacei, destinati a soggetti con malattia celiaca clinicamente manifesta, a base di farine comuni.**

A nome di: **Dott. Danilo Ciciulla (Tecnologo Alimentare) – Dott. Gianfrancesco Cormaci (Medico Chirurgo specialista in Biochimica)**

Di nazionalità: **Italiana**

Con sede in: **Carlentini (SR) - Italia**

Indirizzo: **Via Antonio Gramsci, 49 – 96013 Carlentini (SR) – Italia**

CAMPO DELLA TECNICA A CUI L'INVENZIONE FA RIFERIMENTO:

Bio-Tecnologia Alimentare e alimentazione ai fini speciali – celiachia.

STATO ANTERIORE DELLA TECNICA:

fino ad oggi, gli alimenti destinati ai soggetti celiaci sono stati prodotti a partire da farine di grano bio-ingegnerizzato al fine della mancata espressione delle proteine del glutine, oppure a partire da farine di altre varietà vegetali prive dei geni codificanti le proteine del glutine. Questo ha fatto sì che per la produzione di alimenti gluten-free, al fine di evitare contaminazioni crociate, siano richiesti accorgimenti particolari in fase di progettazione dei siti produttivi, delle modalità di approvvigionamento e dei processi di lavorazione. Inoltre, l'utilizzo di farine deglutinate o prive di glutine all'origine, causa degli evidenti difetti qualitativi riscontrabili nel prodotto finito. Infatti, il prodotto finito gluten-free presenta un aspetto mediocre ed un sapore altrettanto scadente, andando a compromettere la qualità di vita dei soggetti affetti da celiachia.

Inoltre, se si considera che la produzione di farine deglutinate, a partire da vegetali geneticamente modificati per non esprimere il pool genico delle gliadine e glutenine (componenti principali del glutine) risulta estremamente

Gianfrancesco Cormaci

Daniilo Ciciulla

costosa e laboriosa, si riesce a comprendere come detti costi si riflettano sul prodotto finito in termini economici tutt'altro che indifferenti senza, per altro, ottenere un prodotto che organoletticamente ed edonisticamente abbia delle caratteristiche accettabili simili ai prodotti standard.

Continuando, il problema del glutine delle farine standard si rivela importante nella fase di implementazione degli stabilimenti produttivi, richiedendo degli accorgimenti particolari per la sua esclusione, rendendo la fase progettuale e la fase di realizzazione decisamente costose, nonché rendendo le fasi di lavorazione complesse dal punto di vista tecnico, visto che l'assenza di glutine conferisce scarse proprietà reologiche e di lavorabilità agli impasti.

Al momento, non esiste altro accorgimento per le persone affette da celiachia se non quello di escludere il glutine dalla dieta. Alcuni gruppi di ricerca, recentemente, hanno cercato di escludere il glutine da farine standard utilizzando l'enzima batterico trans-glutaminasi o TG-asi, additivo coadiuvante tecnologico già autorizzato ed in commercio, con il fine di andare a chelare i siti antigenici del glutine. Detti gruppi hanno utilizzato come complemento delle loro formulazioni un reagente chimico denominato lisina-metil-estere (K-Me), prodotto di sintesi dal costo elevato, ottenendo dei risultati accettabili ma economicamente sfavorevoli.

OBIETTIVO CHE L'INNOVAZIONE INTENDE RAGGIUNGERE:

l'obiettivo che il nuovo metodo di lavorazione si prefigge è quello di produrre prodotti farinacei senza glutine che presentano i siti antigenici QXP del glutine neutralizzati dalla trans-glutaminasi (TG-asi), ma utilizzando come **agente schermante un lisato di lievito *S. cerevisiae*** che, grazie alla lisi ad ultrasuoni della cellula fungina, possa apportare l'intermedio di reazione lisina proteica a disposizione dell'enzima anzidetto, conferendo maggiore economicità rispetto ad altre fonti di lisina, sintetiche o meno. L'uso della TG-asi è già contemplato come coadiuvante tecnologico per migliorare la reologia e le caratteristiche

Giuseppe Camesi

Paolo Paoletti

tecnologiche sia degli impasti che dei prodotti finiti, ma non come schermante antigenico del glutine durante le fasi di lavorazione.

La grossa differenza tra lo stato dell'arte esistente ed il ritrovato degli Autori sta nel rendere il glutine antigenicamente inerte, direttamente durante le fasi di lavorazione per l'ottenimento del prodotto finito. Il tutto a costi nettamente inferiori rispetto ad ora, paragonabili ai costi di una produzione standard.

E' previsto infatti l'utilizzo, insieme alla TG-asi di origine batterica, di un omogeneizzato meccanico a freddo di lievito di birra (*S. cerevisiae*), che funga da fonte principale di lisina proteica. In aggiunta, tale lisato a freddo potrà sfruttare l'attività trans-glutaminasica SECONDARIA (TGasi-simile) della parete fungina, nota per contenere tale attività necessaria alla sintesi della parete stessa. L'attività TG-asi è, inoltre, ulteriormente potenziata dall'utilizzo di PAPAINA, complesso enzimatico attivo presente nel succo fresco di papaya (Carica papaya) ed additivo alimentare già autorizzato (E1101, esaltatore di sapidità). Questo sfruttando la conoscenza che nel range operativo di pH, la papaina si comporta essa stessa da TG-asi, convertendosi da regolare proteasi a transamidasi.

Tale innovazione permetterà di ridurre drasticamente i costi di produzione degli alimenti per celiaci e ridurre la complessità del processo produttivo dovuto alla scarsa lavorabilità, ottenendo così prodotti in tutto e per tutto identici a quelli standard, ma con glutine non patogeno.

Giuseppe Brusca

Piero Pagan

RAZIONALE DEL PROGETTO E DESCRIZIONE DETTAGLIATA:

Il razionale del progetto è effettivamente nato dall'esigenza, per conto terzi, di migliorare le caratteristiche tecnologiche degli impasti di alimenti per celiaci a base di farine prive del glutine essenziale alla formazione del reticolo che si forma negli impasti regolari. Si è deciso così di utilizzare la TG-asi, come diffusamente appreso dalla letteratura scientifica passata e corrente, per migliorare le caratteristiche reologiche degli impasti e migliorare la lavorabilità degli stessi all'interno di un processo di lavorazione industriale.

In seguito all'apprendimento dei meccanismi fisiologici di reazione immunitaria al glutine, si è constatato che il meccanismo antigenico che si sviluppa all'interno dei villi intestinali, altro non è che un'alterata risposta dei linfociti T al complesso TGasi - glutine (TG-asi tissutale presente nei villi intestinali e glutine esogeno introdotto con la dieta). Gli Autori hanno deciso di spingersi oltre e si sono chiesti se fosse stato possibile far avvenire la reazione di coniugazione della transglutaminasi intestinale col glutine al di fuori dell'apparato digerente. E così è stato.

A questo punto, l'idea del progetto che ha portato alle prime sperimentazioni, è stata molto semplice: disponendo di una TGasi di origine esogena (batterica), bisognava far avvenire la reazione tra glutine dell'alimento farinaceo e la TG-asi batterica, in modo tale che si potesse formare il complesso antigenicamente determinante. In seguito all'ingestione, il complesso, sarebbe andato incontro a proteolisi, prima gastrica e poi intestinale, suddividendosi in sub-unità più piccole che, comunque, non sarebbero state antigenicamente determinanti ed avrebbero evitato la formazione del complesso TG-asi tissutale - glutine a livello dei villi intestinali. Il tutto inoltre, secondo l'idea degli Autori, era da rendere economicamente conveniente e da realizzare con materiali possibilmente già inseriti nelle liste positive del Ministero della Salute e, comunque, testate ed autorizzate dall'EFSA.

Giuseppe Amico

Paolo Pley

Come cofattore di reazione della TG-asi nell'impasto, poiché al fine del meccanismo di chelazione essa necessita di lisina, gli Autori hanno scelto di non avvalersi di componenti di sintesi, bensì di ingredienti naturali. La scelta è ricaduta su una fonte di lisina coincidente con uno dei componenti del pane stesso: il **lievito di birra**.

Grazie principalmente alla formazione professionale e culturale degli Autori, è stato realizzato poco tempo dopo che anche il lievito di birra è una eccellente fonte di lisina proteica: non soltanto nel citosol in generale, ma anche molte proteine ribosomiali e nucleari (soprattutto gli istoni) hanno una sequenza amminoacidica ricca di amminoacidi basici, inclusa la lisina. Ma sotto forma di lievito integro e vivente, tale lisina non poteva essere utilizzata.

Per ottenere la lisina proteica necessaria come cofattore enzimatico, gli Autori hanno sottoposto a sonicazione del normale lievito di birra (*S. cerevisiae*) con frequenze di 26 KHz per 5 minuti, al fine di liberare l'intero contenuto cellulare, sia citosolico che nucleare. La sonicazione è avvenuta a basse temperature (+4°C) per impedire l'attivazione delle proteasi endogene del lievito e, quindi, la degradazione delle proteine cellulari. Gli Autori hanno preparato alcune decine di tubi Falcon da 50ml contenenti lisato grezzo o soprannatante derivato per centrifugazione del primo, che sono stati tenuti in ghiaccio per tutta la durata della preparazione e successivamente riposti a -20 °C (freezer).

Inoltre, in alcune prove libere il lisato è stato trattato con succo fresco di papaya che, indipendentemente dalla presenza del complesso papainico, possiede delle beta-glucanasi e delle chitinasi. Per degradazione dei beta-glucani e della chitina della parete cellulare fungina, tale trattamento può amplificare la liberazione della proteina TGasi-simile (N-glicanasi o PNG-asi) dalla parete cellulare, senza dimenticare che alle normali condizioni di lavorazione (pH da 5.7 a 7.5) la **papaina stessa esprime attività trans-amidasica** agevolando il raggiungimento dello scopo sperimentale.

Gianfrancesco Conneri

Paolo Paoletti

I risultati dei saggi ELISA quantitativi (basati su metodica MA 102 Ed. 1 Rev. 02011) delle due panificazioni e dell'unica pastificazione sperimentali eseguiti dagli Autori sono stati nell'ordine, e dopo aver affinato le specifiche di processo:

- 1^ panificazione: 41.7 ppm
- 2^ panificazione: 20.9 ppm
- Pastificazione: 78.8 ppm

Gli Autori, nel corso delle loro prove sperimentali sono venuti al corrente della sperimentazione condotta dal CNR di Avellino ad opera del gruppo del Prof. Mauro Rossi che, in via sperimentale, ha testato con successo un processo di lavorazione di prodotti amidacei standard con l'ausilio della TG-asi, in effetti simile al proprio. Le principali differenze riscontrate dagli Autori tra il processo ideato dal CNR e le proprie del presente sono le seguenti:

- l'equipe CNR ha effettuato le prove utilizzando il processo di transamidazione nelle farine e, successivamente, effettuando la lavorazione per l'ottenimento dei prodotti finiti, mentre gli Autori hanno realizzato un trattamento *in-line*, quindi **durante l'impasto** e le normali fasi di produzione standard;
- l'equipe CNR ha utilizzato come coadiuvante dell'azione enzimatica della TG-asi la K-Me (Lisina metil-estere), prodotto di sintesi, costoso, i cui effetti sulla salute del consumatore non sono testati e dimostrabili. Gli Autori hanno, per contro, utilizzato un prodotto della **lisi cellulare del lievito**, normalmente utilizzato nei processi di panificazione senza l'utilizzo di K-Me, peptidi sintetici o idrolizzati proteici di vario tipo appositamente elaborati;
- gli Autori hanno sfruttato, oltre alla TGasi batterica anche la **papaina** (ottenuta dal succo di papaya fresco), la quale, non solo è servita a potenziare la lisi cellulare delle cellule di *S. cerevisiae* ma anche, alle condizioni di lavorazione, ad attivare l'attività trans-amidasica della

Giuseppe Rossi

Mauro Rossi

papaina stessa. Come ricordato precedentemente, fra valori di pH di 5.7 e 7.5 (valori del tutto normali durante la fase di lievitazione degli impasti, per esempio, del pane) la papaina esprime attività trans-amidasica.

Si sottolinea sin da qui che **non è mai stata intenzione degli Autori** sfruttare l'impiego della TG-asi come agente di miglioramento della reologia degli impasti, come dichiarato in quasi tutte le pubblicazioni ed i brevetti riscontrabili in letteratura, ma di utilizzare la TG-asi, la papaina ed il lisato di lievito con il solo fine di intrappolare il glutine in una "network" molecolare antigenicamente inerte. In seguito a digestione proteolitica, il glutine covalentemente modificato sarebbe stato regolarmente degradato, privandolo però delle sequenze antigenicamente attive necessarie ad innescare i meccanismi chiave-serratura tipici delle reazioni immunitarie che conducono alla comparsa della celiachia.

Come effetto secondario, inoltre, si è avuto il netto miglioramento delle caratteristiche reologiche dell'impasto e, conseguentemente, del prodotto finito che è risultato essere simile ad un prodotto standard, come, del resto, ci si aspettava, essendo noto l'effetto migliorativo già dalla letteratura.

Giuseppe Amaro

Paolo Paoletti

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI: di seguito la descrizione dei diagrammi di flusso esplicativi del processo di produzione nelle rispettive varianti.

FIGURA 1. Nella figura 1 è possibile vedere come all'impasto tradizionale di acqua, farina, lievito e sale, si aggiunga l'enzima TG-asi ed il surnatante di un lisato preconstituito di *S. cerevisiae*, costituendo un primo impasto da far riposare per 10' a temperatura ambiente.

Il lisato è stato ottenuto per azione degli ultrasuoni su regolare lievito in acqua distillata (al fine di potenziare l'effetto di lisi ultrasonica mediante effetto osmotico) immerso in una recipiente con acqua e ghiaccio (con funzione di raffreddamento del mezzo) e trattato per 5 minuti con frequenze ultrasoniche di 26 KHz. Il lisato darà l'apporto necessario di lisina proteica perché la TG-asi catalizzi il mascheramento dei siti antigenici del glutine. Da questo punto in poi, il processo di lavorazione procede come in una normale panificazione, restituendo, però, un prodotto finito senza glutine attivo e patogeno.

Sono stati centrifugati alcuni tubi da 50ml per ottenere un centrifugato (pellet) costituito dalle pareti cellulari inerti ed il sopranatante ricco del contenuto cellulare o citosolico. Per i processi di panificazione, sono stati impiegati sia lisati grezzi che centrifugati, ottenendo praticamente risultati sovrapponibili. Sono stati eseguiti saggi ELISA quantitativi per la rilevazione di glutine attivo, di cui i risultati sono in possesso degli Autori ed allegati in copia al presente documento.

FIGURA 2. Nella figura 2 è illustrata una variante del processo produttivo che prevede l'utilizzo, in sostituzione degli ultrasuoni, di un omogeneizzatore meccanico a pistone che ha il doppio compito di 1) liberare la lisina utile alla reazione enzimatica, 2) fornire la componente di parete ad attività transglutaminasica, in sostituzione o in aggiunta parziale della quota di transglutaminasi esterna stessa. Anche questa volta la lavorazione avviene in

Giovanese Emma

Caro Carlo

ghiaccio, si per evitare la denaturazione delle proteine che l'attivazione delle proteasi endogene che possono degradare le proteine cellulari.

Il trattamento del sopranatante con papaina (succo di papaya fresco o papaina purificata) può essere considerato alternativo; ha comunque il compito di degradare le pareti cellulari fungine ed idrolizzare eventualmente le proteine, rendendole più facilmente disponibili alla reazione della TG-asi contenuta, invece, nel sedimento. Da questo punto in poi, il processo di lavorazione procede come in una normale panificazione, restituendo, però, un prodotto finito senza glutine attivo e patogeno.

FIGURA 3. a) un tubo Falcon da 50ml contenente lisato grezzo di lievito di birra, ottenuto per sonicazione di panetti di lievito disciolti in acqua distillata. b) Un tubo Falcon da 50ml contenente sopranatante ottenuto dagli Autori per centrifugazione del lisato grezzo in una centrifuga refrigerata da laboratorio.

FIGURA 4. Saggio ELISA quantitativo relativo alla prima prova di panificazione sperimentale eseguita dagli Autori in data 8 luglio 2013. Notare il valore rilevato di 41.7 parti per milione, valore che è altamente significativo se si considera che gli Autori hanno usufruito di mezzi molto semplici per i loro esperimenti, avendoli condotti in un regolare laboratorio di panificazione cittadino.

FIGURA 5. Saggio ELISA quantitativo relativo alla seconda prova di panificazione sperimentale eseguita dagli Autori in data 22 Agosto 2013. Notare il valore rilevato di 20.9 parti per milione, ottenuto per miglioramento di specifici passaggi condotti durante la panificazione (ottimizzazione degli impasti e dei tempi di reazione).

FIGURA 6. Saggio ELISA quantitativo relativo alla prova di pastificazione sperimentale eseguita dagli Autori in data 10 Dicembre 2013. Il valore ottenuto di 78.8 ppm è ritenuto dagli Autori notevolmente migliorabile, dato che diversi parametri delle condizioni sperimentali non sono stati giudicati soddisfacenti durante la pastificazione.

Giuseppe Bmer

Paolo Ples

ANALISI DEL RISULTATO RAGGIUNTO:

Riguardo alla produzione di sfarinati usando la TG-asi come coadiuvante tecnologico, agli Autori preme sottolineare alcuni punti essenziali di distinzione del proprio lavoro:

- 1) Alcuni dei gruppi di ricerca hanno dichiarato di aver prodotto i suddetti attraverso una lavorazione preliminare delle farine, che sono in seguito state utilizzate per la preparazione di un impasto; gli Autori del presente hanno invece lavorato *ab initio* su un impasto regolare, senza alcun pretrattamento della farina.
- 2) **Altri Autori** (Mazzarella G. et al. 2012) hanno utilizzato lisina metil-estere (K-Me), suoi derivati alchilici o altre ammine primarie come agenti coniuganti dei residui glutamminici del glutine; gli Autori hanno invece riscoperto la funzione del lievito come agente mascherante dell'antigenicità del glutine, attraverso una sua **lavorazione non precedentemente riconosciuta** nei regolari processi di panificazione.
- 3) E' vero che molti Autori di brevetti hanno usato derivati peptidici della lisina, o lisati di proteine di vario genere, come complemento adiuvante dell'azione della TG-asi. **Non è stato mai accennato**, tuttavia, all'uso dello stesso lievito di birra come lisato cellulare.
- 4) In tal caso il lisato è stato preparato, con speciale accorgimento, preliminarmente alla panificazione e tenuto in congelamento (-20°C) fino al suo immediato impiego come ingrediente dell'impasto. E' poco probabile che tale metodica di preservazione sia stata in grado di provocare una estesa proteolisi da parte delle proteasi endogene del lievito, per cui il ritrovato degli Autori può essere classificato come **lisato biologico non-vivente** e non lisato proteico (prodotto dalla proteolisi).

Giovancares Amos

Alvaro

Per primo punto, una innovazione consiste nell'utilizzo di un nuovo metodo di lavorazione che sfrutta una componente già presente nell'alimento originale (sfarinato) che è il **lievito di birra**. L'innovazione è bivalente e consiste:

a) nello sfruttare la potenzialità biologica del lievito stesso come mascherante antigenico del glutine; **b)** sfruttare in natura (*ad iuvandum* da origine batterica) la frazione enzimatica TGasi-simile della parete cellulare fungina. Tutto ciò in modo e con ingredienti assolutamente naturali, al contrario degli altri gruppi di ricerca che, sì, sono arrivati ad intuire il funzionamento dell'enzima in questo senso, ma ricorrendo a sostanze additive di sintesi industriale (lisil-derivati o ammine primarie), quindi, molto più costose. Nel processo industriale, l'unica modifica da effettuare sul processo di lavorazione stesso è l'aggiunta di un generatore di ultrasuoni, di un omogeneizzatore ed un contenitore con del ghiaccio. La centrifuga si può contemplare se invece di un lisato grezzo (pareti cellulari + contenuto citosolico), si sceglie di inserire il solo soprannatante ed escludere il sedimento.

Secondo punto, a conoscenza degli Autori del presente lavoro l'aggiunta della TG-asi è stata sempre dichiarata di coadiuvante tecnologico, per migliorare la reologia degli impasti e la tenacità e la compattezza del prodotto finale, specie in impasti contenenti farine deglutinate o derivate da altre specie vegetali. E' dichiarato dagli Autori all'interno del presente lavoro, invece, che la TG-asi serve da catalizzatore affinché le proteine ricche di lisina del lisato di lievito possano mascherare covalentemente le gliadine e le glutenine del glutine. L'obiettivo dichiarato degli Autori, non è stato mai quello di migliorare la reologia dell'impasto o la "texture" del prodotto finito, ma quello di **mascherare i siti antigenici del glutine senza modificare gli ingredienti naturali usati per la panificazione**, ovvero, quello di produrre alimenti farinacei **SENZA GLUTINE PER CELIACI**.

Giuseppe Comas

Paolo

C'è una ultima componente importante da considerare come implementante del processo di produzione. Il metodo presentato dagli Autori vanifica gli espedienti di allestire sezioni particolari ed isolate negli impianti per la lavorazione delle farine o degli impasti, poiché eventuali contaminazioni di un impasto finito vengono neutralizzate dall'enzima durante la fase di lievitazione prima della cottura. L'unica riserva viene fatta nei passaggi post-cottura, per i quali si deve riservare un'area protetta.

L'utilizzo di questa innovazione porterà perciò alla produzione di alimenti standard sotto tutti i punti di vista, tranne che per il contenuto in glutine che pur essendo presente per intero non risulta antigenicamente patogeno. Il tutto con costi pari ad almeno 1/10 di quelli sostenuti per la produzione di alimenti per celiaci con i metodi e le materie prime standard.

31/07/2014

FIRMA

Dr Danilo Ciciulla

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Danilo Ciciulla', written in a cursive style.

Dr. Gianfrancesco Cormaci

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gianfrancesco Cormaci', written in a cursive style.

RIVENDICAZIONI DELL'INVENZIONE

1 - Un prodotto da forno e -non, a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non, che è stato ottenuto per transamidazione degli impasti effettuata, ad opera dell'enzima TG-asi durante una delle qualsiasi fasi del processo produttivo, senza pretrattamento delle farine, al fine di rendere il glutine dell'impasto antigenicamente inerte.

2 - Un prodotto da forno e -non a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non che, in accordo alla rivendicazione 1, abbia come intermedi di mascheramento antigenico del glutine prodotti o sottoprodotti a base di lisato grezzo (o del soprannatante) ottenuto per trattamenti di tipo chimico, fisico, chimico-fisico e biologico dei seguenti microorganismi: Saccharomyces spp.; Schizosaccharomyces spp.; Saccharomycopsis spp.; Lactobacillus spp.; Leuconostoc spp.; Pediococcus spp.; Bifidobacterium spp.; Ruminococcus spp.; Selenomonas spp.; Glucobacter spp.; Chlamydomonas spp.; Chlorella spp.; Chlorobium spp.; Chlorococcum spp.; Spirulina spp.; Volvox spp.; Spyrogyra spp.; Cytophaga spp.; Rhodobacter spp.; Rhodopseudomonas spp.; Rhodospirillum spp.; Rhodomicrobium spp.; Desulfovibrium spp.; Flavobacterium spp.; Desulfuromonas spp.; Thiobacillus spp.; Paracoccus spp.; Sorangium spp.; Rhizobium spp.; Agrobacterium spp.

3 - Un prodotto da forno e -non, a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non che, in accordo alle rivendicazioni 1-2, contenga come coadiuvanti tecnologici e/o co-ingredienti:

- a) transglutaminasi (TG-asi) di origine batterica;
- b) papaina come enzima ricombinante;
- c) papaina come costituente di succo fresco di papaya (Carica papaya);
- d) papaina sottoforma di enzima purificato e cristallizzato;

Giuseppe Amato

Alto

e) transglutaminasi (PNG-asi) ottenuta dalla frazione di parete cellulare di microorganismi appartenenti e/o coincidenti alle seguenti specie: Saccharomyces spp., Schizosaccharomyces spp., Saccharomycopsis spp., Pichia spp., Monilia spp., Candida spp., Hansenula spp., Torula spp., Kloeckera spp., Cryptococcus spp., Trichosporon spp., Galactomyces spp., Geotrichum spp.; Chlamydomonas spp., Chlorella spp., Chlorococcum spp., Chlorobium spp.; Spirulina spp.; Volvox spp.; Spyrogyra spp.

f) fonti naturali di lisina proteica e non- sottoforma di estratto, omogenato o lisato, originato per azione di agenti chimici, fisici, chimico-fisici e biologici su microorganismi appartenenti a tutti i ceppi non-patogeni delle specie citate nelle rivendicazioni 2 e 3.

4 - Un prodotto da forno e -non, a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non che, in accordo alle rivendicazioni 1-3, sfrutti come agente mascherante del glutine la Nisina, additivo alimentare approvato con la sigla E234; o che contenga estratti, prodotti con ceppi non patogeni, delle seguenti specie batteriche: Streptococcus spp.; Staphylococcus spp.; Ruminococcus spp; Bacillus spp.; Carnobacterium spp., Halobacterium spp.; Actinoplanes spp; Kluyveromyces spp.; Leuconostoc spp. e Lactobacillus spp.

5 - Un prodotto da forno e -non a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non che, in accordo alle rivendicazioni 1-4:

1) sia stato ottenuto utilizzando la frazione centrifugata di lisati ottenuti per omogenizzazione meccanica a freddo o con altri agenti chimici, fisici e biologici non denaturanti, di specie non-patogene come quelle elencate nella rivendicazione 4, contenenti nelle suddette frazioni attività transglutaminasica (PNG-asi) biologicamente attiva e -non, o similare;

2) possa sfruttare la riattivazione della attività PNG-asi presente nella parete cellulare attraverso l'aggiunta nei lisati di opportuni agenti riducenti non tossici,

Giuseppe Coma

Cleo

già approvati dalla normativa comunitaria e/o internazionale vigente ed elencati come segue: E200 (acido sorbico), E210 (acido benzoico), E223 (sodio metabisolfito), E224 (potassio metabisolfito), E225 (calcio metabisolfito), E300 (acido ascorbico), E330 (acido citrico), E334 (acido tartarico), E910 (L-cisteina), E920 (L-cisteina cloridrato) ed E921 (L-cisteina cloridrato monoidrato).

6 - Un prodotto da forno e -non, a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non che, in accordo alle rivendicazioni 1-5, usufruisca della liberazione dell'attività PNG-asiatica presente nella parete cellulare (come frazione centrifugata) delle seguenti specie di microorganismi: Saccharomyces spp., Schizosaccharomyces spp., Saccharomycopsis spp.; Torula spp., Torulopsis spp., Kloeckera spp., Pichia spp., Monilia spp., Hansenula spp., Cryptococcus spp., Candida spp., Trichosporon spp., Galactomyces spp., Geotrichum spp.; Chlamydomonas spp., Chlorella spp., Chlorococcum spp., Chlorobium spp., attraverso previa degradazione dei loro polisaccaridi delle pareti cellulari con l'impiego di succo fresco di papaya, noto per contenere gli enzimi 1,3-beta-glucanasi e chitinasi di classe II e III.

7 - Un prodotto da forno e -non, a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non che, in accordo alle rivendicazioni 1-6:

- a) possa sfruttare la capacità transamidasi dell'enzima papaina purificato e cristallizzato come enzima singolo aggiunto all'impasto, attraverso la variazione del pH del mezzo di transamidazione nel range di valori compreso tra 5.7 e 7.5;
- b) possa sfruttare la capacità transamidasi dell'enzima papaina come enzima ricombinante aggiunto all'impasto, attraverso la variazione del pH del mezzo di transamidazione nel range di valori compreso tra 5.7 e 7.5.

Giuseppe Amico

Alcino

8 - Un prodotto da forno e -non, a base di farina di grano ed altri cereali con glutine e non che, in accordo alla rivendicazioni 1-7, sia consumabile da soggetti affetti da celiachia clinicamente manifesta o qualsiasi altra forma di intolleranza al glutine, senza la comparsa di effetti collaterali e/o secondari di chiaro significato patologico.

31/07/2014

FIRMA

Dott. Danilo Ciciulla



Dott. Gianfrancesco Cormaci


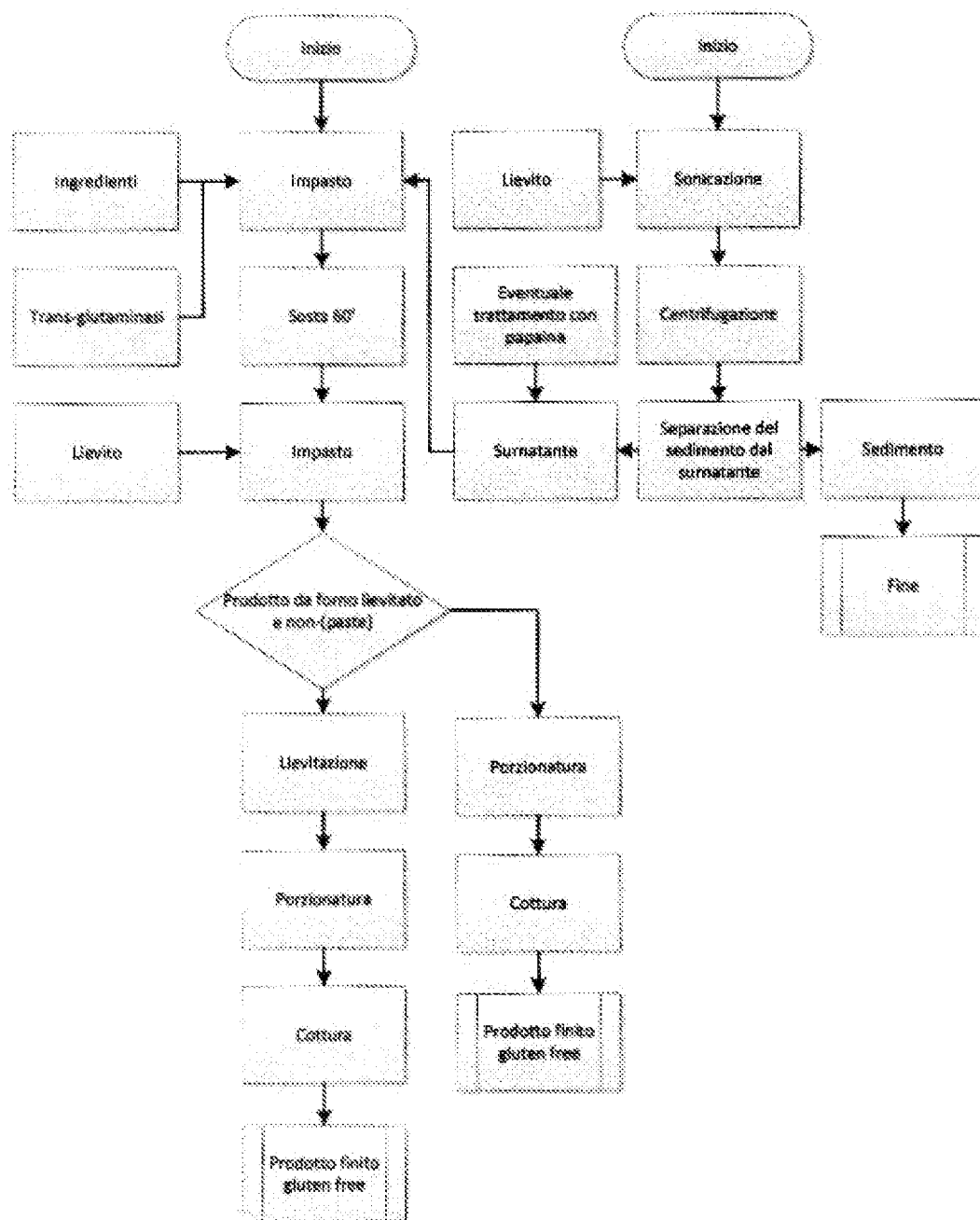


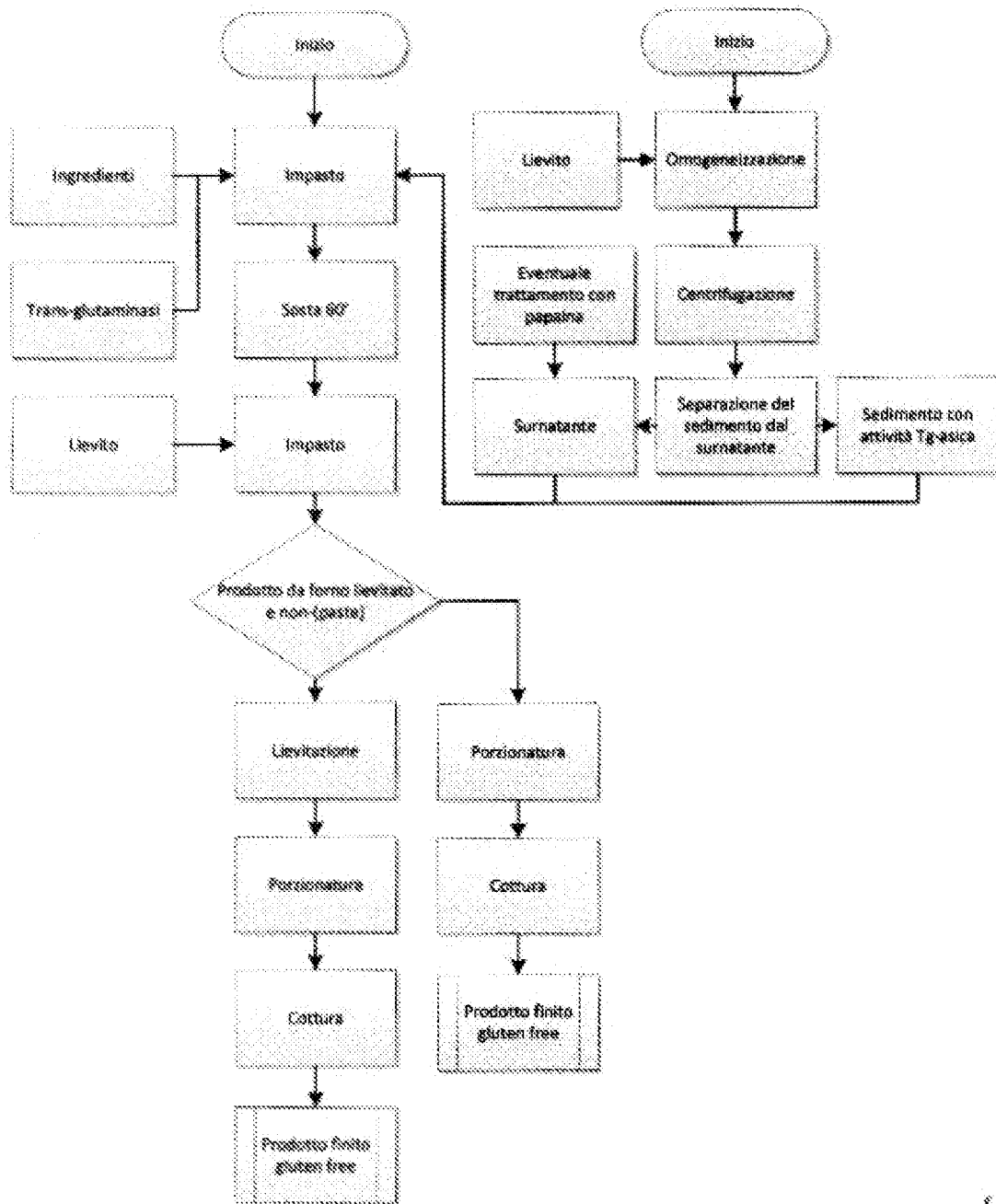
Figura 1



Gianfrancesco Conza

Carlo Pley

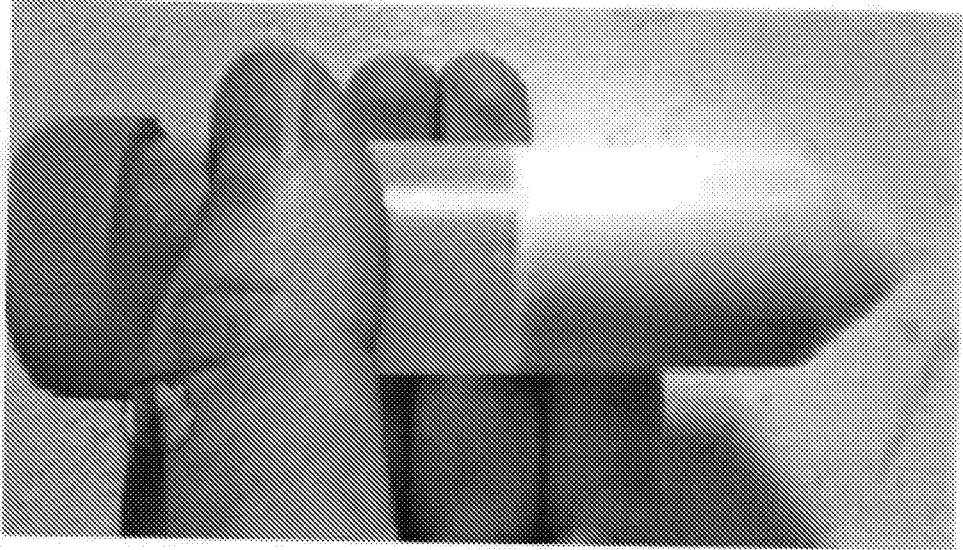
Figura 2



Giuseppe Comaro

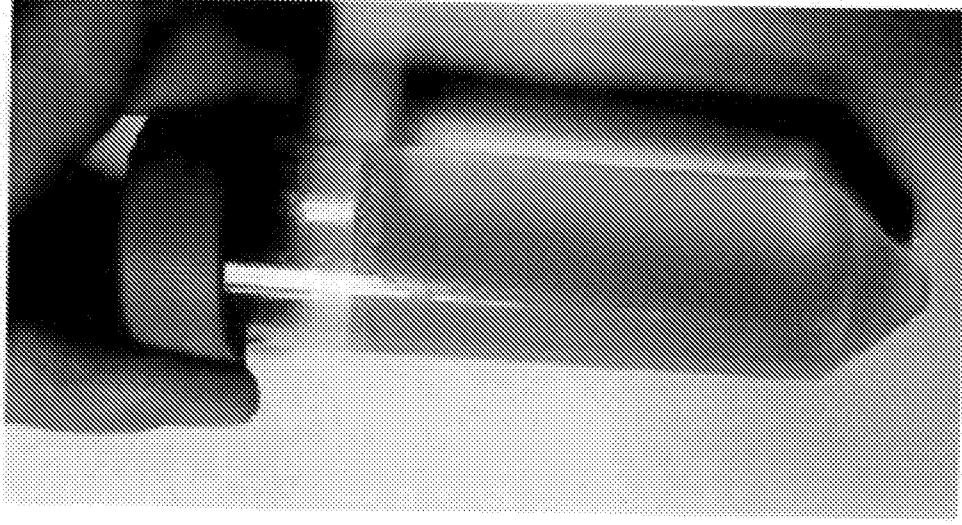
Clara Pley

Figura N. 3



lisato grezzo di lievito

Massi



sopranatante

Gianfrancesco Lanza