



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0923646-5 B1



(22) Data do Depósito: 17/12/2009

(45) Data de Concessão: 03/09/2019

(54) Título: MISTURA, USO DA MISTURA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MASSA DE FARINHA LÍQUIDA, MASSA DE FARINHA LÍQUIDA OU SECA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRODUTOS ASSADOS FERMENTADOS E PRODUTO ASSADO.

(51) Int.Cl.: A21D 8/04; A21D 13/06; C12N 1/20; C12R 1/225; C12R 1/25.

(30) Prioridade Unionista: 23/12/2008 IT RM2008A000690.

(73) Titular(es): GIULIANI S.P.A.

(72) Inventor(es): GIAMMARIA GIULIANI; ANNA BENEDUSI; RAFFAELLA DI CAGNO; CARLO GIUSEPPE RIZZELLO; MARIA DE ANGELIS; MARCO GOBBETTI; ANGELA CASSONE.

(86) Pedido PCT: PCT IT2009000569 de 17/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/073283 de 01/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/06/2011

(57) Resumo: MISTURA, USO DA MISTURA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MASSA DE FARINHA LÍQUIDA, MASSA DE FARINHA LÍQUIDA OU SECA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRODUTOS ASSADOS FERMENTADOS E PRODUTO ASSADO A presente invenção refere-se ao uso de bactérias ácido lácticas selecionadas e enzimas fúngicas para a degradação completa do glúten de farinha de trigo comum e duro, cevada, centeio e aveia. Em particular, a invenção refere-se ao uso de bactérias ácido lácticas selecionadas e enzimas fúngicas para a degradação completa do glúten (concentração residual de glúten menor do que 20 ppm) de farinhas de cereais que, depois da destoxificação, podem ser usadas de acordo com um protocolo biotecnológico padronizado para a produção de vários alimentos sem glúten.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “MISTURA, USO DA MISTURA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MASSA DE FARINHA LÍQUIDA, MASSA DE FARINHA LÍQUIDA OU SECA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PRODUTOS ASSADOS FERMENTADOS E PRODUTO ASSADO”

[001] A presente invenção refere-se à biotecnologia microbiana para degradar completamente o glúten em farinhas. Particularmente, o processo, de acordo com a invenção, envolve o uso de bactérias lácticas selecionadas e proteases fúngicas usadas rotineiramente para a fabricação de produtos assados fermentados, sob condições de fermentação líquida para a degradação completa do glúten (concentração residual de glúten menor do que 20 ppm). Farinhas de cereais que resultam do processo de fermentação podem ser usadas como matéria-prima para a produção de alimentos sem glúten destinados a serem ingeridos por pacientes celíacos. O processo biotecnológico proposto resulta em várias vantagens econômicas, sociais, nutricionais e sensoriais, comparado com o processo de produção atual de alimentos sem glúten ou como resultado dos processos de extração.

[002] A epidemiologia da intolerância ao glúten ou doença celíaca está crescendo continuamente. As últimas pesquisas a cerca da população da Europa e dos Estados Unidos relatam uma incidência de 1/100 indivíduos afetados (Rewersm 2005. Epidemiology of celiac disease; what are the prevalence, incidence and progression of celiac disease. *Gastroenterology* 128:47-51). De acordo com o conhecimento atual, o único remédio terapêutico atual contra essa intolerância alimentar é uma dieta completamente livre de glúten a ser rigorosamente observada por toda a vida (Hamer, 2005. Celiac Disease: Background and biochemical aspects. *Biotechnol Advanc.* 23:401-408). É conhecido, por exemplo, o uso de bactérias lácticas para a preparação de alimentos assados a partir de farinhas sem glúten (More *et al.* Cereal

Chemistry, American Association of Cereal Chemists. Minneapolis, US, vol. 84, no. 4, 1 January 2007, pp. 357-364 e Moore *et al.*, European Food Research and Technology, vol. 226, 6 June 2007, pp. 1309-1316). Entretanto, a dieta sem glúten resulta também em desvantagens aparentes. Os produtos sem glúten são muito caros quando comparados com produtos baseados em cereal, apresentam menor qualidade sensorial e de armazenamento, a dieta é difícil de ser estritamente observada e necessita ser continuamente monitorizada por nutricionistas, levando também em consideração os desequilíbrios nutricionais (por exemplo, fibras, minerais e vitaminas) que resultam da ausência completa de cereais na alimentação (Grehn *et al.*, 2001. Dietary habits of Swedish adult coeliac patients treated by a gluten-free diet for 10 years. *Scand J Nutr* 45: 178-182; Mariani *et al.*, 1998. The gluten-free diet: a nutritional risk factor for adolescents with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27: 519-523; Thompson *et al.*, 2005. Gluten-free diet survey: are Americans with celiac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? *J. Human. Nutr. Diet.* 18:163-169). Além disso, em alguns casos (por exemplo, "espru refratário"), a observância completa da dieta sem glúten também não possibilita a recuperação completa da funcionalidade intestinal (Sollid and Khosla, 2004. Future therapeutic options for celiac disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 2:140-147). Tratamentos terapêuticos alternativos dentro da dieta sem glúten tiram vantagem de vários estudos do conhecimento atual de sequências de epítomos tóxicos que consideram o uso da enzima microbiana, particularmente de prolil-endopeptidases (PEPs), para a hidrólise desses polipeptídeos. As enzimas microbianas têm sido sugeridas como suplementos dietéticos (Shan *et al.*, 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl-endopeptidases: implications for celiac sprue. *Biochem. J.* 383:311-318) e/ou para a detoxificação do glúten *in vitro* (Chen *et al.*,

2003. Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PePO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1276-1282; Stepniak *et al.*, 2005. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl-endoprotease: implications for celiac disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G621-G629).

[003] O pedido de patente WO2008/010251 e Cagno *et al.* (Journal of Food Protection, vol. 71, no. 7, 2008, pp.1491-1495) descrevem um processo para a preparação de assados fermentados a partir de farinhas sem glúten e visam aperfeiçoar as características nutricionais, sensoriais e de armazenamento desses produtos preparados a partir de ingredientes sem glúten.

[004] Durante as últimas décadas, a biotecnologia de assados fermentados também mudou consideravelmente, influenciando os hábitos nutricionais de populações inteiras previamente submetidas a uma dieta com base no glúten. Atualmente, os produtos assados fermentados são fabricados por meio de processos tecnológicos extremamente rápidos (por exemplo, agentes de fermentação química ou uso de fermento), substituindo completamente os longos processos de fermentação que usam bactérias de ácido láctico de tipo selvagem e fermentos originadas de matérias-primas e usadas como "massas ácidas". Por meio dos processos atuais, os componentes dos cereais (por exemplo, as proteínas) não são submetidos a qualquer atividade hidrolítica durante o processamento alimentício, mantendo as características da matéria-prima (Gobbetti, 1998. The sourdough microflora: interactions between lactic bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Technol.* 9:267-274). Com base nessas considerações e tomando como vantagem as potencialidades das enzimas de uma mistura de bactérias lácticas selecionadas, vários estudos (Di Cagno *et al.*, 2002. proteolysis by sourdough lactic bacteria: effects on wheat flour protein fractions and

gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:623-633; Di Cagno *et al.*, 2004. Sourdough bread made from wheat and non toxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1088-1096; Di Cagno *et al.*, 2005. Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *J. Agr. Food Chem.* 53:4393-4402; De Angelis *et al.*, 2005. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochim. Biophys. Acta.* 1762:80-93) demonstraram que usando uma biotecnologia tradicional, baseada no uso de bactérias lácticas selecionadas e em longos períodos de fermentação, é possível reduzir acentuadamente a concentração inicial de glúten do cereal.

[005] O Codex Alimentarius, adotado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) e FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), distingue "produtos sem glúten", que contêm ingredientes com concentrações de glúten menores do que 20 ppm e "produtos feitos sem glúten", que possuem uma concentração residual de glúten menor do que 200 ppm. Entretanto, vários estudos que culminaram nas diretrizes como publicadas pelo "Prolamins Working Group", sugeriram, em qualquer caso, um limiar de glúten a ser mantido menor do que 20 ppm (Stern *et al.*, 2001. Analysis and clinical effects of gluten in celiac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:741-747). Um estudo recente de Rizzello *et al.*, (Rizzello *et al.*, 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4499-4507) considerou o uso de uma mistura mais complexa consistindo em 10 bactérias ácido lácticas selecionadas, proteases de fungos e tempos de fermentação longos (48 h a 37°C), sob condições de amassamento semilíquidas. De acordo com

as análises eletroforética, cromatográfica e imunológica, o glúten contido na farinha de trigo foi degradado para uma concentração menor do que o limite de 20 ppm.

[006] Adicionalmente, sabe-se pelo Pedido de Patente WO2006/0097415 que, analogamente ao estudo acima mencionado, é descrito um processo para a degradação do glúten por meio do uso de uma mistura complexa que consiste em pelo menos seis bactérias ácido lácticas e/ou em bifidobactérias e em longos tempos de fermentação (24 a 31 horas). Entretanto, o método descrito nesse documento não é adequado a fim de degradar completamente o glúten; portanto, ele resulta na impossibilidade de administração a pacientes celíacos. A figura 1B do Pedido de Patente WO2006/0097415, de fato, mostra que, depois da hidrólise por meio dos micro-organismos, ainda há pontos claros de gliadinas não degradadas e isso é confirmado na tabela 2, novamente a partir do mesmo documento, a partir do qual é aparente que, enquanto algumas gliadinas são parcialmente hidrolisadas, outras não são sensíveis ao processo de hidrólise.

[007] Baseado na literatura e nos dados anteriormente descritos, alguns problemas parecem ser de maior interesse na fabricação de alimentos sem glúten a partir de farinha de cereal desintoxicada: (i) simplificar a composição das bactérias lácticas selecionadas a serem usadas para o processo de degradação; (ii) reduzir consideravelmente os tempos de fermentação tornando-os adequados a serem usados em processos industriais; (iii) demonstrar a habilidade das bactérias ácido lácticas e das enzimas de fungos a fim de atuar eficazmente sobre as farinhas de trigo comum e duro que pertençam a variedades diferentes e sobre cevada, centeio e aveia; (iv) fornecer um processo biotecnológico para a hidrólise do glúten que forneça farinhas de cereal desintoxicadas a serem usadas na produção de produtos sem glúten; e (v) demonstrar, por meio de testes médicos crônicos *in vivo*, a

tolerância absoluta por pacientes celíacos depois da administração prolongada de produtos sem glúten baseados na farinha de trigo desintoxicada.

[008] A vista do acima mencionado, é aparente, portanto, a necessidade de fornecer materiais e métodos para a preparação de produtos assados sem glúten feitos com a farinha de cereal desintoxicada que não exiba, por um lado, as desvantagens econômicas, sociais, nutricionais e sensoriais vistas nos dados da literatura e, por outro lado, as desvantagens dos produtos sem glúten atualmente comercialmente disponíveis.

[009] Os autores da presente invenção observaram que, usando apenas duas bactérias ácido lácticas selecionadas, em combinação com proteases fúngicas, os tempos de fermentação necessários para a degradação do glúten são acentuadamente diminuídos. Além disso, foi provada a habilidade das bactérias ácido lácticas e das proteases fúngicas na degradação completa do glúten de diferentes variedades de trigo comum e duro, de farinhas de cevada, centeio e aveia; foi fornecido um protocolo biotecnológico para a produção de vários produtos assados fermentados; e foi demonstrada a tolerância absoluta ao produto por pacientes celíacos, permitindo assim, em um caminho completamente inovador, o uso de farinha de trigo como um ingrediente para a fabricação de produtos assados fermentados sem glúten.

[0010] As bactérias ácido lácticas, de acordo com a presente invenção, pertencem ao gênero dos *Lactobacillus* e foram isoladas a partir de "massas ácidas" usadas para a fabricação de pães típicos do sul da Itália. *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12 (depositado como DSMZ N. DSM22063 em 28 de Novembro de 2008) e *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (depositado como DSMZ N. DSM22064 em 28 de Novembro de 2008).

[0011] Um protocolo biotecnológico que envolve o uso de bacté-

rias ácido lácticas selecionadas e proteases fúngicas em um processo de fermentação extremamente rápido (12 a 20 h, a 30-37°C) de farinhas de cereal ressuspensas em água a 20-50% em peso e seu uso sucessivo, em vários percentuais de acordo com as características desejadas, como um ingrediente para uma fermentação curta (cerca de 1 a 3 h), por meio de fermento de pão, para a produção de produtos assados fermentados sem glúten (teor residual de glúten menor do que 20 ppm), foi padronizado e otimizado.

[0012] É relatado abaixo um esboço do protocolo biotecnológico para a produção de produtos assados fermentados a partir de farinha de trigo sem glúten desintoxicada.

Cultivar, lavar e suspender em água
culturas de bactérias ácido lácticas



Misturar farinha de grãos (30%)
com água (70%) contendo duas bactérias ácido lácticas selecionadas
(densidade celular 10^8 cfu/g)
e proteases fúngicas (400 ppm cada)



Fermentar por 18 h, a 37°C



Misturar com milho nativo (10%),
farinha de arroz (10%), ovo (5%), açúcar (3%),
manteiga (1%) e fermento de pão (1,5%)



Fermentar por 1,5 h, a 30°C



Assar a 250°C, por 50 min

[0013] De acordo com uma das formulações possíveis, os produtos assados contendo 10 g equivalentes de glúten inicial, foram administrados a pacientes celíacos durante um período de 60 dias. Ensaio imunológico e histológico provaram a tolerância absoluta da preparação a partir de farinha sem glúten desintoxicada.

[0014] De acordo com análises complementares que usam técnicas eletroforéticas, cromatográficas e imunológicas, o processo de fermentação por meio de bactérias ácido lácticas selecionadas, não usadas em estudos prévios, e proteases fúngicas, de acordo com a presente invenção, permite: (i) destoxificação completa do glúten (teor residual de glúten menor do que 20 ppm); (ii) produção de farinha hidrolisada que consiste em uma mistura de peptídeos de baixo peso molecular e, especialmente, aminoácidos (cerca de 15.000 mg/kg com relação a < 1000 mg/kg na farinha de trigo), o que aumenta as características nutricionais com relação a produtos sem glúten convencionais; (iii) redução acentuada do tempo de processamento comparado com os dados relatados na literatura, tornando assim o dito processo adequado para a transformação em escala industrial; (iv) produção de produtos assados sem glúten com formulações com ingredientes diferentes que envolvem o uso de farinha de trigo desintoxicada em diferentes concentrações (20-50%); e (v) tolerância absoluta da preparação por pacientes celíacos depois da administração prolongada, de acordo com os dados médicos relatados pela primeira vez.

[0015] Os produtos obteníveis, de acordo com o processo da presente invenção, apresentam propriedades sensoriais, reológicas e químicas não oferecidas pelos produtos da técnica anterior (produtos sem glúten obtidos a partir de farinhas naturalmente sem glúten). Os

produtos, de acordo com a invenção, mantêm de fato as propriedades nutricionais das farinhas que contêm glúten, oferecendo assim características nutricionais melhores, comparadas com produtos obtidos a partir de farinhas sem glúten.

[0016] Além disso, os produtos, de acordo com a invenção, são completamente isentos de glúten como resultado do processo de degradação do glúten realizado pelas bactérias ácido lácticas inventivas, diferentemente de produtos obtidos usando bactérias ácido lácticas conhecidas (WO2006/097415, WO 2008/010252). As bactérias ácido lácticas, de acordo com o Pedido de Patente WO 2008/010252, foram usadas sob as mesmas condições das bactérias ácido lácticas, de acordo com a presente invenção e não foram adequadas para a degradação do glúten; de fato, o teor residual de glúten é da ordem de cerca de 6000-10.000 ppm (figura 5). Portanto, as ditas bactérias podem ser usadas apenas para a descontaminação de resíduos de glúten, mas elas não apresentam o mesmo desempenho das bactérias, de acordo com a presente invenção.

[0017] Com relação ao documento de Rizzello *et al.* (*Appl. Environ. Microbiol.* 73:4499-4507, 2007), a possibilidade de obter uma degradação completa do glúten ao longo de períodos de tempo acentuadamente curtos (18 h comparadas com 48 h) implica, inicialmente, em uma considerável vantagem tecnológica, tornando o processo de transformação comparável aos processos industriais mais frequentes e comuns para produtos assados. Um processo de fermentação muito longo (48 h), em adição ao aumento dos custos tecnológicos, poderá apresentar riscos higiênico-sanitários. Adicionalmente, um processo de degradação do glúten mais rápido resulta inevitavelmente na produção de uma matéria-prima (farinha com glúten completamente hidrolisado), caracterizado por um perfil diferente de aminoácidos livres e, portanto, adequado para resultar em características sensoriais diferentes de

produtos sem glúten, comparado com um processo mais longo caracterizado inevitavelmente por uma cinética enzimática diferente.

[0018] Portanto, é um objetivo específico da presente invenção uma mistura que compreende ou consiste em bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM 22064. A mistura pode compreender ainda enzimas fúngicas proteolíticas, como por exemplo, proteases de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ou misturas das mesmas.

[0019] É um objetivo adicional da presente invenção o uso de uma mistura, como definida acima, para a degradação completa do glúten na farinha de trigo comum e duro, nas farinhas de cevada, centeio e aveia.

[0020] A presente invenção refere-se ainda a um processo para a preparação de uma massa de farinha líquida com glúten completamente degradado, adequado para a produção de produtos sem glúten fermentados, compreendendo ou consistindo nas seguintes etapas:

a) propagar uma cultura das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM 22064;

b) misturar farinha em concentrações de 20 a 50%, preferivelmente 30%, e água em concentração de 50 a 80%, preferivelmente 70%, contendo a mistura das duas bactérias da etapa a) em uma densidade celular de cerca de 10^8 cfu/g;

c) adicionar uma ou mais proteases fúngicas, cada uma em uma concentração de 200 a 500 ppm, preferivelmente 400 ppm;

d) fermentar por 8 a 20 h, preferivelmente 12 h, a 30-37°C.

[0021] O processo pode compreender adicionalmente uma etapa e) de secar a massa líquida obtida na etapa d). Entre as farinhas adequadas para serem usadas nesse processo estão as farinhas de trigo trigo comum ou durum, as farinhas de cevada, centeio e aveia ou mis-

turas das mesmas, preferivelmente a farinha de trigo comum e duro.

[0022] As enzimas proteolíticas fúngicas podem ser selecionadas do grupo que consiste em proteases de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ou misturas das mesmas.

[0023] Portanto, a invenção também se refere a uma massa de farinha líquida ou seca, na qual o glúten está completamente degradado, de acordo com o processo definido acima.

[0024] É um objetivo adicional da presente invenção uma mistura que compreenda ou consista em uma massa, como definida acima, em combinação com uma ou mais farinhas naturalmente isentas de glúten, como por exemplo, aquelas selecionadas do grupo que consiste em farinhas de milho nativo, milho branco, arroz, quinoa, teff ou amaranto e trigo sarraceno. Particularmente, as farinhas acima mencionadas podem ser usadas de acordo com os seguintes percentuais: milho nativo 5 a 15%, preferivelmente 10%, milho branco 5 a 15%, preferivelmente 10%, arroz, quinoa, teff ou amaranto 10 a 30%, preferivelmente 20% e farinha de trigo sarraceno 1 a 10% preferivelmente 5%, em que os ditos percentuais são expressos em peso com base no peso total da composição de farinha. Outros ingredientes que podem ser adicionados à formulação para produtos assados sem glúten baseados na farinha de trigo desintoxicada são, por exemplo, açúcar, manteiga, ovo e creme líquido de origem animal.

[0025] É um objetivo adicional da presente invenção um processo para a preparação de produtos assados fermentados pelo uso de farinha sem glúten desintoxicada, de acordo com o processo definido acima, compreendendo ou consistindo nas seguintes etapas:

a) adicionar 10 a 40%, preferivelmente 30%, de uma mistura de farinhas naturalmente isentas de glúten, fermento de pão 1 a 2%, sal 0,1 a 1,0% e agentes estruturantes 0,5 a 1% à massa de farinha líquida sem glúten desintoxicada usando o processo como definido

acima, e misturar;

b) permitir que a fermentação ocorra por aproximadamente 1 a 3 h, preferivelmente 1,5 h a 30°C;

c) assar por 50 minutos, a 220°C. Quando a massa de farinha sem glúten desintoxicada for seca, a proporção do ingrediente para a água será de aproximadamente 1,2:0,8.

[0026] As farinhas naturalmente isentas de glúten podem ser selecionadas do grupo que consiste em milho nativo, milho branco, arroz, quinoa, teff, amaranto e farinha de trigo sarraceno e misturas dos mesmos. Por outro lado, a farinha sem glúten desintoxicada pode ser selecionada do grupo que consiste na farinha de trigo comum e duro, nas farinhas de cevada, centeio e aveia ou misturas das mesmas, preferivelmente farinha de trigo comum ou de trigo duro.

[0027] Portanto, também são objetivos da presente invenção produtos assados fermentados obteníveis por meio do processo, como definido acima.

[0028] Um objetivo adicional da presente invenção é o processo para a preparação de produtos assados fermentados, que compreende ou consiste nas seguintes etapas:

a) adicionar diretamente milho nativo, farinha de arroz, ovo, açúcar, manteiga e fermento de pão à massa de farinha sem glúten desintoxicada, de acordo com o processo definido acima, e misturar;

b) permitir que a fermentação ocorra por aproximadamente 1,5 h, a 30°C e

c) assar a massa fermentada por 50 minutos, a 250°C.

[0029] Particularmente, na etapa a) os % dos ingredientes são como abaixo: 10% de milho nativo, 10% de farinha de arroz, 5% de ovo, 3% de açúcar, 1% de manteiga e 1,5% de fermento de pão.

[0030] Portanto, os produtos assados fermentados obteníveis por meio do processo acima descrito constituem um objetivo da presente

invenção.

[0031] Um objetivo adicional da presente invenção também é o uso dos produtos, de acordo com a invenção, isto é, massa de farinha, mistura de massa com farinhas sem glúten, produtos assados fermentados, produtos assados fermentados adequados para suprir os desequilíbrios nutricionais que resultam de uma dieta sem glúten.

[0032] Finalmente, as bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM 22064 representam um objetivo da presente invenção.

[0033] A presente invenção será descrita agora por meios ilustrativos, mas não limitantes, de acordo com modalidades preferidas da mesma, com referência em particular às figuras inclusas.

[0034] A figura 1 mostra as atividades de aminopeptidase tipo N (PepN), dipeptidase (PepV) e tripeptidase (PepT) (a), e prolina iminopeptidase (PepI), prolidase (PepQ), prolinase (PepR), dipeptidilpeptidase (PepX) (b) atividades de *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) e *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064), sobre os substratos sintéticos Leu-p-NA, Leu-Leu, Leu-Leu-Leu and Pro-p-NA, Val-For-Gly e Gly-For-Wing, respectivamente. As bactérias usadas no estudo de Rizzello *et al.* (Rizzello *et al.*, 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4499-4507) foram empregadas como controles: *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A, *Lactobacillus hilgardii* 51B e *Lactobacillus sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 e LS47. A atividade enzimática foi expressa como unidade de atividade (U), isto é, a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol/min}$ de *p*-nitroanilida ou 1 $\mu\text{mol/min}$ de aminoácido para atividade sobre substratos diferentes de *p*-nitroanilida.

[0035] A figura 2 mostra os perfis eletroforéticos bidimensionais de várias variedades de trigo duro (Svevo e Duilio) antes e depois do tra-

tamento com as bactérias ácido lácticas selecionadas e proteases fúngicas.

[0036] A figura 3 mostra a composição de proteína da farinha de trigo antes e depois do processo de hidrólise pelas bactérias ácido lácticas selecionadas e proteases fúngicas.

[0037] A figura 4 mostra as atividades de aminopeptidase (A), prolina iminopeptidase (B) e prolil dipeptidil aminopeptidase (C) de bactérias ácido lácticas usadas de acordo com o WO2008/010252 (*Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 e LS41) e com a presente invenção [*Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) e *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064)]. Os acrônimos 15M, 14G, 7A, 51B, LS3, LS10, LS19 LS23, LS38 e LS47 identificam os biótipos como usados de acordo com a publicação de Rizzello *et al.*, 2007.

[0038] A figura 5 mostra a concentração residual de glúten (PPM) em massas fermentadas de *Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 e LS41 (WO2008/010252) e de *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) e *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064) por 12 h, a 37°C.

[0039] A figura 6 mostra a concentração de aminoácidos livres totais (mg/kg) em massa fermentada usando combinações diferentes de bactérias lácticas de acordo com o WO2008/010252 (massa 1, 2, 3, 4 e 5) e com a massa de farinha de trigo fermentada com duas bactérias ácido lácticas (DDPPMA12 e DPPMA125) da presente invenção.

[0040] A figura 7 mostra a Análise de Componente Principal (PCA) dos dados obtidos a partir da análise sensorial de pães (1, 2, 4 e 5) de acordo com o WO2008/010252 e com o pão (DDPPMA12 e DPPMA125) obtido usando farinha de trigo desintoxicada de acordo com a invenção.

Exemplo 1: Atividade de peptidase de bactérias lácticas selecionadas

[0041] *L. sanfranciscensis* DPPMA12 e *L. plantarum* DPPMA125 da Culture Collection of the Dipartimento di Protezione delle Piante and Microbiologia Applicata dell' Università degli Studi di Bari, previamente isoladas de "massas ácidas", foram propagadas a 30°C por 24 h em MRS modificado (mMRS) contendo, além dos ingredientes comuns, 5% de maltose e 10% de água de fermento – pH final 5,6. Como controle das atividades de peptidase das bactérias lácticas usadas na publicação recente de Rizzello *et al.* (Rizzello *et al.*, 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4499-4507), foram usados: *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, *Lactobacillus hilgardii* 51B e *L. sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 e LS47.

[0042] Células cultivadas por 24 h, coletadas por centrifugação (10.000 rpm, 4°C), lavadas duas vezes em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e ressuspensas no mesmo tampão em densidade óptica de 2,5 (A_{620} nm), que corresponde a 10^8 cfu/ml, foram usadas para os ensaios de enzima. As atividades de aminopeptidase tipo N (PepN) e de prolina iminopeptidase (PepI) foram determinadas usando os substratos sintéticos *Leu-p-Na* e *Pro-p-NA*, respectivamente. A mistura de reação consistiu em: 0,9 ml de tampão K-fosfato 50 mM, pH 7,0 contendo substrato sintético dissolvido (concentração final 2 mM) e 100 µl de suspensão celular. A atividade enzimática, expressa como unidade de atividade (U), corresponde à quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol/min de *p-nitroanilida* (Gobbetti *et al.*, 1996. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3220-3226). A prolidase (PepQ), prolinase (PepR) e dipeptidil-peptidase (PepX) foram determinadas

como descrito por Cagno e colaboradores (Di Cagno *et al.*, 2004. Sour dough bread made from wheat and nontoxic flours and starter with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients, *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1088-1096) sobre Val-Pro, Pro-Gly e Gly-Pro-Ala, respectivamente. A dipeptidase (PepV) e tripeptidase (PepT) foram determinadas de acordo com o método de Cd-ninidrina (Gobbetti *et al.*, 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic bacteria by quadratic response surface methodology, *Enzyme Microbial Technol* 25: 795-809) usando Leu-Leu e Leu-Leu-Leu, respectivamente. Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol/min}$ de aminoácido.

[0043] Para propósitos de comparação, o teste foi repetido também para as bactérias lácticas descritas no WO2008/010252 (*Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 e LS41).

Exemplo 2: Extração de proteína de farinha de trigo e análise eletroforética

[0044] As proteínas foram extraídas da farinha de trigo de acordo com o método descrito por Weiss *et al.* (Weiss *et al.*, 1993. Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma. *Electrophoresis*. 14:805-816). A análise eletroforética bidimensional de cerca de 30 μg da fração de proteína extraída foi realizada de acordo com o método de imobilinapoliacrilamida (De Angelis *et al.*, 2005. *Biochim. Biophys. Acta*. 1762:80-93). Quatro géis de cada fermentação independente foram analisados e os dados foram normalizados de acordo com o procedimento como proposto por Bini *et al.* (Bini *et al.*, 1997. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*. 18:2831-2841).

Exemplo 3: Análise imunológica e de espectrometria de massa MALDI-TOF

[0045] As análises imunológicas foram realizadas pelo uso do anticorpo R5 e do teste ELISA competitivo do tipo sanduíche (Transia Plate, Diffchamb) (Valdez *et al.*, 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:465-474). A análise espectrométrica MALDI-TOF foi realizada usando Voyager-De Pro-workstation (PerSeptive Biosystems United Kingdom) de acordo com o método relatado por Hernando *et al.* (Hernando *et al.*, 2003. New strategy for the determination of gliadin in maize or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fractionation of gliadin from maize or rice-prolamins by acid treatment. *J. Mass Spectrom.* 38:862-871).

[0046] A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método Bradford (Bradford, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254). A concentração de nitrogênio orgânico foi determinada de acordo com o método Kjeldahl. A concentração de aminoácidos foi determinada usando um analisador de aminoácido (Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, United Kingdom) (Di Cagno *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1088-1096).

[0047] Para propósitos de comparação, a concentração de aminoácidos livres também foi determinada na massa obtida usando os lactobacilos descritos no WO2008/010252 (*L. sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 and LS41) depois da fermentação por 24 horas, a 30°C, de acordo com os procedimentos indicados no protocolo descrito na figura 8 do dito documento.

Exemplo 4: Fabricação de produtos assados fermenta-

dos usando a farinha de trigo desintoxicada

[0048] As culturas de duas bactérias ácido lácticas selecionadas foram propagadas em meio de cultura, lavadas e ressuspensas em água como previamente descrito. A farinha de trigo a 30% foi misturada com água (70%) contendo a mistura das ditas duas bactérias ácido lácticas em uma densidade celular de cerca de 10^8 cfu/g, e enzimas fúngicas, cada uma em uma concentração de 400 ppm, foram adicionadas. A fermentação foi realizada por 12 h, a 37°C. Depois da fermentação, foram adicionados diretamente à massa líquida milho nativo (10%), farinha de arroz (10%), ovo (5%), açúcar (3%), manteiga (1%) e fermento de pão (1,5%). As concentrações são baseadas no peso total da massa. Depois da mistura, foi permitida a fermentação por 1,5 h, a 30°C, antes de assar a massa fermentada por 50 minutos, a 250°C.

[0049] O processo pode compreender adicionalmente uma etapa de secagem da massa de farinha de trigo líquida. Ingredientes diferentes também podem ser usados para a produção de pão sem glúten.

[0050] Para propósitos de comparação, os pães 1, 2, 4 e 5 foram produzidos de acordo com o protocolo do Pedido de Patente WO2008/010252. A análise sensorial dos pães obtidos de acordo com a invenção e conhecidos na técnica, respectivamente, foi realizada, e particularmente as seguintes características foram consideradas: elasticidade, fragrância ácida, sabor ácido, doçura, secagem e aroma. Cada característica foi avaliada de acordo com uma escala de 0 a 100. Os resultados da análise sensorial foram processados pela Análise de Componente Principal. Adicionalmente, os pães foram analisados quanto ao volume específico, estrutura do miolo, rigidez e teor de fibra, de acordo com métodos padronizados da American Association of Cereal Chemistry (AACC).

Exemplo 5: Administração dos produtos assados fermentados feitos com a farinha de trigo desintoxicada a pacientes

celíacos

[0051] Produtos assados baseados na farinha de trigo desintoxicada, obtidos como descrito previamente, foram administrados a 5 pacientes celíacos. Oportunamente, o diagnóstico da patologia celíaca foi obtido de acordo com os critérios propostos pela European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. A idade média dos pacientes era de cerca de 15 anos. Os pacientes celíacos estavam sob condições de remissão há pelo menos dois anos e submetidos a uma dieta sem glúten controlada. Todos os pacientes recrutados mostraram indicadores sorológicos negativos para a patologia, assim como ensaios histoquímicos negativos. Cada paciente, durante um período de 60 dias, consumiu diariamente os produtos assados que continham a farinha de trigo desintoxicada, correspondendo ao equivalente de 10 g de glúten nativo. Os ensaios imunoquímicos e histológicos foram realizados no Dipartimento di Pediatria e Gastroenterologia dell'Università degli Studi di Napoli, Federico II. O recrutamento dos pacientes ocorreu com consentimento informado dos parentes, aos quais o programa experimental, previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Nápoles, foi submetido.

Resultados

(1) Atividade de peptidase das bactérias ácido lácticas selecionadas

[0052] A atividade de peptidase foi ensaiada em substratos sintéticos relativamente específicos para as atividades de peptidase que são importantes para a degradação de oligopeptídeos derivados de glúten (figura 1). É possível observar que *L. sanfranciscensis* DPPMA12 e *L. plantarum* DPPMA125 exibem todas as atividades enzimáticas consideradas. Com exceção da atividade do tipo de tripeptidase (PepT), as duas bactérias lácticas selecionadas e, particularmente, *L. plantarum* DPPMA125, exibem valores para as outras atividades de peptidase

significativamente maiores ($P < 0,05$) do que os biótipos usados no estudo de Rizzello *et al.* (Rizzello *et al.*, 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4499-4507). Foram detectadas diferenças significativas, particularmente para as atividades de PepI, PepQ, PepR e PepX, com a presença de resíduos de prolina em várias posições de ligação. A glutamina e, em particular as gliadinas, contêm um percentual muito alto e incomum (45 a 60%) de glutamina e resíduos de prolina. Consequentemente, esse último iminoácido ocorre particularmente em epítomos tóxicos que resultam da farinha de trigo e são responsáveis pela patologia celíaca. Para fornecer micro-organismos adequados para a alta degradação da ligação onde a prolina está envolvida, essa atividade enzimática é certamente um pré-requisito para a intensa degradação do glúten e para o rápido processo de hidrólise. A disponibilidade de uma grande Coleção de Culturas a serem rastreadas e o grande número de atividades enzimáticas ensaiadas representam, portanto, o requisito para obter cepas selecionadas não comumente disponíveis. A atividade de peptidase das bactérias lácticas selecionadas é intensificada pelo uso complementar de proteases fúngicas rotineiramente usadas nos processos de fabricação de pão. Tais enzimas são empregadas na indústria da panificação a fim de modificar a concentração de proteína e, portanto, o "reforço da farinha", dependendo dos produtos assados para os quais ela é concebida.

[0053] A figura 4 mostra uma comparação de atividades de peptidase de bactérias ácido lácticas conhecidas na técnica e as duas bactérias ácido lácticas (DPPMA12 e DPPMA125) de acordo com a invenção, respectivamente, e é aparente que as últimas exibem atividades de aminopeptidase, prolina iminopeptidase e prolil-dipeptidil aminopeptidase acentuadamente maiores.

(2) Caracterização da farinha hidrolisada

[0054] Depois da fermentação por 12 h, a 37°C, as frações de pro-

teína foram extraídas seletivamente e submetidas a ensaios analíticos complementares. Como é aparente pelo uso da análise eletroforética bidimensional (figura 2), no final do processo de fermentação, nenhum resíduo de gliadina das farinhas de variedade de trigo duro Svevo e Duilio foi detectado. Resultados similares foram encontrados na fração de gluteína do pão comercialmente disponível de trigo tipo "00", outras variedades de trigo duro testadas (Arcangelo, Ciccio, Colosseo, Gargano e Simeto) e farinhas de cevada, centeio e aveia. As proteínas da farinha de trigo extraídas com 60% de etanol foram analisadas com a técnica MALDI-TOF MS. Os picos que correspondem ao padrão europeu de gliadina desapareceram completamente depois da fermentação por 12 h, a 37°C. Apenas alguns picos com massa molecular menor do que 8 kDa foram detectados pela análise espectrométrica. As análises imunológicas realizadas usando os anticorpos R5 e ensaios ELISA confirmaram que nenhum resíduo de gliadina foi detectado na amostra fermentada. De acordo com o mesmo método, a concentração de glúten residual determinada no pão comercialmente disponível do trigo tipo "00", da variedade de trigo duro e das farinhas de cevada, centeio e aveia era, em todos os casos, menor do que 20 ppm. O método usado para essas determinações é um método oficial da AIC (Associazione Italiana Celiachia), OMS e FAO. Com relação aos dados relatados na literatura (Rizzello *et al.*, 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4499-4507), o processo de hidrólise é realizado com a mesma eficácia (glúten residual < 20 ppm), mas em tempos acentuadamente mais curtos (12 versus 48 h). Esse processo de altas taxas resulta, por um lado, do uso de uma concentração maior de cada uma das enzimas proteolíticas fúngicas (400 ppm) e, por outro lado, principalmente da atividade de peptidase maior dos biótipos de bactérias lácticas selecionadas. Novamente, em comparação com a dita literatura de referência que apenas considerou a farinha de trigo comum com baixa concentração

inicial de glúten, a presente invenção mostra a eficácia do protocolo também em várias variedades de trigo duro e farinhas de cevada, centeio e aveia que possuem também elevadas concentrações de proteína.

[0055] Na figura 3, o teor de nitrogênio orgânico da farinha de trigo tipo "00" de pão comercialmente disponível, antes e depois do processo de fermentação, é descrito. A farinha hidrolisada quase totalmente consiste em uma mistura de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos. Apenas uma quantidade menor do que 20% das gluteninas iniciais está ainda presente na farinha hidrolisada. A concentração de aminoácidos na farinha hidrolisada é de cerca de 15.000 mg/kg comparada com < 1000 mg/kg que ocorrem na farinha de trigo. A maior biodisponibilidade de aminoácidos livres torna essa farinha de trigo hidrolisada uma matéria-prima com alto teor nutricional, retendo ao mesmo tempo outras características nutricionais do cereal, em termos de sais minerais, vitaminas e fibras. Quando usada como um ingrediente para a produção de alimentos sem glúten, a farinha de trigo hidrolisada pode suprir os desequilíbrios nutricionais que resultam de uma dieta sem glúten (Grehn *et al.*, 2001. *Scand J Nutr* 45: 178-182; Mariani *et al.*, 1998. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 27: 519-523; Thompson *et al.*, 2005. *J. Human. Nutr. Diet.* 18:163-169).

[0056] O teste comparativo com as bactérias lácticas conhecidas na técnica mostra que a concentração de aminoácidos na massa é acentuadamente menor e igual a cerca de 2000 mg/kg depois da mais alta condição de hidrólise (figura 6).

[0057] Isso confirma o diferente grau de hidrólise de proteínas do trigo. Além disso, desde que os aminoácidos liberados sejam precursores de compostos voláteis que são gerados durante o processo cozimento e sejam responsáveis pelo sabor dos produtos assados, a concentração acentuadamente maior de aminoácidos livres, como no

caso da presente invenção, indica a maior síntese de produtos voláteis e, portanto, melhor sabor dos produtos de acordo com a invenção.

(3) Produção de produtos assados fermentados usando o farinha de trigo desintoxicada

[0058] Um exemplo da aplicação do protocolo biotecnológico para a fabricação de produtos assados fermentados baseados em farinha de trigo desintoxicada foi descrito acima. Além da fabricação de produtos assados, o protocolo foi padronizado e otimizado também para a produção de pão sem glúten com os ingredientes previamente descritos. Em adição ao possível uso direto da farinha de trigo desintoxicada, um tratamento usando a secagem por pulverização e uso subsequente como matéria seca é possível. Essa possibilidade tecnológica adicional permite a fácil conservação da matéria-prima ao longo do tempo, sem qualquer alteração das características nutricionais da farinha de trigo.

[0059] A figura 7 mostra as propriedades sensoriais melhores do pão, de acordo com a presente invenção (DPPMA12 + DPPMA125), comparado com pães conhecidos na técnica. Além disso, a tabela 1 mostra que o pão, de acordo com a presente invenção, é caracterizado por um volume específico maior, miolo mais aerado, menor rigidez e maior teor de fibra, comparado com o pão conhecido na técnica. Essas diferenças resultam da presença da farinha de trigo que, apesar de desintoxicada, é adequada para favorecer melhores características reológicas e químicas.

Tabela 1

Parâmetros reológicos e químicos	Pão Inicial 1*	Pão (DPPMA12+DPPMA125)
Volume específico (cm ³ /g)	1,35 ± 0,04	1,48 ± 0,07
Aeramento do miolo ("crumb bubbles")(%)	39,2 ± 0,34	42,3 ± 0,47
Rigidez (n)	16,62 ± 0,27	14,75 ± 0,21
Teor de fibra (%)	1,5 ± 0,44	2,0 ± 0,52

**Lactobacillus sanfranciscensis* DSM18426, DSM18427, *Lactobacillus plantarum* DSM18430

(4) Administração a pacientes celíacos de produtos assados feitos com farinha de trigo desintoxicada

[0060] Produtos assados preparados, de acordo com o protocolo biotecnológico previamente descrito, foram administrados diariamente a pacientes celíacos correspondendo a uma dose equivalente de 10 g de glúten nativo. Na tabela 2, são relatados os índices imunoquímicos e histológicos de pacientes celíacos em remissão submetidos ao consumo (10 g de glúten equivalentes ao dia para 60 g) com base na farinha de trigo desintoxicada.

Tabela 2

	Anti-tTG		Imunoquímica						Grau de Marsh	
	T ₀	T ₆₀	CD3		CD25		γδ		T ₀	T ₆₀
F.I.	1,6	1	39	38	6	5	5,6	8,6	0	0
I.C.	1,9	1,1	3,7	11	11	9	0,9	3,8	0	0
R.R.	0,3	0,3	53	56	3	4	11,5	17,8	1	1
I.I.	0,5	0,3	31	36	21	21	8,4	12,8	0	0

[0061] Como é possível observar, todos os pacientes no momento do recrutamento (T₀) apresentavam valores sorológicos e histológicos

normais (Grau de Marsh). Depois de cada consumação diária do equivalente a 10 g de glúten, durante um período de 60 dias (T_{60}), nenhum dos valores bioquímicos e imuno-histoquímicos estava diferente, comparados com o valor inicial. Em particular, deve ser observado que o Grau de Marsh, que representa a condição de integridade e funcionalidade da mucosa intestinal, como detectado com base em uma amostra bio-óptica, é absolutamente idêntico ao valor inicial. Nenhum paciente desenvolveu atrofia das vilosidades intestinais durante o tratamento. Apenas um dos 5 pacientes recrutados interrompeu o teste devido a razões pessoais e não dependentes de uma condição patológica eventual. Com base nos resultados adquiridos baseados na análise clínica mais cuidadosa *in vivo*, é possível estabelecer que a farinha de trigo desintoxicada seja tolerada por todos os pacientes. Em conclusão, a farinha de trigo desintoxicada pode ser usada para a preparação de alimentos sem glúten.

REIVINDICAÇÕES

1. Mistura **caracterizada pelo fato de** que compreende ou consiste das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM22064.

2. Mistura de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo fato de** que compreende adicionalmente proteases fúngicas.

3. Mistura, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pelo fato de** que as proteases fúngicas são selecionadas do grupo que consiste das proteases de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ou misturas das mesmas.

4. Uso da mistura, como definida em qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado pelo fato de** ser para a degradação completa do glúten em farinhas e/ou na fermentação das ditas farinhas.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada pelo fato de** que as farinhas são selecionadas do grupo que consiste das farinhas de trigo macio ou durum, cevada, centeio ou aveia.

6. Processo para a preparação de uma massa de farinha líquida, na qual o glúten é completamente degradado, adequada para a produção de produtos fermentados sem glúten, o dito processo sendo **caracterizado pelo fato de** compreender ou consistir das seguintes etapas:

a) propagar uma cultura das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM 22064;

b) misturar farinha em concentrações de 20 a 50%, preferivelmente 30%, e água, em concentração de 50 a 80%, preferivelmente 70%, contendo a mistura das duas cepas de bactérias da etapa a), em uma densidade celular de cerca de 10^8 cfu/g;

c) adicionar uma ou mais proteases fúngicas, cada uma em

uma concentração de 200 a 500 ppm, preferivelmente 400 ppm;

d) fermentar por 8 a 20 h, preferivelmente 12 h, a 30-37°C.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo fato de** compreender adicionalmente uma etapa e) de secar a massa líquida obtida na etapa d).

8. Processo, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizado pelo fato de** que a farinha é selecionada do grupo que consiste de farinha de trigo comum ou durum, cevada, centeio, aveia ou misturas das mesmas, preferivelmente farinha de trigo macio ou durum.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, **caracterizado pelo fato de** que as enzimas proteolíticas fúngicas são selecionadas do grupo que consiste das proteases de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* ou misturas das mesmas.

10. Massa de farinha líquida ou seca, em que o glúten está completamente degradado pelo uso do processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9, a referida massa de farinha líquida ou seca sendo **caracterizada por** compreender bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM 22064.

11. Mistura **caracterizada pelo fato de** que compreende ou consiste de uma massa, como definida na reivindicação 10, em combinação com uma ou mais farinhas naturalmente isentas de glúten.

12. Mistura, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada pelo fato de** que as farinhas naturalmente isentas de glúten são selecionadas do grupo que consiste de farinha de milho nativo, milho branco, arroz, quinoa, teff ou amaranto, e de trigo sarraceno.

13. Mistura, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, **caracterizada pelo fato de** que as farinhas estão contidas, de acordo

com os seguintes percentuais: milho nativo 5 a 15%, preferivelmente 10%, milho branco 5 a 15%, preferivelmente 10%, arroz, farinha de quinoa, teff ou amaranto 10 a 30%, preferivelmente 20% e farinha de trigo sarraceno 1 a 10% preferivelmente 5%, em que os ditos percentuais são expressos em peso com base no peso total da composição de farinha.

14. Processo para a preparação de produtos assados fermentados, o dito processo sendo **caracterizado pelo fato de** usar farinha desintoxicada de glúten obtida pelo processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9, e compreender ou consistir das seguintes etapas:

a) adicionar 10 a 40%, preferivelmente 30%, de uma mistura de farinhas naturalmente isentas de glúten, fermento de pão 1 a 2%, sal 0,1 a 1,0% e agentes estruturantes 0,5 a 1% à massa de farinha líquida desintoxicada de glúten usando o processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9, e sovar;

b) permitir que a fermentação ocorra por 1 a 3 h, preferivelmente 1,5 h, a 30°C;

c) assar por 50 minutos, a 220°C.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo fato de** que, quando a massa de farinha desintoxicada de glúten é seca, a proporção do ingrediente para o percentual de água é de 1,2:0,8.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, **caracterizado pelo fato de** que as farinhas naturalmente isentas de glúten são selecionadas do grupo que consiste de milho nativo, milho branco, arroz, quinoa, teff, amaranto, farinha de trigo sarraceno ou mistura dos mesmos.

17. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, **caracterizado pelo fato de** que a farinha desintoxicada

de glúten é selecionada do grupo que consiste de ambas farinhas de trigo comum ou durum, cevada, centeio, aveia ou misturas dos mesmos, preferivelmente farinha de trigo macio ou durum.

18. Produto assado que pode ser obtido por meio do processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 14 a 17, sendo o dito produto assado **caracterizado por** compreender bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM 22064.

19. Processo para a preparação de produtos assados fermentados **caracterizado pelo fato de** compreender ou consistir das seguintes etapas:

a) adicionar diretamente milho nativo, farinha de arroz, ovo, açúcar, manteiga e fermento de pão à massa de farinha desintoxicada de glúten, de acordo com o processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9, e sovar;

b) permitir que a fermentação ocorra por 1,5 h, a 30°C e

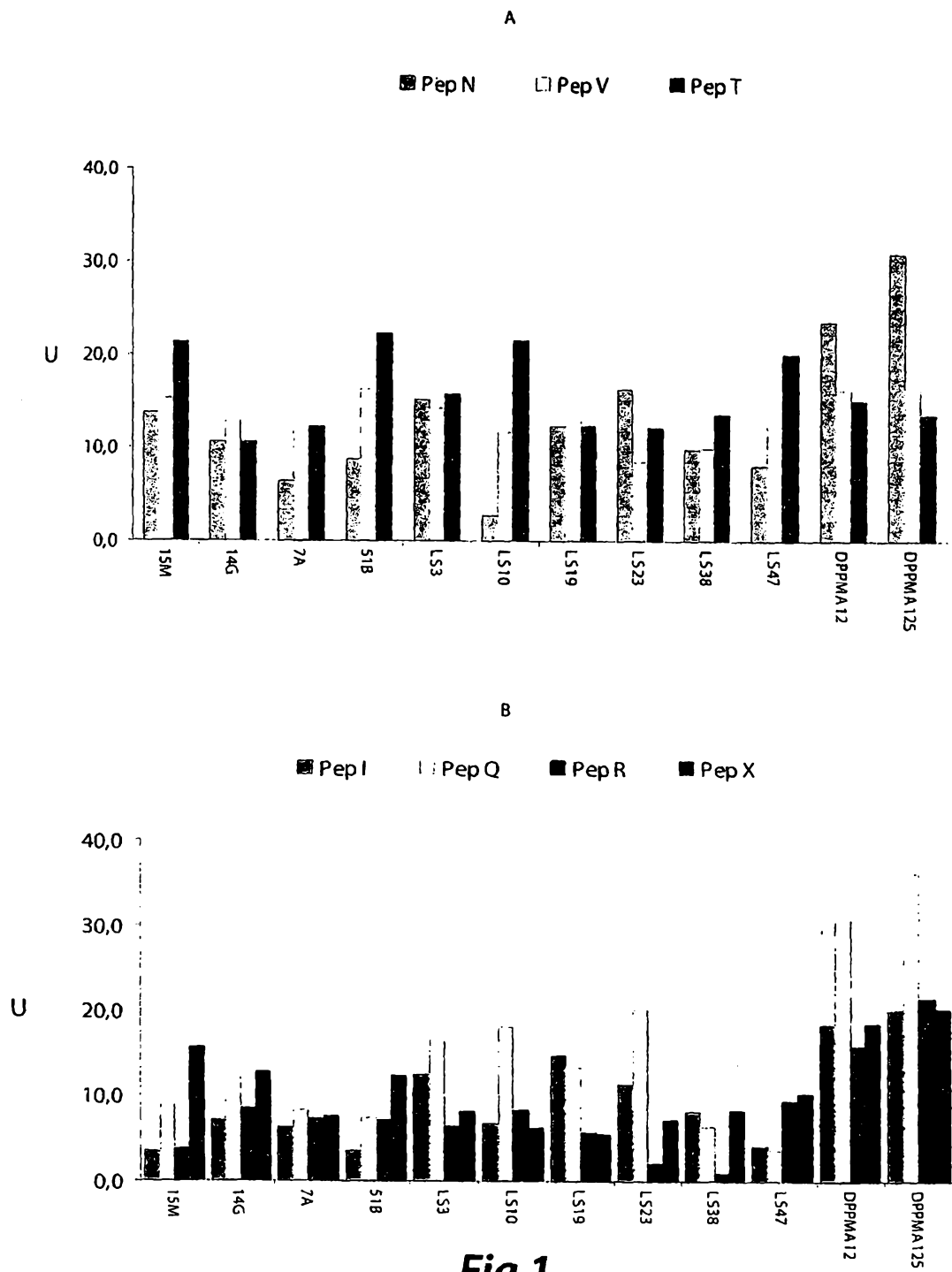
c) assar a massa fermentada por 50 minutos, a 250°C.

20. Processo, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado pelo fato de** que, na etapa a), os percentuais dos ingredientes são os seguintes: milho nativo 10%, farinha de arroz 10%, ovo 5%, açúcar 3%, manteiga 1% e fermento de pão 1,5%.

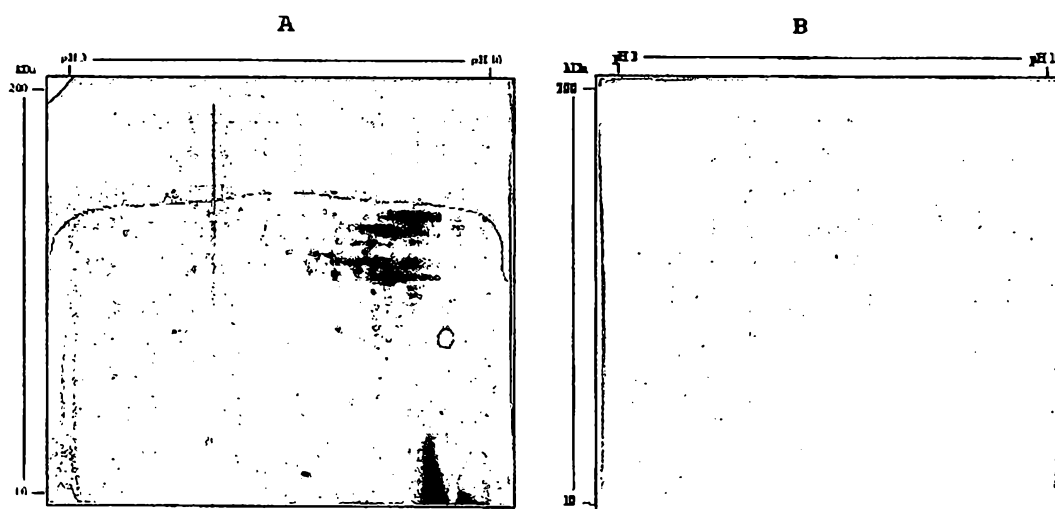
21. Produtos assados fermentados que podem ser obtidos por meio do processo, como definido na reivindicação 19 ou 20, sendo os ditos produtos assados **caracterizados por** compreender bactérias ácido lácticas *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 e *Lactobacillus plantarum* DSM 22064 .

22. Uso de massa de farinha, como definida na reivindicação 10, mistura, como definida em qualquer uma das reivindicações 11 a 13, produto assado fermentado como definido na reivindicação 18, produtos assados fermentados de confeitaria, como definidos na rei-

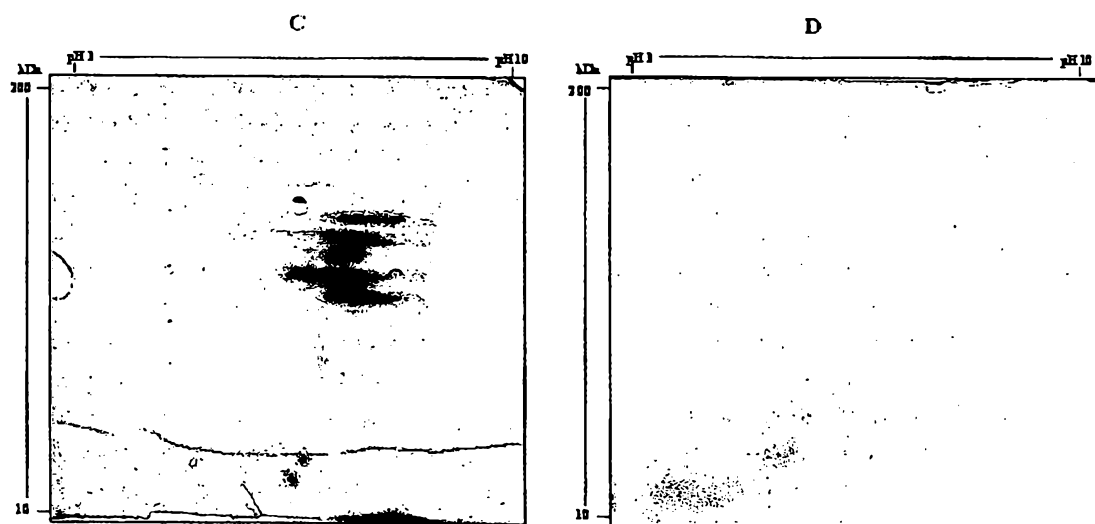
vindicação 21, **caracterizado por ser realizado** para a preparação de alimentos.

**Fig.1**

Duilio



Svevo

Fig.2

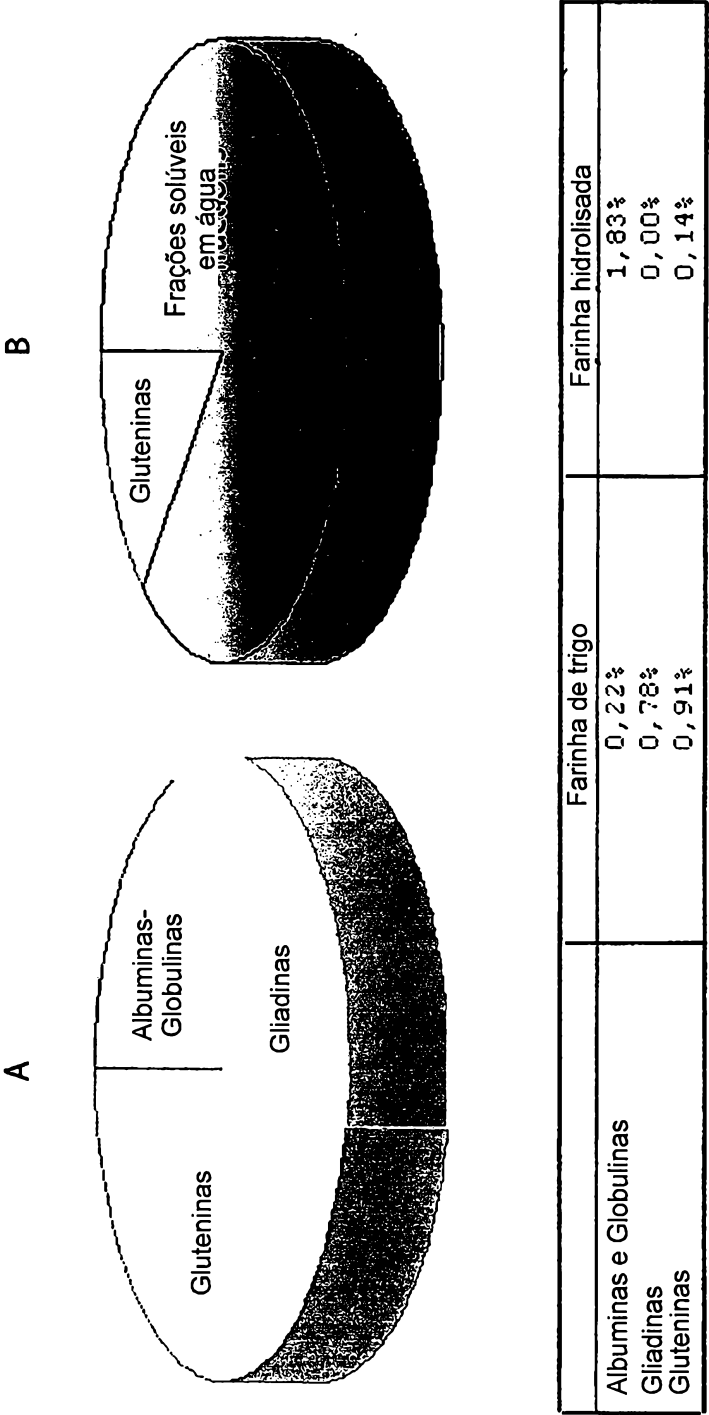
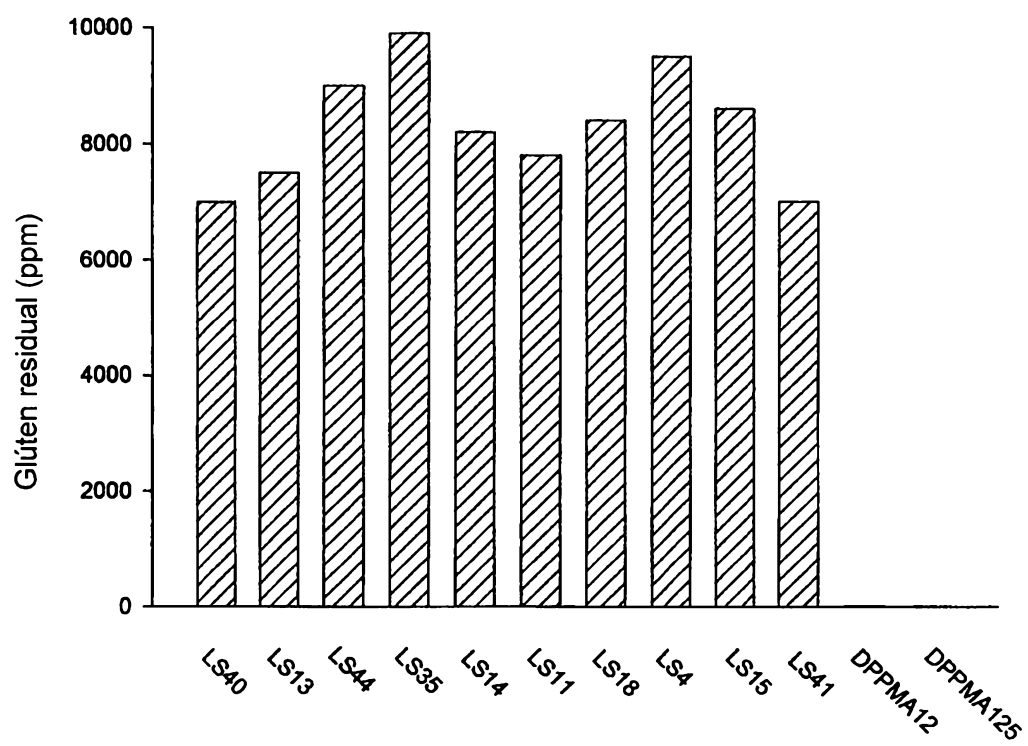


Fig.3



**Fig.5**

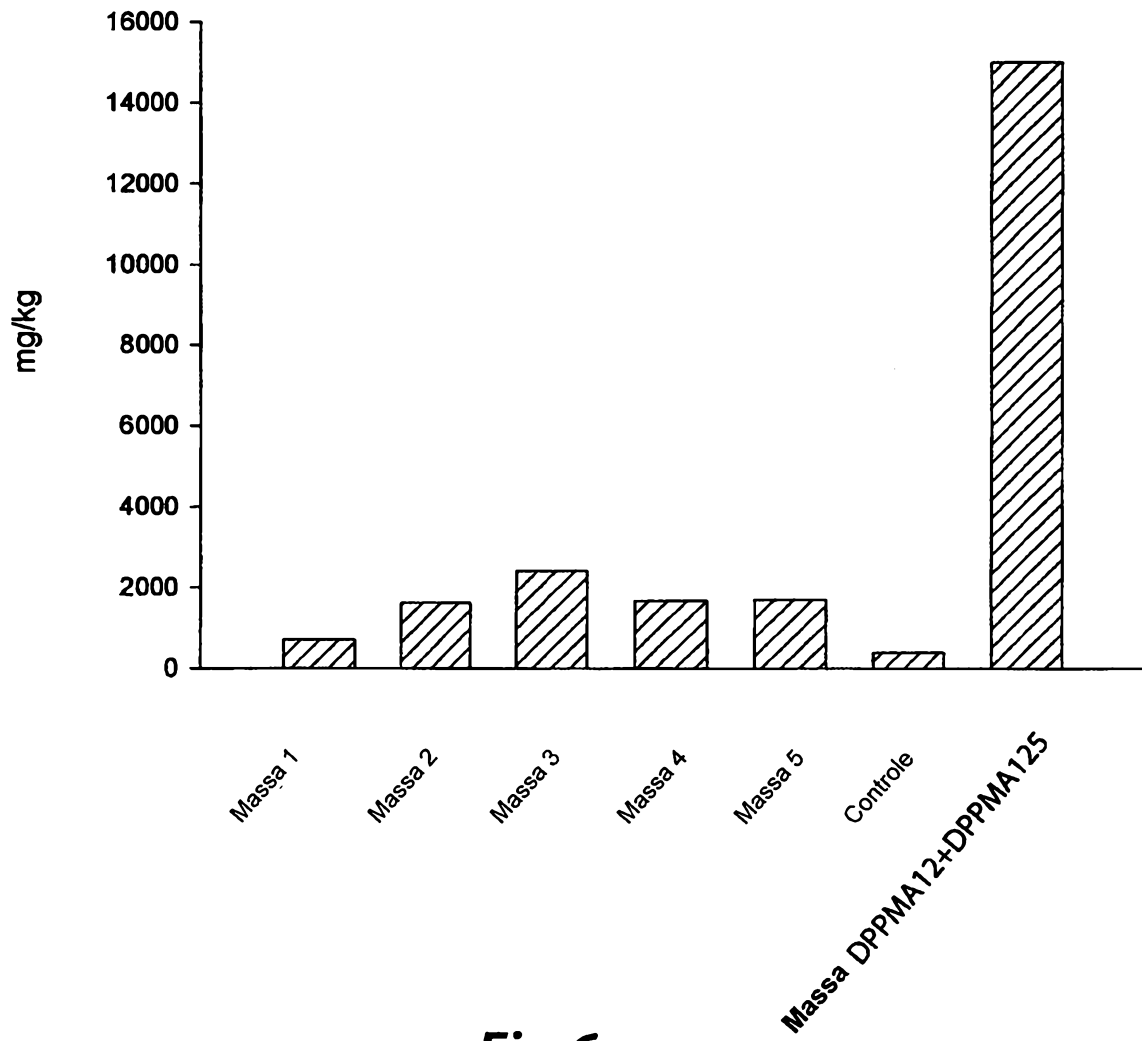
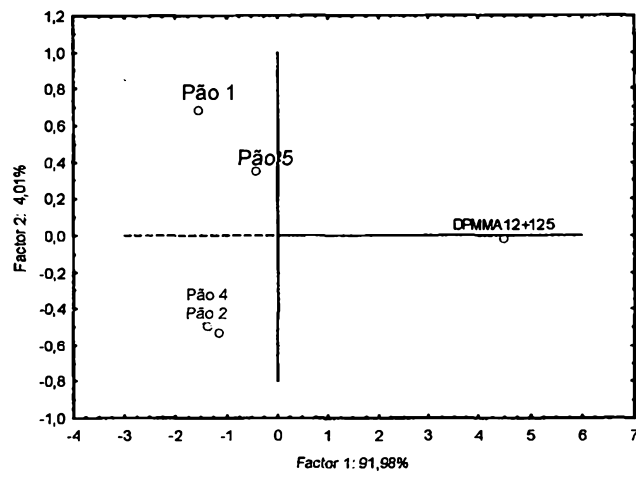
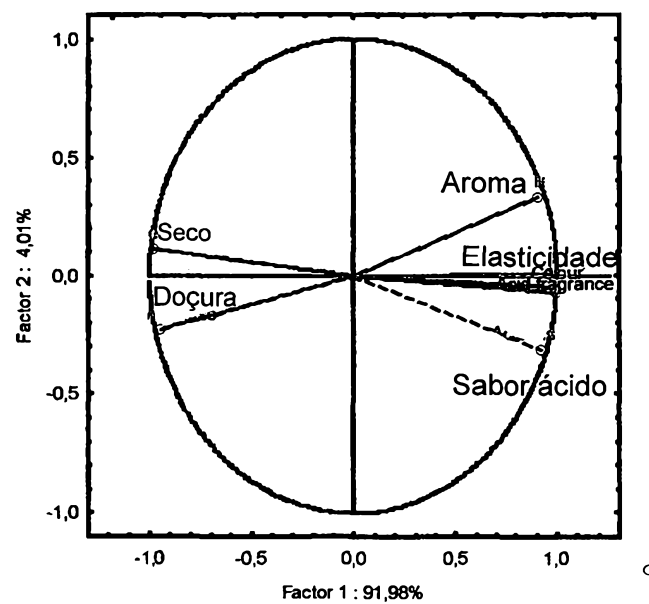


Fig.6

(A)



(B)

**Fig.7**