



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0607794-3 B1

(22) Data do Depósito: 07/03/2006

(45) Data de Concessão: 24/05/2016
(RPI 2368)



(54) Título: MISTURA DE PELO MENOS 6 ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO E/OU BIFIDOBACTÉRIAS NA FABRICAÇÃO DE MASSA AZEDA

(51) Int.Cl.: A21D 8/04; C12P 39/00; A61K 35/74; A21D 10/00; A21D 13/04; A21D 2/36; A21D 13/06

(30) Prioridade Unionista: 16/03/2005 IT PCT/IT2005/000144

(73) Titular(es): VSL PHARMACEUTICALS, INC.

(72) Inventor(es): CLAUDIO DE SIMONE, FRANCO PIROVANO

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MISTURA DE PELO MENOS 6 ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO E/OU BIFIDOBACTÉRIAS NA FABRICAÇÃO DE MASSA AZEDA"**.

A presente invenção refere-se à fabricação de artigos cozidos e, geralmente, a alimento amiláceo. Ela proporciona alimentos cozidos e outro alimento – que são mais digeríveis, eles são isentos de glúten ou têm um teor de glúten reduzido e acentuadamente hidrolisado e são particularmente adequados para pacientes afetados por doença celíaca.

Antecedentes da Invenção

Os cereais são componentes importantes da dieta diária. No entanto, o glúten de farinha de trigo, e em particular, a fração de gliadina, são responsáveis pela intolerância humana. A doença celíaca, também conhecida como espru celíaco (CS) ou enteropatia sensível ao glúten, é uma intolerância alimentar difusa, que ocorre em 1 de cada 130 a 300 pessoas nas populações européias e norte-americanas. Na América do Sul, Norte da África e Ásia é geralmente subestimada (Fasano e Catassi, 2001, *Gastroenterology*, 120:636-651). A distribuição epidemiológica de CS é eficazmente conceituada pelo modelo de iceberg introduzido por Logan em 1992 (Logan; 1992, *Dyn. Nutr. Res.* 2:14-24) onde a prevalência da doença é influenciada pela frequência dos genótipos de predisposição na população. Evitar totalmente e para sempre a ingestão de glúten permanece a pedra angular do tratamento de CS. A International Food Authority tem agora redefinido o termo isento de glúten como tolerância zero a glúten, enquanto o Codex Alimentarius permite uma concentração de 2000 ppm de glúten por alimento. Esforços para reduzir a intolerância humana a cereais são de grande interesse médico, nutricional e econômico. Isso é particularmente verdadeiro no corrente contexto onde as indústrias de panificação estão usando processos tecnológicos muito rápidos que podem influenciar a expansão de epidemiologia de CS.

Portanto, é realmente sentida a necessidade por pão mais digerível e tolerado e por produtos cozidos.

CS é uma doença auto-imune da mucosa do intestino delgado

em pessoas geneticamente suscetíveis. Mediante ingestão de glúten, esses pacientes sofrem de uma inflamação da mucosa que se autoperpetua caracterizada pela perda progressiva de vilos e hiperplasia dos criptos (Silano e De Vicenzi, 1999; *Nahrung*, 43:175-184). Durante a digestão proteolítica endoluminal, por exemplo, gliadinas de trigo liberam uma família de oligopeptídeos ricos em Pro e Glu que são responsáveis pela imunorresposta mediada por célula T e/ou, mais em geral, pelo estado inflamatório que caracteriza o estado inicial de CS (Silano e De Vicenzi; 1999). A literatura relata a identificação dos seguintes oligopeptídeos: fragmentos 31-43 do A-gliadina (Silano e De Vicenzi; 1999), fragmento 62-75 da α 2-gliadina (Auricchio, S., et al.; 1996, *Scand. J. Gastroenterol.*, 31:247-253; Picarelli, A., et al.; 1999, *Scand. J. Gastroenterol.*, 34:1099-1102), epítipo 33-mer, que corresponde ao fragmento 57-89 da α 2-gliadina (Shan, L., et al.; 2002. *Science*, 297:2275-2279), fragmento 134-153 de γ -gliadina (Aleanzi, M., et al., 2001, *Clin. Chem.*, 47: 2023-2028) e o fragmento 57-68 de α 9-gliadina (Arentz-Hansen, et al.; 2000, *J. Exp. Med.*, 191:603-612). Farinhas que não são toleradas por pacientes com CS incluíam trigo, centeio, cevada, kamut, triticale e espelta. Há alguma controvérsia ainda debatida quanto à aveia.

Esforços de pesquisas multidisciplinares são efetuados em vários campos para administrar CS. Esses se preocupam com a engenharia de grãos isentos de glúten (Fasano, A. et al.; 2003, *Arch. Intern. Med.*, 163:286-292), pesquisa dos genes de CS em seres humanos (Fasano, A., et al.; 2003), o uso de algumas substâncias protetoras tais como mananas e oligômeros de N-acetilglicosamina e o uso de uma prolil-endopeptidase bacteriana da *Flavobacterium meningosepticum* como uma terapia suplementar oral (Shan, et al.; 2002).

Mais recentemente, dois artigos mostraram a hidrólise extensiva das frações de gliadina por lactobacilos selecionados de massa azeda, tais como *Lactobacillus alimentarius* 15M, *L. Brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A e *L. hilgardii* 51B (Di Cagno, et al.; 2002, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:623-33) e, especialmente, a tolerância de 17 pacientes com CS a pães que continham 2 g de glúten conforme determinada por desafios *in vivo* com base na

permeabilidade intestinal (Di Cagno, et al.; 2004, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:1088-1096). Esses resultados, embora encorajadores, pelo menos em vista da sintomatologia, não demonstraram regressão de dano histopatológico.

5 Wei et al. (Wei, J. e Hemmings, G.P.; *Medical Hypotheses*, (2005), 64, 547-552) estabelecem uma relação genética entre a doença celíaca e esquizofrenia, e relatam o efeito benéfico da regressão dos sintomas esquizofrênicos em pacientes celíacos tratados com dieta isenta de glúten (De Santis, A., et al.; *J. Intern. Med.* 1997; 242: 421-3).

10 O uso de certas bactérias do ácido láctico na fabricação de alimentos cozidos é também conhecido.

 US 4.140.800, de Kline, descreve um processo para preparar uma composição iniciadora para cozimento de massa azeda liofilizada, que usa *Lactobacillus sanfrancisco*, com o objetivo de proporcionar um produto
15 útil na preparação de pão francês. Desejavelmente, a farinha é de alto teor de glúten.

 A solução proporcionada por Di Cagno et al., de usar bactérias do ácido láctico para massa azeda ainda deixa alguns problemas práticos não resolvidos. Em particular, (i) cepas selecionadas são os resultados de pes-
20 quisa que consumiu muito tempo, que mostraram acentuadas diferenças em nível de cepa dentro das espécies acima das bactérias do ácido láctico para massa azeda; (ii) os mesmos resultados são obviamente não reproduzíveis na fábrica panificadora; e, especialmente (iii) as cepas selecionadas não estão comercialmente disponíveis.

25 Outras referências descrevem o uso de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias na fabricação de alimentos.

 EP 0 856 259 refere-se a uma composição para uso alimentício contendo uma mistura de bactérias vivas liofilizadas compreendendo pelo menos duas espécies de bactérias selecionadas de bifidobactérias e pelo
30 menos duas espécies de bactérias selecionadas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus faecium* e um ou mais oligos-

sacarídeos. A composição é adicionada a um líquido, alimento cremoso ou pastoso, em que o dito produto alimentício é leite, produto com base em leite ou derivado de leite, ou um produto com base em ou derivado de produtos vegetais, sendo a suplementação efetuada no momento do uso do produto alimentício. O produto não é usado na panificação.

WO 03/071883 refere-se a composições dietéticas e/ou farmacêuticas para seres humanos e/ou para uso animal, e os produtos alimentícios gerais, com base em culturas microbianas consistindo em espécies autóctonas e alóctonas com respeito a seres humanos e animais, selecionadas de bactérias lácticas, propionibactérias, leveduras e/ou outros bolores. Elas têm uma ação de balanço da flora intestinal do ser humano hospedeiro ou animal, bem como tem vários efeitos benéficos/probióticos com respeito ao organismo hospedeiro. Não há indicação de um possível uso em doença celíaca.

US 2004/265291 proporciona composições, kits, e métodos para proporcionar ou recuperar as bactérias benéficas para um paciente. As composições e kits incluem opcionalmente alimento ou nutrientes que promovem o crescimento e a proliferação das bactérias no paciente ou um agente antimicrobiano para reduzir a presença de micróbios indesejáveis ou patogênicos no paciente.

WO 02/065842 refere-se a preparações de partida adequadas para todos os tipos de cereal e o uso das mesmas para produzir pão e produtos de panificação com base em fermento ou usando fermento, especialmente para produzir produtos de panificação isentos de glúten para pessoas com doença celíaca. Não há descrição sobre misturas particulares de bactérias do ácido láctico e de bifidobactérias.

US 5.185.165 descreve uma base de precursor para uso em produto de massa de pão que compreende um concentrado ácido, pelo menos um tipo de açúcar, levedura, pelo menos um tipo de farinha, leite seco sem gordura e pelo menos um tipo da bactéria produtora de ácido láctico e um processo para produzir a base de precursor. A base de precursor é útil em um processo para produzir uma pasta de precursor (ou concentrado de

fermento ativo) para uso na fabricação de mistura de massa pré-fermentada do produto de massa para pão. Além disso, são descritos processos para preparar a pasta de precursor e a mistura de massa pré-fermentada e um aparelho para produzir a mistura de massa pré-fermentada. A referência às

5 bactérias do ácido láctico é totalmente genérica.

US 2004/110270 descreve uma composição bacteriana tendo propriedades imunomoduladoras que compreende pelo menos uma cepa selecionada do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, *Lactobacillus plantarum* PTA-4799, *Lactobacillus salivarius* PTA-4800, *Lac-*

10 *tobacillus paracasei* PTA-4798, *Bifidobacterium bifidum* PTA-4801 e *Bifido-*
bacterium lactis PTA-4802.

EP 1 258 526 descreve a produção de um iniciador para fazer a pré-massa de trigo e a massa azeda de trigo por fermentar parcialmente uma mistura de água e produto(s) de trigo moído(s) com um inóculo com-

15 prendendo lactobacilos e levedura compreende o uso de um inóculo que contém uma flora mista adaptada, que inclui pelo menos uma cepa de levedura, pelo menos uma cepa de lactobacilo homofermentativa e pelo menos uma cepa de lactobacilos heterofermentativa. São proporcionadas cepas de *Saccharomyces* sp. DSM 14265, *Lactobacillus pontis* DSM 14269, *Lactoba-*

20 *cillus pontis* DSM 14272, *Lactobacillus pontis* DSM 14273, *Lactobacillus pon-*
tis 14274, *Lactobacillus crispatus* DSM 14271, *Lactobacillus plantarum* DSM 14268 e *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 14270; uma flora mista adaptada que compreende *Saccharomyces* sp. DSM 14265 e pelo menos três de *Lactobacillus pontis* DSM 14269, *Lactobacillus pontis* DSM 14272, *Lactoba-*

25 *cillus pontis* DSM 14273, *Lactobacillus pontis* DSM 14274, *Lactobacillus crispatus* DSM 14271, *Lactobacillus plantarum* DSM 14258 e *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 14270. Essa referência pertence ao campo técnico geral de produtos de panificação sem indicações medicamentosas especiais.

WO 99/09839 refere-se a uma composição similar à pasta que é

30 aplicável ao uso como tal e como recheio, cobertura ou outro componente de vários produtos alimentícios, e que contém uma quantidade significativa de probiótico. O produto alimentício é preferivelmente um produto de panifica-

ção, em particular um pão de centeio, biscoito, rosca ou similar. Essa referência lida com os aspectos geralmente conhecidos do uso de probióticos.

A necessidade de um produto cozido para pacientes afetados por doença celíaca, que possa ser obtido com facilidade, processo de fabricação reprodutível e com materiais confiáveis, seguros e comercialmente disponíveis é ainda sentida nesse campo.

A presente invenção satisfaz essas necessidades ao proporcionar um produto cozido para pacientes afetados pela doença celíaca. Contudo, o produto cozido tem uma grande utilidade na dieta humana devido a sua maior digestibilidade.

Sumário da Invenção

Foi constatado que certas misturas específicas de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias, de origem humana ou do leite são dotadas da propriedade surpreendente de serem capazes de hidrolisar frações de gliadina e de glutenina, que são responsáveis pela doença celíaca.

Essas misturas específicas são bastante úteis na fabricação de massa azeda e proporcionam espécies bacterianas bem definidas.

Portanto, é um objetivo da presente invenção usar mistura específicas de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias na fabricação da massa azeda.

Um objeto da presente invenção é representado por alimento à base de cereal, em particular artigos cozidos que são geralmente mais digeríveis e em particular podem ser tolerados por pacientes com CS.

Um outro objeto da presente invenção é um método para fabricar alimento à base de cereal, em particular artigos cozidos adequados para pacientes afetados com doença celíaca e adequados para impedir a contaminação de glúten em produtos isentos de glúten.

Um outro objeto da presente invenção é representado por alimento à base de cereal isento de glúten, em particular produtos cozidos feitos de farinha de trigo quando o uso das misturas específicas de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias é implementado sob condições específicas com enzimas proteolíticas microbianas, rotineiramente usadas na indústria

de panificação.

Um outro objeto da presente invenção é um alimento para pacientes afetados por doença celíaca, em que o dito alimento contém a mistura específica de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias aqui descritas.

5 Ainda, um outro objetivo da presente invenção é o uso das misturas mencionadas acima de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias para a preparação de um produto útil para redução do Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e outras citocinas inflamatórias.

Esses e outros objetivos da presente invenção serão agora descritos em detalhes também por meio de exemplos e Figuras, em que:

Figura 1 mostra a análise 2DE das frações de proteína de gliadina de diferentes massas feitas de farinha de trigo. (A) Massa quimicamente acidificada (controle). Polipeptídeos de prolamina foram indicados por ovais vermelhos numerados. (B) Massa incubada por 24 horas a 37°C com a MISTURA 1 do Exemplo abaixo. Polipeptídeos de prolamina foram indicados por ovais vermelhos numerados. Os números azuis referem-se aos polipeptídeos que foram degradados mais que 80%. Mr, massa molecular.

Figura 2 mostra a hidrólise do peptídeo 33-mer pela MISTURA 1 (10⁹ CFU/mL). RP-FPLC a UV de 214 nm, traços de 200 µM de 33-mer depois de 24 h de incubação a 37°C sem inóculo microbiano (A) e depois de 24 horas de hidrólise pela MISTURA 1 a 37°C (B).

Descrição Detalhada da Invenção

De acordo com a presente invenção, uma mistura de pelo menos 6, preferivelmente pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 8 espécies de bactérias do ácido láctico e/ou bifidobactérias selecionadas do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cateniforme*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rogosae*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis*,

Lactobacillus gasseri, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium eriksonii*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*,
 5 *Bifidobacterium plantarum*, *Bifidobacterium pseudo-catenulatum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus raffinolactis*, *Acidaminococcus fermenta*, *Cytophaga fermentans*, *Rhodoferax fermentans*, *Cellulomonas fermentans*, *Zymomonas mobilis*, *Streptococcus thermophilus* são adequadas para a presente invenção.

10 Outras espécies podem ser usadas, por exemplo, aquelas descritas no estado da técnica e geralmente disponíveis em coleções, tais como ECACC, ASTIM; DSM.

As misturas preferidas de acordo com a presente invenção são como a seguir:

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

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

Essas misturas de espécies bem conhecidas podem ser facilmente preparadas por qualquer pessoa tendo conhecimento ordinário neste campo.

25 Convenientemente, essas misturas estão comercialmente disponíveis na forma liofilizada.

Essas formulações são adequadas para uso como iniciador na preparação de massa azeda.

30 O alimento à base de cereal, em particular alimentos cozidos obtidos de acordo com a presente invenção são geralmente mais digeríveis, portanto são mais aceitos pelo consumidor geral ou particularmente por pessoas que desejem ou necessitem de alimento mais digerível.

Em uma modalidade particular da invenção, o alimento à base de cereal, em particular, alimentos cozidos podem ser usados para a integração da dieta das pessoas afetadas por doença celíaca, já que a concentração de glúten é reduzida a um valor baixo e a quantidade de glúten que persistiu na massa é acentuadamente hidrolisada, especialmente quanto às

5 persistiu na massa é acentuadamente hidrolisada, especialmente quanto às seqüências de polipeptídeos que são responsáveis por CS.

Quando uma das misturas microbianas acima é integrada com uma quantidade suficiente de protease microbiana, tal como, por exemplo, 200 ppm de protease microbiana (tipicamente de *Aspergillus* sp.) sob as

10 condições otimizadas na presente invenção, a massa azeda fermentada tem uma concentração de glúten inferior a 200 ppm, conforme determinado pelo uso do anticorpo monoclonal R5. Como estabelecido pelo Codex Alimentarius, tal tipo de produto é definido como isento de glúten e, portanto, adequado para pacientes celíacos.

15 Proteases microbianas são de uso comum na panificação, vide, por exemplo, WO 88/03365, EP 0588426, US 6.465.209, GB 1.196.946. Essas proteases são comumente comercializadas, vide, por exemplo, Enzyme Development Corporation (US), e a presente invenção pode ser realizada com qualquer produto disponível no mercado, e de uso comum na panificação.

20

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a protease microbiana é uma protease fúngica de *Aspergillus oryzae*; atividade de 500.000 HUT/g; pH ótimo de cerca de 3,0 e atividade na faixa de pH 3,0 a 6,0; a temperatura ótima de cerca de 50°C e atividade na faixa de 25 a 60°C;

25 ou uma outra protease é uma protease estável ácida de *Aspergillus niger*, atividade de 3.000 SAPU/g; pH ótimo de 2,0-3,0 e atividade na faixa de pH 2,0 a 6,0; temperatura ótima de 50-60°C e atividade na faixa de 30-60°C. Essas enzimas estão disponíveis da Bio-Cat Inc., Troy, Virgínia, E.U.A. e muitos outros fornecedores.

30 A presente invenção permite a fabricação de artigos cozidos com uma maior porcentagem de farinha de trigo, resultando em produto com um aroma mais agradável e melhor aceitação por pessoas afetadas pela

doença celíaca. A presente invenção permite também obter produtos dirigidos aos consumidores em geral, inclusive pessoas saudáveis, dotados de mais digestibilidade.

Em um aspecto mais amplo, a presente invenção refere-se também a produtos amiláceos que compreendem uma mistura de bactérias do ácido láctico, opcionalmente fornecida com preparações enzimáticas conforme descrição acima.

Nesse mais amplo aspecto, a presente invenção proporciona uma mistura de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias, opcionalmente adicionada de enzimas proteolíticas de origem microbiana, útil para a preparação de produtos para administração oral para melhorar a digestão de glúten e substâncias relacionadas ao glúten.

A massa azeda que compreende a mistura específica da presente invenção é o aspecto crítico da mesma.

A massa azeda é útil em um processo para a preparação de um artigo cozido, em particular pão, mas isto se aplica a todos os produtos fermentados e não fermentados, tais como, por exemplo, biscoitos, pastéis, bolos, tortas, pizza, bolachas, palitos de pão, lanchinhos e todos outros produtos conhecidos da técnica.

A massa azeda de acordo com a presente invenção é adicionalmente adequada para preparações para fabricar, também alimentos à base de cereal, feitos em casa, em particular artigos cozidos. Nesse caso, a embalagem para um artigo cozido compreenderá, além dos ingredientes usuais para o produto específico, uma preparação de fermentação que compreende a mistura específica da presente invenção.

A preparação de fermentação, de acordo com a presente invenção, pode ser uma combinação com a mistura específica de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias ou pode ser proporcionada na embalagem separadamente com a mistura de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias e ser misturada com a última, no momento de uso, por exemplo, em água para formar uma suspensão de fermentação. A mistura de bactérias do ácido láctico pode ser embalada em um recipiente sozinho ou em mistura com as en-

zimas proteolíticas (protease) discutidas acima.

Produtos amiláceos são geralmente bem conhecidos no campo e fazem parte do conhecimento comum, também entre os consumidores e na culinária feita em casa. Em particular, a presente invenção é aplicada a
5 produtos à base de cereais.

Exemplos de produtos de amido são todos os tipos de massa, talharim, tais como talharim, talharins para fritar instantaneamente e talharins úmidos, produtos para lanchinhos, tortilhas, rodela de milho, cereais extrudados e cereais em tiras.

10 Métodos para fazer massa são bem conhecidos da técnica e deve ser feita referência simplesmente a, por exemplo, *Pasta and Semolina Technology*, Editado por R.C. Kill e K. Turnbull, Blackwell Science, 2001 e patentes pertencentes à Barilla. Métodos para fazer produtos amiláceos asiáticos são também bem conhecidos e é feita uma simples referência exemplificativa a *Asian Food, Science and Technology*, Editado por Catharina
15 Y.W. Ang, KeShun Liu e Yao-Wen Huang, Technomic Publishing Company, Inc., 1999 e US 20020160093 de Kao Corporation e WO 99/65331, da Société de Produits Nestlé S.A.

Hoje em dia, a maior parte das pastas é feita por extrusoras contínuas de alta capacidade, que operam no princípio de extrusão com broca
20 em que amassamento e extrusão da massa incluem produção de macarrão seco, talharim e espaguete.

Produtos de massa são fabricados misturando trigo moído, água, ovos (por exemplo, talharins com ovos ou espaguete com ovos), e algumas vezes ingredientes opcionais. Esses ingredientes opcionais são tipicamente adicionados a uma extrusora com broca, contínua, de alta capacidade, que pode ser equipada com uma variedade de matrizes que determinam a conformação da massa. A massa é então secada e embalada para o mercado.

30 Produtos de massa contêm trigo moído, água, e ocasionalmente ovos e/ou ingredientes opcionais. Fabricantes de massa usam tipicamente trigo durum moído (semolina, grânulos durum e farinha durum) na produção

de massa, embora farinha fina e farinha de trigo comum sejam ocasionalmente usadas. A maioria dos fabricantes de massa prefere semolina, que consiste em partículas finas de tamanho uniforme e produz o produto de massa da mais alta qualidade. A água usada na produção de massa deve ser pura, isenta de odores desagradáveis, e, adequada para beber. Também, já que a massa é produzida abaixo das temperaturas de pasteurização, a água deve ser usada com baixa contagem de bactérias. Ovos (ovos frescos, ovos congelados, ovos secos, gemas de ovos, ou sólidos de ovos secos) são adicionados à massa para fazer talharim com ovos ou espagete com ovos e para melhorar a qualidade nutricional e riqueza da pasta. Pequenas quantidades de ingredientes opcionais, tais como sal, aipo, alho e folhas de louro, podem ser também adicionadas à massa para melhorar o sabor. Fosfato dissódico pode ser também usado para reduzir o tempo de cozimento. Outros ingredientes, tais como, goma de glúten, monoestearato de glicerila e claras de ovos podem ser também adicionados. Todos os ingredientes opcionais devem estar claramente rotulados na embalagem

Trigo durum é moído em semolina, grânulo durum, ou farinha durum usando moinhos de rolos. A moedura da semolina é única, pois o objetivo é preparar granulares médios com um mínimo de produção de farinha. Depois de moído, o trigo é misturado com água, ovos, e quaisquer outros ingredientes opcionais.

Na operação de mistura, água é adicionada ao trigo moído em uma calha de misturamento para produzir a massa com um teor de umidade de aproximadamente 31%. Ovos e quaisquer ingredientes opcionais podem ser também adicionados. A maioria das prensas de massa modernas é equipada com câmara de vácuo para remover bolhas de ar da massa antes da extrusão. Se o ar não é removido antes da extrusão, pequenas bolhas formar-se-ão na massa que diminuem a resistência mecânica, rendendo um produto final com aparência branca como giz.

Depois de a massa ter sido misturada, ela é transferida para a extrusora. A broca da extrusora não somente força a massa através da matriz, como também ela amassa a massa para forma uma massa homogênea,

controla a taxa de produção, e influencia a qualidade total do produto acabado. Embora a construção e dimensão das brocas de extrusão variem com os fabricantes de equipamento, as prensas mais modernas têm brocas de bordas afiadas que têm um passo uniforme em todo o seu comprimento. A broca se encaixa em um barril de extrusão com ranhura, que auxilia a massa a se mover para frente e reduz o atrito entre a broca e o interior do barril. Barris de extrusão são equipados com camisas de refrigeração para dissipar o calor gerado durante o processo de extrusão. A camisa de refrigeração também auxilia a manter a temperatura de extrusão constante, que deve ser de aproximadamente 51°C (124°F). Se a massa está muito quente (acima de 74°C (165°F)), a massa será danificada.

Vazão uniforme da massa através da extrusora é também importante. Variâncias na vazão da massa através da matriz fazem com que a massa seja extrudada em diferentes vazões. Produtos de tamanho não uniforme devem ser descartados ou re-processados, o que aumenta o custo unitário do produto. A superfície da matriz influencia também a aparência do produto. Até recentemente, a maioria das matrizes era feita de bronze, que era relativamente mole e requeria reparo ou reposição periódica. Recentemente, as matrizes têm sido aperfeiçoadas ao se equipar a superfície extrusora da matriz com inserções de Teflon® para prolongar a vida das matrizes e aperfeiçoar a qualidade da massa.

Secagem é a etapa mais difícil e crítica de se controlar no processo de produção de massa. O objetivo da secagem é reduzir o teor de umidade da massa de aproximadamente 31% para 12 a 13% de modo que o produto acabado será rígido, reterá sua conformação e será armazenado sem se estragar.

A maioria das operações de secagem de massa usa uma secadora preliminar imediatamente após a extrusão para evitar que a massa grude. A pré-secagem endurece a superfície externa da massa enquanto mantém o interior macio e plástico. Uma secadora final é então usada para remover a maior parte da umidade do produto.

A temperatura de secagem e os incrementos de umidade relati-

va são importantes fatores na secagem. Já que a superfície externa da massa seca mais rapidamente que o interior, os gradientes de umidade se desenvolvem através da superfície para o interior da massa. Se secada muito rapidamente, a massa se romperá, rendendo um produto de aparência pobre e com resistência mecânica muito baixa. O rompimento pode ocorrer durante o processo de secagem ou tanto quanto várias semanas após o produto ter deixado a secadora. Se a massa é secada muito lentamente, ela tende a se estragar ou se tornar bolorenta durante o processo de secagem. Portanto, é essencial que o ciclo de secagem seja adaptado para satisfazer as exigências de cada tipo de produto. Se o ciclo de secagem foi bem sucedido, a massa ficará firme, porém também flexível o bastante de modo que ela possa se dobrar até um grau considerável antes de quebrar.

Embalagem mantém o produto isento de contaminação, protege a massa de danificação durante expedição e armazenagem, e exibe o produto favoravelmente. O principal material de embalagem para talharins é o saco de celofane, que proporciona proteção à prova de umidade para o produto e é usado facilmente em máquinas de embalagem automáticas, mas é de difícil empilhamento nas prateleiras dos armazéns. Muitos fabricantes utilizam caixas em vez de sacos para embalar a massa porque as caixas são fáceis de ser empilhadas, proporcionam boa proteção aos produtos de massa frágeis, e oferecem a oportunidade de imprimir o anúncio que é mais fácil de ler que em sacos.

Emissões de ar podem surgir de uma variedade de fontes na fabricação da massa. Emissões de matéria particulada (PM) resultam principalmente de manuseio de sólidos e misturamento. Para a fabricação de massa, emissões de PM ocorrem durante o processo de moagem do trigo, conforme os ingredientes brutos são misturados, e possivelmente durante a embalagem. Fontes de emissão associadas à moagem do trigo incluem receber o grão, pré-limpar/manusear, casa de limpeza, moagem e carregamento a granel. Outras informações são disponibilizadas por D.E. Walsh e K.A. Gilles, "*Pasta Technology*", *Elements of Food Technology*, N.W. Desrosier, Editor, AVIR Publishing Company, Inc., 1977.

A presente invenção é aplicável tanto à fabricação industrial quanto à preparação caseira de massa, no último caso, favoravelmente na preparação de massa com ovos.

De acordo com a presente invenção, no processo de preparar
5 massa, é usada a mistura de bactérias do ácido láctico descrita aqui.

Em uma outra modalidade da presente invenção, um alimento à base de cereal típico da Ásia é proporcionado. Um exemplo preferido é um tipo de talharim conhecido na Coréia com Ramyun, na China como Ramien e no Japão como Ramen.

10 Como na execução geral da presente invenção, a massa é preparada por adição da mistura de bactérias do ácido láctico e deixada por tempo suficiente para a pré-fermentação.

As misturas de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias de acordo com a presente invenção, opcionalmente adicionadas com as mistu-
15 ras acima de proteases microbianas, podem ser também usadas na fabricação de um alimento, em particular de grau isento de glúten, para consumo por um paciente afetado por doença celíaca. Exemplos desse tipo de alimento são massas, cereais, tacos, tortilhas, pipoca. Para referência vide *Practical Gastroenterology* – Abril de 2004, páginas 86-104 e a literatura citada
20 aqui.

Um outro objeto da presente invenção é um método para a fabricação de um artigo cozido que compreende a adição da preparação de massa azeda acima.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, o método
25 compreende as seguintes etapas:

a) pré-fermentação líquida de 20-50% de farinha de trigo em peso (mistura integral de 20%-50% de farinha e 80%-50% de água, rendimento de massa de cerca de 300 com cerca de 10^9 células da mistura da presente invenção por grama de massa), a cerca de 37°C por pelo menos cerca de 24
30 horas, preferivelmente entre cerca de 24 e cerca de 31 horas;

b) depois da fermentação, misturar a massa com uma ou mais farinhas toleradas, tal como farinha de milheto, para ter um rendimento de

massa final de cerca de 150 (massa sólida) e adicionada de levedura de padeiro em uma concentração de cerca de 1% em peso;

c) incubar a massa a cerca de 37°C por cerca de 2 horas até que a fermentação se complete;

5 d) cozer a cerca de 250°C por cerca de 20 minutos.

Em uma segunda modalidade da presente invenção, o método pode ser modificado como a seguir:

a) fermentação líquida de 20% de farinha de trigo com posterior adição de proteases fúngicas (200 ppm) a 37°C por 24 a 31 horas;

10 b) depois da fermentação, secar para remover a água de modo a ter uma farinha de trigo isenta de glúten (<200 ppm de glúten);

c) uso da farinha de trigo isenta de glúten como ingrediente básico para a fabricação de alimento à base de cereal, em particular artigos cozidos.

15 O termo "cerca" nessa circunstância significa valores em torno daqueles indicados que são compreendidos na execução normal da invenção e podem depender dos erros instrumentais dos dispositivos de medição ou desvios feitos por pessoas versadas na técnica em torno dos valores indicados, mas que não afetam o resultado obtido pela invenção.

20 As faixas acima são pretendidas também como cerca de maiores que o limite inferior e cerca de menores que o limite inferior. Portanto, a pré-fermentação líquida da etapa (a) compreende uma quantidade de farinha de trigo não inferior a 20% e não maior que 50% em peso por um tempo não menor que cerca de 24 horas e não mais que cerca de 31 horas.

25 Uma lista de exemplos de farinhas toleradas compreende farinhas de feijão, trigo-sarraceno, linhaça, milho ("maize"), farinhas de leguminosas (garbanzo/grão de bico, lentilha, ervilha), milheto, Gramínea de Arroz Cultivado na Índia, farinhas de nozes (amêndoa, avelã, noz-pecã), quinoa, farinha de batata, farinha de batata doce, sago, farinhas de semente (gergelim), sorgo, soja, tapioca, teff. Milheto é uma das farinhas toleradas preferida.

30 Uma modalidade bastante vantajosa da presente invenção é incluir um prebiótico no artigo cozido, se contendo ou não uma farinha tolera-

da.

Um prebiótico é uma substância similar à fibra não digerível, exemplos deste são oligossacarídeos de cadeia curta e de cadeia longa, tais como frutooligossacarídeos, soja-oligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos e iso-malto-oligossacarídeos.

Uma modalidade ainda mais vantajosa da invenção é a incorporação do artigo cozido aqui descrito em um artigo cozido tal como aquele descrito em EP 1 010 372. Nessa modalidade, a artigo cozido compreende uma composição à base de gordura, essencialmente isenta de água, não cozida que compreende bactérias lácticas liofilizadas vivas. Essa composição à base de gordura compreendendo bactérias lácticas liofilizadas vivas pode ser naturalmente combinada com todos os produtos cozidos da presente invenção.

O alimento à base de cereal, em particular artigos cozidos e as embalagens para o alimento à base de cereais que está sendo feito, em particular artigos cozidos de acordo com a presente invenção são adequados para administração a um paciente que sofre de doença celíaca.

Como dito acima, a presente invenção compreende também alimento geral conhecido sob o nome genérico de alimento amiláceo, em particular alimento à base de cereal.

A mistura de bactérias do ácido láctico, opcionalmente adicionada com a protease microbiana, como previamente descrita, é usada na fabricação de alimento amiláceo, em particular alimento à base de cereais para obter os mesmos resultados e vantagens da modalidade descrita acima de artigos cozidos. Por assim dizer, o alimento obtido de acordo com a presente invenção é adequado para pacientes que sofrem de doença celíaca ou para consumidores em geral, também com boa saúde, que desejem alimento mais digerível. Por exemplo, crianças e pessoas idosas podem desejar alimento mais digerível.

Portanto, um outro objeto da presente invenção é um método para tratar um paciente que sofre de doença celíaca que compreende a integração da dieta do referido paciente de um artigo cozido e/ou um alimento

amiláceo conforme descrito acima. Como dito anteriormente, os artigos cozidos e alimento amiláceo de acordo com a presente invenção estarão compreendidos no termo "alimento à base de cereais".

Em uma outra modalidade da presente invenção, o alimento à base de cereais, em particular artigos cozidos, pode ser usado também para manter tolerância a glúten ou para induzir tolerância a glúten ou para reduzir o risco de alergias devido às albuminas e globulinas da farinha de trigo.

Em uma outra modalidade da presente invenção, o alimento à base de cereais, em particular alimentos cozidos podem ser seguramente usados por pacientes celíacos desde que com baixa concentração de glúten (<200 ppm).

Os métodos de tratamento de acordo com a presente invenção podem ser também usados em combinação com outros tratamentos médicos para doença celíaca.

Como relatado acima, sintomas esquizofrênicos são observados em pacientes celíacos e pacientes esquizofrênicos mostram um comportamento sensível ao glúten. As misturas de acordo com a presente invenção são úteis para preparar artigos dietéticos isentos de glúten.

Portanto, um outro objetivo da presente invenção é o uso da mistura descrita acima na preparação de um artigo dietético isento de glúten útil para o tratamento de sintomas esquizofrênicos. Em particular, os ditos sintomas afetam um paciente celíaco ou um não celíaco.

Um outro problema na técnica é o uso de prolina nas preparações para dieta entérica. Em certos pacientes, a prolina não é hidrolisada e os compostos para preparar a solução para dieta entérica não são assimilados. Podem também ocorrer repostas alérgicas devido à prolina. As misturas de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias descritas na presente invenção são úteis para hidrolisar a prolina ou os peptídeos ricos em prolina, fabricando, assim, preparações para dieta entérica eficaz e não alérgica.

Graças a essas propriedades, as misturas de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias descritas na presente invenção são também úteis para preparar soluções de glutamina enriquecidas com gliadina, hipoalergê-

nicas.

Em uma outra modalidade da presente invenção, foi também constatado que as misturas aqui descritas podem ser usadas na fabricação de um produto para reduzir os níveis do Fator Ativador de Plaqueta (PAF) e de outras citocinas inflamatórias para tratar doença gastrointestinal.

PAF está envolvido em uma série de doenças gastrointestinais, em particular distúrbios inflamatórios. Podemos mencionar necrose do intestino isquêmico (Hsue W., Gonzalez-Crussi F.; *Methods Achiev. Exp. Pathol.*; 1988:13; 208-39), úlcera gástrica (Esplugues JV, Whittle B.J., *Methods Find.*; 1989: Supl. 1, 6106), retocolite hemorrágica (Chaussade S., Denizot Y, *Ann. Gastroenterol. Hepatol.* (Paris); maio de 1991, 27(3); 117-21), enterocolite necrosante (Ewer AK., *Acta Pediatr. Suppl.*; 2002, 91(437): 2-5; neonatal: Caplan MS., et al., *Semin. Pediatr. Surg.*; Agosto de 2005, 14(3): 154-51), doença inflamatória do intestino (Nassif A., et al., *Dis. Colon Rectum*; Fevereiro de 1996,; 39(2):217-23), bolsite (Rothenberg DA., et al. *Ann. Chir.*; 1993; 47(10):1043-6).

Em vista da explanação acima, o produto de acordo com a presente invenção pode ser também suplementado para pacientes, em particular o povo japonês, tendo déficit de PAF-hidrolase, que pode ser afetado por uma série de doenças inflamatórias (Karasawa K., et al.; *Prog. Lipid. Res.*; março de 2003, 42(2):93-114).

O produto pode tomar a forma de um alimento como descrito acima, ou um suplemento nutricional, um nutracêutico, um fármaco.

Suplemento nutricional e nutracêutico são termos bem conhecidos na técnica (Arvanitoyannis IS, et al., *Crit. Ver. Food Sci. Nutr.*; 2005,45(5):385-404 e Kalra EK, *AAPS PharmaSci*; 2003, 5(3); E25) e não há necessidade por mais definição.

O exemplo seguinte ilustra subsequente a invenção.

Exemplo 1

30 Fermentação da massa azeda e análises de eletroforese

As características da farinha de trigo usada foram como a seguir: umidade, 12,8%; proteína (N x 5,70), 10,7% de matéria seca (MS); gordura,

1,8% de MS; cinzas, 0,6% de MS; e carboidratos solúveis totais, 1,5% de MS. Oitenta gramas de farinha de trigo e 190 mL de água da bica (contendo uma concentração de células das preparações de células de cerca de 10^9 CFU por grama de farinha) foram usados para produzir 270 g de massa
 5 (rendimento da massa, 220). Foram fabricadas quatro massas usando as seguintes misturas de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias.

Mistura 1 de acordo com a invenção:

Streptococcus thermophilus, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;
 10

Mistura 2 de acordo com a invenção:

Streptococcus thermophilus, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*.
 15

Mistura 3:

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

Mistura 4:

Lactobacillus brevis, *Lactobacillus salivarius* spp. *Salicinius*, *Lactobacillus plantarum*.
 20

A fermentação foi efetuada a 37°C por 24 horas. Uma massa sem inóculo de bactéria foi quimicamente acidificada para pH 4,0, com uma mistura de ácido láctico e ácido acético (razão molar 4:1), e usada como
 25 controle. Depois da incubação, gliadinas foram extraídas das massas seguindo o método originalmente descrito por Osborne (Osborne, T.B.; 1970, *The proteins of the wheat kernel*. Carnegie Institute of Washington, publicação de 84. Judd e Detweiler, Washington, D.C.) e ainda modificado por Weiss et al. (Weiss et al.; 1993, *Electrophoresis*, 14:805-816).

30 Alíquotas de 10 a 20 µl (cerca de 10 µg de gliadina) foram diluídas 1:1 com tampão de amostra, tratadas a 100°C, por 5 minutos e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de só-

dio (SDS-PAGE), de acordo com o procedimento de Laemmli (Laemmli; 1970, *Nature*, 227:680-685); os géis continham 12% de acrilamida e foram coloridos com azul de Coomassie B10 Bio-Seguro (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Eletroforese em gel bidimensional (2DE) foi realizada conforme descrito por Di Cagno et al. (Di Cagno; et al., 2004). Três géis foram analisados, e a intensidades das manchas da massa quimicamente modificada (siCAD) e da massa azeda (adicionada da MISTURA 1) (siSD) foram normalizadas conforme reportado por Bini et al. (Bini et al.; 1997, *Electrophoresis*, 18:2832-2841). O fator de hidrólise para as proteínas individuais foi expresso como $[(\text{siCAD} - \text{siSD})/\text{siCAD}] \times 100$. Todos os fatores de hidrólise foram calculados com base na média das intensidades das manchas dos três géis, e o desvio padrão foi calculado. Somente fatores de hidrólise com significância estatística onde o valor de P era $< 0,05$ foram reportados.

Hidrólise de substratos sintéticos, Polipeptídeos ricos em Pro e Análises por RP-FPLC

Preliminarmente, as atividades de peptidase específica para prolina da Mistura 1 foram caracterizadas pelo uso de substratos sintéticos tais como Pro-*p*-NA, Leu-*p*-NA, Ala-*p*-NA, Leu-Leu, Val-Leu, Pro-Gly, Gly-Pro-Ala, Leu-Leu-Leu, Z-Gly-Pro-*p*-NA, e NCBZ-Gly-Gly-Leu-*p*-NA (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). A mistura de ensaio continha 500 μL de tampão de fosfato 200 mM, pH 7,5, 150 μL de substrato (0,2-3 mM, concentração final), 8 μL de NaN_3 (0,05% de concentração final) e 50 μL da preparação da MISTURA 1 (5×10^9 CFU/mL, concentração final). O fragmento 62-75 (P-Q-P-Q-L-P-Y-P-Q-P-Q-S-F-P) da A-gliadina (Silano e De Vicenzi; 1999) e o epítipo 33-mer (L-Q-L-Q-P-F-P-Q-P-Q-L-P-Y-P-Q-P-Q-L-P-Y-P-Q-P-Q-L-P-YP-Q-P-Q-P-F) (Shan et al., 2002) foram sintetizados pelo Neosystem Laboratoire (Estrasburgo, França). A mistura de ensaio para o fragmento 62-75 continha 320 μL de tampão de fosfato 20 mM, pH 7,0, 150 μL de substrato (450 μM , concentração final), 8 μL de NaN_3 (0,05% de concentração final) e 50 μL da preparação de MISTURA 1 (5×10^9 CFU/mL, concentração final). A mistura de ensaio para o epítipo 33-mer continha 500 μL de tampão de fosfato 200 mM, pH 7,5, 150 μL de substrato (200 μM , concentração final), 8 μL de

NaN₃ (5×10^9 CFU/mL, concentração final). Ambas as misturas foram incubadas a 37°C sob condições agitadas (150 rpm). A cinética enzimática para a hidrólise do 33-mer foi calculada pelo uso de uma plotagem de Lineweaver-Burk (Lineweaver e Burk; 1934. *J. American Chem. Soc.*, 56:658-666).

5 As reações enzimáticas foram interrompidas por adição de 0,05% (v/v) (concentração final) de ácido trifluoracético. Os peptídeos foram separados da mistura por RP-FPLC usando uma coluna de 3 mL Resource II RPC e o equipamento FPLC com um detector de UV operando em 214 nm (Amersham Biosciences, Upssala, Suécia). Eluição era em uma vazão de 1
10 mL/min com um gradiente (5 a 100%) de acetonitrila em ácido trifluoracético a 0,05%. A concentração de CH₃CN foi aumentada linearmente de 5 a 46% entre 16 e 62 minutos e de 46% a 100% entre 62 e 72 minutos.

O mesmo procedimento foi usado para determinar os oligopeptídeos contidos nos extratos solúveis em 70% de etanol das massas fermentadas.
15

Uso de proteases fúngicas em associação com bactérias do ácido láctico e bifidobactérias

Para produzir massa azeda isenta de glúten (<200 ppm), a MISTURA 1 foi usada em associação com 200 ppm de proteases fúngicas rotineiramente usadas em produtos de panificação. Durante a fermentação, a
20 atividade complementar das atividades proteolíticas das bactérias e das fontes fúngicas resultou em um aumento acentuado especialmente das frações de gliadina e glutenina. Os extratos solúveis em etanol da massa azeda fermentada mostraram uma concentração de glúten menor que 200 ppm conforme determinada pelo uso do anticorpo monoclonal R5.
25

Análise de Western blot com anticorpo monoclonal R5 e Análise de RAPD PCR

A massa fermentada (37°C por 24 horas) com a MISTURA 1 (cerca de 10^9 CFU por grama de massa) foi misturada com os ingredientes
30 não protéicos e farinha tolerada (por exemplo, milho) para produzir biscoitos italianos e submetida ao cozimento a 250°C por 15 minutos. Os biscoitos italianos fabricados sem fermentação com a MISTURA 1 foram usados como

- controle. Os biscoitos foram analisados por Western blot com anticorpo monoclonal R5 e por RAPD PCR no Centro Nacional de Biotecnologia, Gluten Unit (28049, Madri, Espanha). O anticorpo monoclonal R5 reconhece peptídeos celíacos tóxicos potenciais: QQPFP e 33-mer. RAPD PCR foi efetuada com base nas seqüências de DNA específicas que estão relacionadas aos peptídeos tóxicos potenciais.

Hidrólise de proteínas sal-solúveis da farinha de trigo (albuminas e globulinas)

- Albuminas e globulinas foram extraídas da farinha de trigo pelo método de Weiss (1993). A mistura de ensaio contendo 0,8 mL de albuminas/globulinas (cerca de 3 mg/mL) em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,0, 5×10^9 CFU/mL da MISTURA 1 E NaN_3 a 0,05%. A incubação foi a 37°C por 24 horas sob condições agitadas. Um controle sem células microbianas foi incluído no teste. Depois da incubação, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação e usado para eletroforese. Proteínas da fração solúvel em água/sal (albuminas e globulinas) foram analisadas por immunoblotting (Curioni, A., et al., 1999, Clin. Exp. Allergy, 29:407-413) para detectar a ligação de IgE dos soros reunidos de pacientes atópicos, previamente caracterizados como sofrendo de sintomas gastrointestinais relacionados à ingestão de trigo. Pelo uso de um blotting semi-seco, bandas de proteínas, separadas por SDS-PAGE, foram transferidas para folhas de nitrocelulose com uma Trans-blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Milão, Itália) com um tampão de transferência contendo 48 mM de Tris, pH 9,2, 39 mM de glicina, 20% de metanol e 0,1% de SDS, por 5 horas, a 50 V de tensão. Bandas de blotting foram visualizadas por encharcamento das membranas por uns poucos minutos em Ponceau S (0,1% em ácido tricloroacético a 3%) e marcadas com um lápis, antes da descoloração em água. As membranas foram bloqueadas com TBS contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado (M-TBS-T), por 2 horas, e incubadas durante a noite com soros reunidos de pacientes, diluídos 1:20 em TBS-T. Depois de cinco lavagens com M-TBS-T, os blots foram incubados por 1 hora com anticorpo conjugado de IgE peroxidase anti-humana monoclonal (Sigma Chemical Co), diluídos 1:5.000 em M-

TBS-T (Curioni, et al.; 1999). Depois de quatro lavagens em M-TBS-T e uma em TBS, IgE ligada foi visualizada por quimioluminescência usando kit de Detecção Supersignal (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O procedimento foi efetuado à
5 temperatura ambiente.

Em comparação com o controle, os perfis de SDS-PAGE das frações de gliadina extraídas das massas fermentadas com as quatro preparações de células mostraram que nem todas as preparações de células tinham a mesma capacidade para degradar gliadinas. Hidrólise foi muito alta
10 para a MISTURA 1 da invenção, somente mais leve para a MISTURA 2, enquanto as outras preparações de células (MISTURAS 3 e 4) não renderam uma degradação apreciável.

As diferenças entre as quatro preparações de células foram confirmadas por análise de RP-FPLC das frações protéicas solúveis em 70% de etanol que renderam uma visão total dos oligopeptídeos com massas moleculares aparentes menores que aquelas detectáveis por eletroforese.
15

Os resultados acima deram uma grande evidência do maior desempenho da MISTURA 1 que pareceu ter uma atividade proteolítica mais especificamente direcionada às gliadinas.

Quando as espécies bacterianas, que compuseram a MISTURA 1, foram usadas individualmente na mesma concentração de cerca de 10^9 células por grama de massa, nenhuma das 8 espécies renderam hidrólise acentuada como mostrada pela mistura. Essa foi a primeira evidência da atividade proteolítica complementar entre as espécies de pelo menos 6 cepas que são usadas na MISTURA 1 em proporção bem definida.
20
25

Gliadinas e oligopeptídeos relacionados são caracterizados por uma grande proporção de resíduos de prolina dentro de suas seqüências (Wieser, 1996, *Acta Pediatr. Suppl.*, 412:3-9). A prolina é única entre os 20 aminoácidos por causa de sua estrutura cíclica. Essa conformação específica impõe muitas restrições nos aspectos estruturais dos peptídeos e proteínas, tornando-os extremamente resistentes à hidrólise. Para lidar adequadamente com tais peptídeos, um grupo de peptidases específicas é neces-
30

sário para hidrolisar todas as ligações peptídicas, nas quais o resíduo de prolina ocorre como substrato potencial nas diferentes posições (Cunningham e Connor; 1997, *Biochim. Biophys. Acta*, 1343:160-186). Preliminarmente, as atividades de peptidase específicas da prolina da MISTURA 1 foram caracterizadas pelo uso de substratos sintéticos tais como Pro-*p*-NA, Leu-*p*-NA, Ala-*p*-NA, Leu-Leu, Val-Leu, Pro-Gly, Gly-Pro-Ala, Leu-Leu-Leu, Z-Gly-Pro-*p*-NA e NCBZ-Glu-Gly-Leu-*p*-NA que são relativamente específicos para as enzimas prolina iminopeptidase, aminopeptidase, dipeptidase, prolinase, prolidase, dipeptidil peptidase, tripeptidase, prolil-endopeptidase e endopeptidase, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1

Atividades das enzimas da MISTURA 1.

Substrato	Tipo de enzima	Concentração do substrato (mM)	Unidade da atividade (U)
Pro- <i>p</i> -NA	Prolina iminopeptidase	2	3,2 ± 0,02
Leu- <i>p</i> -NA	Aminopeptidase	2	8,4 ± 0,04
Ala- <i>p</i> -NA	Aminopeptidase	2	12,3 ± 0,05
Leu-Leu	Dipeptidase	2	15,51 ± 0,03
Val-Leu	Dipeptidase	2	17,22 ± 0,07
Pro-Gly	Prolinase	3	8,0 ± 0,02
Val-Pro	Prolidase	2	3,03 ± 0,02
Gly-Pro-Ala	Dipeptidil peptidase IV/carboxipeptidase P	2	2,73 ± 0,01
Leu-Leu-Leu	Tripeptidase	2	10,63 ± 0,41
Z-Gly-Pro- <i>p</i> -NA	Prolil-endopeptidase	2	1,3 ± 0,01
NCBZ Gly-Gly-Leu- <i>p</i> -NA	Endopeptidase	2	1,9 ± 0,02

Cada valor é a média de três ensaios enzimáticos, e os desvios-padrão foram calculados. Uma unidade da atividade da enzima (U) nos substratos *p*-NA foi definida como a quantidade da enzima que produziu um aumento da absorbância a 410 de 0,01/minuto. Uma unidade nos polipeptídeos foi a quantidade de enzima que libera 1 micromol de substratos/minuto.

Todas as atividades enzimáticas acima foram largamente distribuídas na preparação da MISTURA 1. Já que é muito raro que uma cepa

microbiana única possa possuir todas as atividades enzimáticas prévias (Cunningham e O'Connor; 1997; Kunjii et al.; 1996, Antoine Van Leeuwenhoek 70:187-221; Di Cagno et al.; 2004), somente uma coleção de bactérias selecionadas, tais como aquelas contidas na MISTURA 1, pode ter o

5 padrão completo das peptidases necessária para hidrólise de oligopeptídeos ricos em Pro.

A hidrólise dos oligopeptídeos de gliadina pela preparação da MISTURA 1 durante a fermentação da massa foi ainda caracterizada por análise 2DE. Oitenta e quatro manchas de proteínas foram identificadas na

10 massa acidificada quimicamente usada como controle (Figura 1A). Setenta e nove das 84 manchas de oligopeptídeos de gliadina foram acentuadamente degradadas depois da fermentação da massa com a MISTURA 1 em comparação com o controle (Figura 1B). A Tabela 2 refere-se aos fatores de hidrólise das manchas identificadas por 2DE. A maioria dos oligopeptídeos de-

15 gradados (65 dos 79) apresentou fatores de hidrólise maiores que 80% e somente 8 mostraram fatores de hidrólise menor que 40%.

Tabela 2

Propriedades dos polipeptídeos solúveis em álcool hidrolisados pela MISTURA 1 depois da incubação da massa a 37°C por 24 horas

Designação do ponto ^b	pI Estimado	Massa molecular estimada (kDa)	Fator de hidrólise
1	6,84	51,0	54,0
2	7,15	49,8	90,5
3	6,55	49,5	85,0
4	6,38	49,0	92,0
5	7,52	48,9	95,4
6	9,40	48,7	87,0
7	7,64	48,5	90,6
8	7,98	48,4	85,0
9	8,05	48,3	90,8
10	9,52	48,1	96,2
11	9,15	48,0	91,5
12	9,87	47,9	90,0

Designação do ponto ^b	pI Estimado	Massa molecular estimada (kDa)	Fator de hidrólise
13	9,70	47,8	97,7
14	6,83	47,7	85,0
15	9,10	47,6	92,5
16	9,69	47,0	90,8
17	9,25	46,3	90,8
18	7,08	46,0	52,5
19	8,70	44,5	93,2
20	6,54	44,0	95,6
21	6,63	43,2	0,0
22	7,10	43,0	10,0
23	6,70	42,9	91,4
24	8,04	42,6	67,0
25	6,35	42,5	0,0
26	6,04	41,8	0,0
27	6,49	41,7	87,7
28	6,40	41,6	16,0
29	6,78	41,4	95,0
30	7,00	41,3	47,5
31	7,58	41,2	93,2
32	8,55	41,1	90,1
33	8,45	41,0	85,4
34	8,25	40,9	86,2
35	8,00	40,8	20,5
36	8,68	40,7	93,1
37	8,85	40,65	88,6
38	8,90	40,6	84,8
39	9,18	40,55	81,5
40	6,37	40,5	45,6
41	6,56	40,4	82,0
42	7,20	40,0	93,0
43	6,05	39,9	95,2
44	6,26	39,8	24,8

Designação do ponto ^b	pI Estimado	Massa molecular estimada (kDa)	Fator de hidrólise
45	6,48	39,7	95,0
46	6,57	39,6	44,5
47	6,81	39,5	93,5
48	9,55	39,3	91,7
49	7,57	39,0	92,4
50	7,95	38,9	87,9
51	7,80	38,7	92,0
52	8,05	38,6	58,2
53	9,20	38,5	90,8
54	6,62	38,3	0,0
55	6,26	38,2	90,7
56	7,12	38,1	94,8
57	9,64	38,0	93,1
58	8,08	37,9	94,5
59	6,60	37,8	85,7
60	6,26	37,5	91,5
61	6,40	37,3	90,4
62	7,10	37,1	94,8
63	8,06	36,7	91,2
64	9,20	36,5	90,0
65	6,61	36,3	95,7
66	6,85	36,0	90,0
67	8,75	35,8	95,2
68	6,15	35,7	24,8
69	9,65	35,6	95,0
70	9,00	35,5	44,5
71	8,20	35,2	93,5
72	8,48	34,9	91,7
73	8,60	34,7	95,0
74	8,98	34,5	87,9
75	9,14	34,3	82,0
76	9,37	34,1	85,0

Designação do ponto ^b	pI Estimado	Massa molecular estimada (kDa)	Fator de hidrólise
77	9,60	33,9	90,8
78	9,51	33,6	0,0
79	8,90	33,0	90,7
80	7,15	32,2	94,8
81	9,45	30,3	90,5
82	9,46	29,3	88,5
83	9,47	28,0	94,7
84	9,48	26,6	96,5

^aAnálises foram realizadas com o software Image Master (Pharmacia). Quatro géis em replicação independentes foram analisados. Para quantificação da mancha e cálculo do fator de hidrólise, vide Materiais e Métodos. Todos os fatores de hidrólise foram calculados com base na média das intensidades das manchas de cada um dos quatros géis, e os desvios-padrão foram calculados. ^bA designação de mancha corresponde àqueles géis na Figura 1A e 1B.

Os resultados acima mostraram que a MISTURA 1 tinha capacidade para hidrolisar quase totalmente os oligopeptídeos de gliadina.

A atividade da MISTURA 1 foi ainda caracterizada *in vitro* em relação a alguns dos oligopeptídeos reportados na literatura como os principais responsáveis pelo CS; o fragmento 62-75 da A-gliadina (Silano e De Vincenzi; 1999) e o epítipo 33 –mer (Shan et al.; 2002). Como mostrado pela análise de RP-FPLCA, o fragmento 62-75 da A-gliadina, em uma concentração de 450 μ M, foi completamente hidrolisado depois de 6 horas de incubação com 5×10^9 cfu/mL de células da MISTURA 1. O epítipo 33-mer, em uma concentração de 200 μ M, foi completamente hidrolisado depois de 24 h de incubação com a mesma concentração de células da MISTURA 1 (Figura 2). A cinética da hidrólise do 33-mer foi determinada pela plotagem de Lineweaver-Burk mostrando uma $V_{\max}$ de 0,26 μ mol por mililitro por minuto e uma K_m de 216 μ M. Como anteriormente reportado na literatura, deve ser observado que o epítipo 33-mer tem as seguintes propriedades: (1) ele permanece intacto apesar da prolongada exposição às proteases gástricas e

pancreáticas; (ii) ele mostra uma hidrólise menor que 20% durante 20 h de incubação com pequenas enzimas da membrana da borda em escova; e (iii) ele permanece intacto por um longo tempo (cerca de 24 h) no intestino delgado e mesmo em baixa concentração age como potencial antígeno para a
 5 proliferação de células T (Shan, et al., 2002). Os resultados acima mostraram que a MISTURA 1 continha a coleção complexa de atividades enzimáticas necessárias para hidrolisar completamente o 33-mer e que essas atividades são acentuadamente maiores que aquelas localizadas no nível gastrointestinal.

10 Em comparação com as referências à gliadina européias, o Western blot por anticorpo monoclonal R5 dos biscoitos italianos tinham o perfil típico da gliadina intacta. Uma vantagem principal do anticorpo monoclonal R5 é sua capacidade de reconhecer a seqüência de aminoácidos de consenso QXPW/FP (Osman, et al.; 2001, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*,
 15 13: 1189-1193) correspondente às repetições de epítomos imunorreativos múltiplos, que ocorrem nas α -, γ - e ω -gliadinas, bem como em diferentes variedades de trigo (Shewry et al.; 1992, *Cereal's protein and celiac disease. In: Celiac disease*, Marsh M. [ed], Oxford, Blackwell Scientific Publications pp. 305-348). A maior reatividade tem sido associada à seqüência de aminoácidos QQPFP, mas repetições homólogas tais como LQPFP, QLOPYP, QLPTF, QQSFP, QQTFF, PQPPP, QQPYP e PQPFP são também reconhe-
 20 cidas com uma reatividade mais fraca para o anticorpo R5 (Osman, et al.; 2001). É interessante notar que três desses epítomos (LQPFP, QLPYP e PQPFP) são colocados na seqüência do indutor potente de linhagens de
 25 células T humanas derivadas do intestino de pacientes celíacos, do peptídeo A-gliadina 33 –mer (Shan, et al.; 2002). O Western blot dos biscoitos italianos fermentados com a MISTURA 1 mostrou uma quase degradação das α -, β - e γ -gliadinas reconhecidas pelo anticorpo monoclonal.

Os mesmos resultados foram confirmados por análise de RAPD
 30 PCR.

Experimentos preliminares para a identificação de frações alérgicas das albuminas e globulinas do trigo indicaram que 100% dos soros

testados foram positivos contra frações de albumina e globulina. As respostas foram verificadas contra componentes de proteínas com massas moleculares aparentes de 15 a 70 Kda, com uma coloração intensa para alguns soros em torno de 15 a 45 KDa. Como determinado por DAS-PAGE monodimensional, a comparação das albuminas e globulinas não tratadas com aquela hidrolisada pela preparação de MISTURA 1 realçou a hidrólise de vários polipeptídeos alergênicos potenciais.

Exemplo 2

A massa azeda preparada de acordo com o Exemplo 1 foi usada na fabricação de produtos cozidos.

Os produtos cozidos conforme descritos nos Exemplos da Patente US 6.884.443 foram preparados pelo uso da composição da massa de acordo com a presente invenção em vez daquele da patente. Fermentação foi efetuada a 37°C por 24 horas conforme descrito no Exemplo 1 acima e foi usada a MISTURA 1.

Os produtos ficaram mais digeríveis e adequados para pacientes infectados com doença celíaca.

Exemplo 3

A massa azeda preparada de acordo com o Exemplo 1 com a MISTURA 2 foi usada na fabricação da massa.

A massa ficou mais digerível e pode ser ingerida por pacientes afetados por doença celíaca.

Exemplo 4

MISTURA 1 de acordo com o Exemplo 1 foi usada na fabricação de talharins de acordo com o ensinamento do US 2002/0160093.

Os Exemplos 1-4 do US 2002/01600993 foram repetidos, exceto pelo fato que um pacote contendo a MISTURA 1 de acordo com a presente invenção foi adicionada à mistura de kansui e farinha. Depois de amassada, a mistura foi deixada em repouso a 37°C por 24 horas. Então os talharins foram preparados conforme descrito na referência.

O produto ficou mais digerível e adequado para pacientes afetados pela doença celíaca.

Exemplo 5

A MISTURA 2 de acordo com o Exemplo 1 foi usada na fabricação de talharins de acordo com o ensinamento do WO 99/65331.

Os Exemplos 1-2 do WO 99/65331 foram repetidos, exceto pelo
5 pacote contendo a MISTURA 2 de acordo com a presente invenção que foi adicionado ao ingrediente para a massa. Depois de misturada, a massa foi deixada em repouso por 37°C por 24 horas. Então os talharins foram preparados como descrito na referência.

O produto ficou mais digerível e adequado para pacientes afeta-
10 dos por doença celíaca.

Exemplo 6

A MISTURA 1 de acordo com o Exemplo 1 foi usada na fabricação de derivados de pão de acordo com o ensinamento da EP 0 614 609.

Os Exemplos 1 a 5 da EP 0 614 609 foram repetidos, exceto pe-
15 lo fato de que um pacote contendo a MISTURA 1 de acordo com a presente invenção foi adicionada à preparação da massa. Depois de amassada, a massa foi deixada em repouso a 37°C por 24 horas. Os produtos foram então preparados como descrito na referência.

O produto ficou mais digerível e adequado para pacientes afeta-
20 dos por doença celíaca.

Exemplo 7

A MISTURA 2 de acordo com o Exemplo 1 foi usada na fabricação de espaguete de acordo com o ensinamento de EP 1 338 209.

O Exemplo da EP 1 338 209 foi repetido, exceto pelo fato de que
25 um pacote contendo uma MISTURA 2 de acordo com a presente invenção foi adicionado ao ingrediente para a massa. Depois de misturada, a massa foi deixada em repouso a 37°C por 24 horas. Então os talharins foram preparados conforme descrito na referência.

O produto ficou mais digerível e adequado para pacientes afeta-
30 dos pela doença celíaca.

Exemplo 8

Ramyun

Composição:

1. Talharim

	Farinha:	83-85%
	Óleo Refinado:	15-18%
5	Sal:	1%
	Outros:	0,6-1%

2. Base para Sopa Seca

Floco de Bife Seco, Molho de Soja, Glutamato Monossódico, Glutamato Dissódico, Aditivo Aromatizante, Glicose, Alho, Cebola, Cebola Verde, Pó de Pimenta Vermelha, Outro ingrediente aromatizante.

Processo de Fabricação de Ramyun

Farinha (algumas vezes amido, farinha de arroz, farinha de cevada podem ser usadas em uma razão diferente) e água são misturadas de acordo com a recomendação do fabricante. A MISTURA 1 foi adicionada à massa e deixada em repouso a 37°C por 24 horas.

Foi passado o rolo na massa misturada com rolo de pressão e então a massa foi colocada através da máquina para fazer as tiras do talharim. A conformação e espessura do talharim podem ser modificadas para a espessura e conformação desejadas por ajuste do tamanho da fenda da máquina de fazer tiras e também da velocidade da correia de transporte do talharim.

O talharim passou através da caixa de vapor cuja temperatura é mais alta que 100°C para induzir o amido pré-gelatinizado (-amido) a tornar a digestão mais fácil.

Depois de processo de vapor, o talharim é formado na conformação determinada pela caixa de moldagem.

Processo de Fritura em Profundidade: Dependendo do tipo de Ramyun, a desidratação ocorre através do processo de fritura em profundidade. O talharim passa através do processo de fritura em profundidade a 150°C. Alguns Ramyun não passa por esse processo de fritura em profundidade.

Depois do processo de fritura em profundidade, o Ramyun para

através do processo de resfriamento.

De acordo com a presente invenção, a mistura específica das bactérias do ácido láctico e bifidobactérias é adequada para a fabricação de alimento à base de cereal, em particular artigos cozidos, que podem ser
5 mais tolerados por pacientes com SC. Em particular, as seguintes vantagens são proporcionadas:

- (i) capacidade acentuada de degradar oligopeptídeos de gliadina durante a fermentação;
- (ii) hidrólise de 79 dos 84 oligopeptídeos de gliadina identificados por
10 análise de 2DE;
- (iii) atividades enzimáticas complementares e grandes com relação os peptídeos sintéticos que incluíam prolina nas diferentes posições;
- (iv) capacidade de completamente hidrolisar oligopeptídeos (fragmento 62-75 de A-gliadina e epítipo 33-mer), que são responsáveis por CS;
- 15 (v) capacidade de reduzir significativamente as α -, β - e γ -gliadinas que reagiram com o anticorpo monoclonal R5;
- (vi) capacidade de hidrolisar vários polipeptídeos alergênicos;
- (vii) quando a atividade das bactérias acima é suplementada com proteases fúngicas e usadas com respeito a 20% de farinha de trigo sob
20 fermentação líquida, ela aumenta bastante a produção de farinha de trigo isenta de glúten.

REIVINDICAÇÕES

1. Massa azeda, caracterizada pelo fato de que compreende uma mistura de pelo menos 6 espécies de bactérias do ácido láctico e/ou bifidobactérias selecionadas do grupo que consiste em: *Lactobacillus aci-*
5 *dophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,
Lactobacillus helveticus, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*,
Bifidobacterium infantis, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophi-*
lus, *Bifidobacterium lactis*, em que pelo menos uma espécie de bactéria de
10 ácido láctico e pelo menos uma bifidobactéria está presente, e uma enzima
proteolítica microbiana e que apresenta uma concentração de glúten menor
que 200 ppm.

2. Massa azeda de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita mistura de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias compreende *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifido-*
15 *bacterium longum*, *Bifobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobaci-*
llus plantarum, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgari-*
cus, ou a dita mistura compreende *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacte-*
rium lactis, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*
plantarum, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*.

20 3. Massa azeda de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita enzima proteolítica é de fonte fúngica ou bacteriana.

4. Massa azeda de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a dita enzima proteolítica é obtida da *Aspergillus* sp.

5. Composição de fermentação, caracterizada pelo fato de que
25 compreende uma mistura de pelo menos 6 espécies de bactérias do ácido
láctico e/ou bifidobactérias selecionadas do grupo que consiste em *Lactoba-*
cillus acidophilus, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulga-*
ricus, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bre-*
ve, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus ther-*
30 *mophilus*, *Bifidobacterium lactis*, em que pelo menos uma espécie de bacté-

ria de ácido láctico e pelo menos uma bifidobactéria está presente, e uma
enzima proteolítica microbiana e que apresenta uma concentração de glúten

menor que 200 ppm.

6. Composição de fermentação de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a dita mistura de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias compreende *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifobacterium breve*, *Lactobacillus aci-*
 5 *dophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbru-*
eckii subsp. *bulgaricus*, ou a dita mistura compreende *Streptococcus ther-*
mophilus, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus aci-*
dophilus, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveti-*
 10 *cus*.

7. Composição de fermentação de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a dita enzima proteolítica é de fonte fúngica ou bacteriana.

8. Composição de fermentação de acordo com a reivindicação 7,
 15 caracterizada pelo fato de que a dita enzima proteolítica é obtida da *Asper-*
gillus sp.

9. Uso da massa azeda como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou da composição de fermentação como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que é na
 20 fabricação de um artigo cozido.

10. Alimento amiláceo, em particular um alimento à base de cereal, que compreende uma mistura de pelo menos 6 espécies de bactérias do ácido láctico e/ou bifidobactérias selecionadas do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*
 25 subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifido-*
bacterium breve, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Strepto-*
coccus thermophilus, *Bifidobacterium lactis*, em que pelo menos uma espécie de bactéria de ácido láctico e pelo menos uma bifidobacteria está presente, e uma enzima proteolítica microbiana e que apresenta uma concentração
 30 de glúten menor que 200 ppm.

11. Alimento de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a mistura de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias

compreende *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ou a dita mistura compreende *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*.

12. Alimento de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que é um alimento cozido.

13. Alimento de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste em biscoitos, pastéis, bolos, tortas, pizza, bolachas, palitos de pão, lanchinhos, massa, talharins, tortilhas, rodela de milho, cereais extrudados e cereais em tira, ramyun.

14. Artigo cozido de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita enzima proteolítica é de origem fúngica ou bacteriana.

15. Artigo cozido de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a dita enzima proteolítica é obtida da *Aspergillus* sp.

16. Embalagem para um artigo cozido, caracterizado pelo fato de que compreende os ingredientes usuais e uma composição de fermentação como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 8.

17. Processo para a preparação de um artigo cozido, caracterizado pelo fato de que compreende a adição da preparação de massa azeda como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 aos ingredientes usuais.

18. Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

a) pré-fermentação líquida de cerca de 20 a 50% de farinha de trigo em peso (mistura integral de 20% a 50% de farinha e 80% a 50% de água, rendimento da massa de cerca de 300) com cerca de 10^9 células da mistura conforme descrita em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 por grama de massa, a 37°C, por pelo menos cerca de 24 horas, preferivelmente entre cerca de 24 e cerca de 31 horas;

b) depois da fermentação, misturar a massa com uma ou mais farinhas toleradas, tal como farinha de milheto, para ter um rendimento final de massa de 150 (massa sólida), e adicionada de levedura de padeiro comercial a uma concentração de cerca de 1% em peso;

5 c) incubar a massa a cerca de 37°C, por cerca de 2 horas, até que a fermentação esteja completa;

d) cozer a 250°C por cerca de 20 minutos.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que na etapa b) a massa é misturada com a farinha tolerada.

10 20. Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a farinha tolerada é seleccionada do grupo que consiste em farinhas de feijão, trigo-sarraceno, linhaça, milho ("maize"), farinhas de leguminosas, milheto, Gramínea de Arroz Cultivado na Índia, farinhas de nozes, quinoa, farinha de batata, farinha de batata doce, sago, farinhas de se-
15 mente, sorgo, soja, tapioca, teff.

21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a adição de proteases fúngicas.

22. Processo de acordo com a reivindicação 21, quando dependente de qualquer uma das reivindicações 19 a 21, caracterizado pelo fato de que, na etapa a), a dita adição é efetuada a 37°C e fermentada por 24 a 31 horas e a farinha de trigo é 20% em peso.

23. Artigo cozido, caracterizado pelo fato de que é obténível pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 17 a 22.

25 24. Artigo cozido, em particular de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que contém uma ou mais farinhas toleradas.

25. Artigo cozido de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita farinha tolerada é seleccionada do grupo que consiste em farinhas de feijão, trigo-sarraceno, linhaça, milho ("maize"), farinhas de leguminosas, milheto, Gramínea de Arroz Cultivado na Índia, farinhas de nozes, quinoa, farinha de batata, farinha de batata doce, sago, farinhas de semente, sorgo, soja, tapioca, teff.

26. Alimento de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 15 ou 23 a 25, caracterizado pelo fato de que ainda compreende um prebiótico.

5 27. Alimento como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 15 ou 23 a 25, caracterizado pelo fato de que é combinado com uma composição à base de gordura, essencialmente isenta de água, compreendendo bactérias lácticas liofilizadas.

10 28. Produto isento de glúten, ou um produto com um nível reduzido de glúten, caracterizado pelo fato de que é como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 15 ou qualquer uma das reivindicações 23 a 25.

29. Produto para dieta entérica, caracterizado pelo fato de que compreende uma mistura conforme descrita em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

15 30. Uso da massa azeda como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e/ou da composição de fermentação como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um alimento, em particular um artigo cozido para a integração da dieta de um paciente que sofre de doença celíaca.

20 31. Uso da massa azeda como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e/ou da composição de fermentação como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um alimento, em particular um alimento cozido para manter a tolerância ao glúten em um paciente que sofre de doença celíaca.

25 32. Uso da massa azeda como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e/ou da composição de fermentação como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 8 na fabricação de um alimento, em particular um alimento cozido para induzir tolerância ao glúten em um paciente que sofre de doença celíaca.

30 33. Uso da massa azeda como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e/ou da composição de fermentação como definida em qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um alimento, em particular um artigo cozido para diminuir o

risco de alergias devidas às albuminas e globulinas da farinha de trigo.

34. Uso da mistura como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um artigo dietético útil para o tratamento de sintomas esquizofrênicos em um paciente
- 5 celláco.

35. Uso da mistura como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um produto para administração oral para melhorar a digestão do glúten e das substâncias relacionadas ao glúten.

Fig.1

Análise 2DE de frações de proteína gliadina de diferentes massas feitas de farinha de trigo. (A) Massa azeda quimicamente acidificada (controle). Massa incubada por 24 h a 37°C com a Mistura 1. Mr, massa molecular.

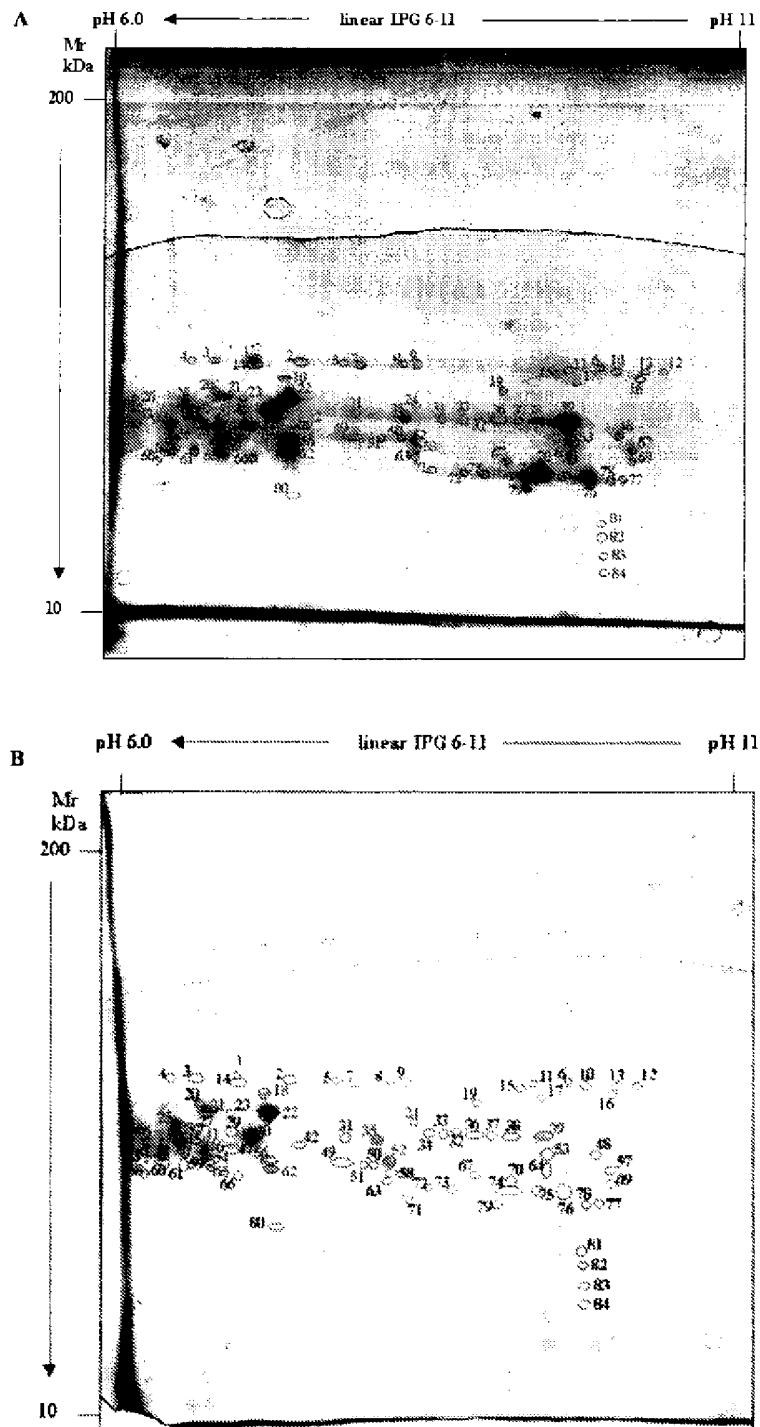
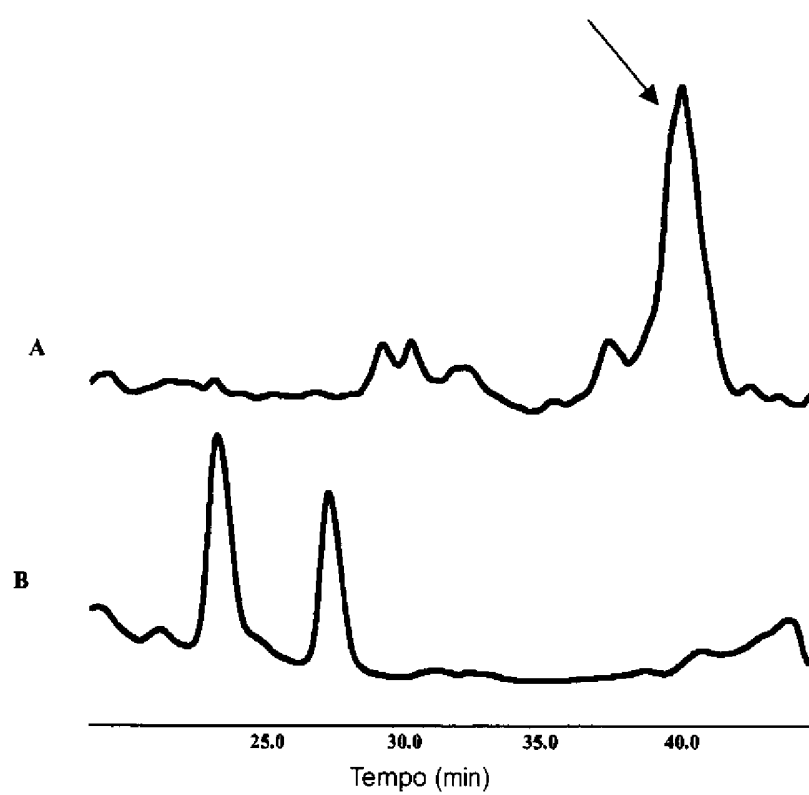


Fig.2
Hidrólise de peptídeo 33-mer pela MISTURA 1 (10^9 CFU/mL): sem
inóculo microbiano (A) e depois da hidrólise pela MISTURA 1 (B)



RESUMO

Patente de Invenção: "**MISTURA DE PELO MENOS 6 ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO E/OU BIFIDOBACTÉRIAS NA FABRICAÇÃO DE MASSA AZEDA**".

- 5 A presente invenção refere-se a uma mistura de pelo menos 6 espécies de bactérias do ácido láctico e/ou bifidobactérias que é descrita para uso em panificação e no campo médico. A mistura preferida compreende *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A referida mistura é útil para massa azeda, composição de fermentação. Artigos cozidos e outros produtos alimentícios obtidos desta são descritos. Esses artigos têm um baixo teor ou nada de glúten e são adequados para a integração da dieta de um paciente que sofre de doença celíaca, para diminuir o
- 10
- 15 risco de alergias devidas às albuminas e globulinas da farinha de trigo, para o tratamento de sintomas esquizofrênicos, na preparação de produtos para dieta entérica.