

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 345 940**

51 Int. Cl.:

C12C 5/00 (2006.01)

C12C 12/00 (2006.01)

A23L 2/84 (2006.01)

A23L 1/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2005 PCT/EP2005/055881**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2006 WO06051093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2005 E 05810988 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **08.06.2022 EP 1812548**

54 Título: **Bebidas con contenido reducido de prolamina y procedimientos de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

10.11.2004 EP 04105672

11.11.2004 US 626760 P

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

18.08.2022

73 Titular/es:

DÖHLER GMBH (100.0%)

Riedstrasse 7-9

64295 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

PASTERNAK, RALF;

MARX, STEFAN y

JORDAN, DOMINIK

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 345 940 T5

DESCRIPCIÓN

Bebidas con contenido reducido de prolamina y procedimientos de preparación de las mismas

La presente invención se refiere a bebidas que tienen un contenido reducido de prolamina y a procedimientos para la preparación de las mismas.

5 Prolaminas (gluten) son un grupo heterogéneo de proteínas solubles en etanol de varias especies de cereales y son referidas como gliadinas en trigo, hordeinas en cebada, secalinas en centeno y aveninas en avena. A pesar de las diferencias estructurales dentro de las secuencias principales, las prolaminas también son referidas frecuentemente generalmente como glútenes o gliardinas no importando si éstas son derivadas de trigo o una especie de cereal diferente. Un gran número de especies de cereales empleados en las industrias de alimentos y bebidas contienen
10 prolaminas, en parte en cantidades significativas. En una manera ejemplificante para la industria de bebida, pueden mencionarse: todos los tipos de bebidas de cerveza y mezclas de cerveza, bebidas no alcohólicas basadas en malta (por ejemplo, cerveza de malta), malta o cereal de café. Con un consumo anual por persona de aproximadamente 80 litros, la cerveza es aún una de las bebidas con mayor consumo en Europa. Alternativamente, las bebidas de mezcla de cerveza y bebidas innovadoras así llamadas con un beneficio adicional gozan de una popularidad creciente entre la población más joven. Por esta razón y debido a sus ingredientes de alto valor en términos de fisiología de nutrición, se predicen buenas probabilidades de mercado para bebidas basadas en materias primas de cereal. Sin embargo, puesto que todas estas bebidas siempre contienen prolaminas (gluten) en varias concentraciones, el consumo de tales bebidas es estrictamente prohibido para pacientes celíacos.

La enfermedad celíaca o celiacía es una enfermedad crónica auto-inmune que se activa por ciertas proteínas de cereal (prolaminas, gluten) en pacientes predispuestos genéticamente. En pacientes celíacos, tienen lugar síndromes de mala absorción intestinal debido a lesiones extendidas de la mucosa del intestino delgado causadas por la acción del gluten mayoritariamente ya en el primero o segundo año de vida. La inmensa mayoría de los pacientes expresan las así llamadas moléculas HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8. La visión científica actual considera que la proliferación de linfocitos T es inducida por la interacción de moléculas específicas de gliadina con antígenos HLA-DQ2/HLA-DQ8. Esta respuesta inmune enorme se ve en una relación causal con la degeneración de la mucosa del
20 intestino delgado. Cuando la acción del gluten continúa, la regeneración epitelial se torna insuficiente causando atrofia de las vellosidades del intestino delgado y un desempeño de absorción reducido, crecimiento cero, distrofia, deficiencia iónica muscular, heces con mal olor; existe incluso la posibilidad de sarcomas malignos. Síntomas adicionales incluyen depresión y anemia.

Puesto que actualmente no existen medicamentos que den como resultado una cura de la enfermedad celíaca/celiacía, la única terapia posible consiste en una renuncia durante toda la vida de alimentos que contengan gluten. Mientras que una tasa de incidencia de 1: 1200 para las naciones industriales en años recientes, hoy está establecida una abundancia de 1:100 a 1:200 por exámenes extensos y por posibilidades de diagnóstico mejoradas, de forma que se puede considerar que la enfermedad celíaca es la enfermedad del intestino crónica más frecuente en la población occidental.
35

Dermatitis herpetiformis o enfermedad de Brocq-Duhring es una dermatosis papulovesicular (pápulas = nódulos; vesículas = pequeñas ampollas) con comezón severa. Los pacientes que sufren de la enfermedad de Broca-Duhring también tienen enfermedad de celiacía en hasta el 24% de los casos, aunque los síntomas típicos de la última enfermedad pueden estar frecuentemente ausentes. En biopsias del intestino delgado, incluso hasta el 85% de los
40 pacientes con dermatitis herpetiformis tienen alteraciones con atrofia de vellosidades variable típica de la enfermedad celíaca. De acuerdo con ello, los pacientes que sufren de dermatitis herpetiformis Duhring deberían realmente ser examinados en busca de enfermedad celíaca. En tales casos, un régimen libre de gluten da como resultado mayoritariamente la desaparición de las lesiones de la piel en una base a largo plazo.

En la selección y cultivo de cereales alimentarios, se ha buscado un contenido alto de proteína y así de gluten por dos razones:
45

comparada con almidón y otros polisacáridos, la proteína es un componente más valioso en términos de fisiología de nutrición, y el gluten es crítico para algunas propiedades tecnológicas en el procesamiento del cereal. Así, por ejemplo, el contenido y la estructura del gluten son críticos para las propiedades físico-químicas esenciales, tales como elasticidad, propiedad de retención de gas, pegajosidad o estabilidad de fermentación de masas.

50 Por lo tanto, en todas las especies de cereal importantes, tales como trigo, centeno, cebada, pero también escanda, grano de escanda verde, escanda menor, escandia, kamut, tritical, bulgur y avena, se contienen prolaminas, lo que vuelve todos los alimentos y bebidas producidas a partir de los mismos inadecuados para consumo por pacientes celíacos.

55 Cuando las especies de cereal que contienen prolamina son usadas para bebidas, se considera en la mayoría de los casos que las gliadinas también están presentes en el producto, es decir, en cantidades que imposibilitan el consumo por pacientes celíacos. Tanto el uso de cereales libres de gliadina (sarraceno, arroz, mijo, etc.) como un proceso de control durante la producción de bebida que asegure una separación general de proteínas son la mayoría de las veces imposibles por muchas razones. Además de la disponibilidad de los productos de materia

- prima, que no siempre se asegura, tales bebidas la mayoría de las veces tienen propiedades organolépticas alteradas, tales como sabor o sensación en la boca. También, las propiedades físico-químicas, tales como producción de espuma y estabilidad de espuma, la mayoría de las veces no alcanzan las de los productos tradicionales, como se espera por los consumidores. Otro problema es el riesgo de contaminación de productos de materia prima libres de gliadinas/productos intermedios libres de gliadinas con productos de materia prima que contienen gliadina/productos intermedios que contienen gliadina durante la producción, envío, almacenamiento y procesamiento.
- 5 El documento EP 0 949 329 A1 describe una cerveza libre de gluten elaborada a partir de sarraceno y almidón de maíz hidrolizado usando enzimas amilolíticas y glucanasa.
- 10 Alternativamente, las actividades de investigación actuales están dirigidas al desarrollo de variedades de cereales alteradas genéticamente que no sean más capaces de producir gliadinas. Los desarrollos están aún en una fase inicial, y no se puede predecir actualmente si o cuando estas plantas se cultivarán comercialmente, si las materias primas obtenidas de ahí pueden ser empleadas adicionalmente para el proceso de elaboración de cerveza, y que aceptación del consumidor alcanzarán finalmente tales variedades de cereales modificadas genéticamente.
- 15 Por esta razón, casi todas las bebidas obtenibles en base a las especies de cereal convencionales contienen cantidades detectables de gliadinas, y su contenido es particularmente alto en cervezas para la preparación de las cuales se usa cebada o trigo.
- Enzimas reticuladas son enzimas las cuales pueden producir uniones covalentes dentro de las proteínas o entre proteínas y otras sustancias, tales como carbohidratos, fenoles, y así causar la formación de agregados de proteína, algunas veces con la participación de otras sustancias. Representantes típicos son transglutaminasas, peroxidadas, hexosa-oxidasa, tirosinasas y laccasas, véase también Thalmann C.R. & Lötzbeyer T. 2002: Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. Eur. Food Res. Technol. 214: 276-281; Patente Estadounidense US 6, 358,543 (Procedimiento para mejorar las propiedades de una masa de harina, una composición mejorada de masa de harina y productos alimenticios mejorados), Boeriu C.G., Oudgenoeg G.; Spekking W.T., Berendsen L.B., Vancon L, Boumans H., Gruppen H., van Berkel W.J., Laane C., Voragen A.G. 2004, Horseradish peroxidasa-catalizada reticulación de arabinoxilanos feruloilado con beta-caseína. J. Agric. Food. Chem., Oct. 20, 2004, 52(21) :6633-9.
- 20 Transglutaminasas (proteína-glutamina: amina- γ -glutamilttransferasa; E.C. 2.3.2. 13) cataliza la construcción de reticulación estable entre proteínas. En esta catálisis, la función γ -carboxiamida de cadenas laterales de glutamina es transferida sobre el grupo ϵ -amino de residuos de lisina con liberación de iones de amonio (Folk y Finalyson, Adv. Protein Chem. 31, 1 a 133 (1997)).
- 25 La unión isopéptido formada también soporta hidrólisis por proteasas y se divide fisiológicamente solamente después de la degradación completa de las proteínas por γ -glutamiltamina ciclotransferasa y γ -glutamilttransferasa (Fink y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4564-4568 (1980), Seguro y col.; J. Agric. Food Chem. 43; 1977-1981 (1995)).
- 30 Para aplicaciones técnicas, la transglutaminasa bacteriana de *Streptomyces mobaraensis* es apropiada, en particular. La transglutaminasa bacteriana se deriva del no patogénico y no tóxico *Streptomyces mobaraensis*. Por la "Administración de Alimentos y Fármacos" (FDA) americana, esta preparación de TGasa se evalúa "generalmente considerada como segura" (GRAS)(GRN 000095). Debido a su producción de bajo costo, su amplio intervalo de substatos y sus proporciones de reacción altas, esta enzima está destinada para aplicaciones industriales en el campo alimentario. Como ejemplos, pueden mencionarse: reticulación de carne, pescado queso, leche, proteínas de suero, proteínas de soja y proteínas de trigo para lograr una estructura mejorada, una viscosidad más alta o una sensación a la boca confortable. El diseño de nuevos productos alimenticios por el uso de transglutaminasa fue permitido de esa manera (Yokoyama y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 447-454 (2004)).
- 35 El documento WO 02/051873 describe un proceso para obtener almidón purificado a partir de materias primas de vegetales que contienen proteína bajo la acción de agentes de reticulación, por ejemplo, transglutaminasa. Después de que las proteínas que aparecen en la materia prima o que se agregan adicionalmente se han reticulado por transglutaminasa, es posible una separación facilitada del almidón de la red proteica.
- 40 El documento WO 02/15713 revela un procedimiento para la separación de harina de trigo usando una enzima transglutaminasa.
- 45 El documento EP 1 190 624 A2 describe procedimientos para mejorar por medio de transglutaminasa la calidad de masas con contenido bajo de trigo en términos de tecnología de horneado. Empleando la enzima, podrían lograrse una propiedad de retención de gas incrementada, una pegajosidad más baja de la masa así como una estabilidad de fermentación, entre otras cosas.
- 50 El documento US 6,106,887 revela un proceso para la preparación de harinas de cereal modificadas por el uso de transglutaminasa durante el proceso de elaboración y/o molienda.
- 55 El documento EP 0 760 209 A1 revela el uso de transglutaminasa para la preparación de productos horneados que

tienen una estructura de capas múltiples.

El documento WO 01/65948 revela una preparación de proteína preparada bajo la acción de transglutaminasa a partir de proteína de trigo (gluten) y proteína de suero y que tiene propiedades tecnológicas mejoradas, tales como propiedad emulsionante, propiedad gelificante o propiedad de unión de agua.

- 5 El objeto de la presente invención era superar las desventajas mencionadas y los problemas mencionados de la técnica anterior, en particular, proporcionar un proceso para la preparación de bebidas con prolamina reducida y productos relacionados.

Este objeto se logra por un procedimiento de preparación de una bebida que tiene un contenido de prolamina reducido a partir de materias primas que contienen prolamina, que comprende las siguientes etapas:

- 10 a) poner en contacto la bebida, o un precursor de la bebida, con enzimas de reticulación a fin de obtener prolamina modificada;
- b) eliminar la prolamina modificada al menos parcialmente.

15 Materias primas que contienen prolamina apropiadas incluyen, en particular, trigo, cereales tales como centeno, avena, cebada, escanda, grano de escanda verde, escanda menor, escandia, tritical, trigo integral, kamut o mezclas de los mismos.

Enzimas de reticulación apropiadas incluyen, en particular, aquellas de las clases de enzima de transglutaminasas (EC 2.3.2.12), peroxidases (EC 1.11.1.7), oxidasas de hexosa (EC 1.1.3.5), tirosinasas (EC 1.14.18.1), laccasas (EC 1.10.3.2), isomerasas de disulfuro de las proteínas (EC 5.3.4.1) y combinaciones de las mismas.

20 Enzimas de reticulación particularmente preferidas incluyen transglutaminasas bacterianas, especialmente transglutaminasas independientes de Ca^{2+} de *Streptomyces mobaraensis*.

“Prolaminas” dentro del significado de esta solicitud incluyen proteínas solubles en etanol de especies de cereales, que se refieren también como gluten, gliadinas, hordeinas, secalinas o aveninas.

“Bebida” significa un alimento que puede ingerirse en una forma líquida.

25 “Base de bebida” o “concentrado de bebida” significa un precursor para la preparación de un alimento en forma sólida o líquida, que puede ser ingerido como un alimento después de procesamiento adicional.

Por el proceso de conformidad con la invención, el contenido de prolamina en las bebidas, concentrados de bebida o precursores de bebida puede ser reducido, en lo que las propiedades físico-químicas de la bebida son alteradas tan poco como sea posible.

30 Por ejemplo, el tratamiento con transglutaminasa de conformidad con la invención puede usarse para la preparación de cervezas cuyas propiedades organolépticas y físico-químicas son similares a aquellas de las cervezas convencionales. En particular, esto se aplica a la realización de la formación de espuma y a la estabilidad de espuma, densidad, color, contenido de extracto, grado de fermentación o unidades de amargura.

35 La cantidad de enzima a emplearse depende de la preparación de enzima y puede variar dentro de límites amplios. Ella depende del contenido de prolamina de las materias primas y de los productos intermedios empleados, del tiempo de reacción, de la temperatura de reacción, del valor de pH etc., como se conoce por aquellos expertos en la manipulación de enzimas.

40 En la preparación de bebidas a partir de cereales, especialmente en la preparación de cervezas, existen en la mayoría de los casos etapas del proceso que permiten la adición de la transglutaminasa de conformidad con la invención sin un gasto alto de tiempo y costo. Como una regla, estas etapas se siguen por una inactivación con calor, filtración o etapa de centrifugación, lo que permite la inactivación completa de la actividad de enzima y la separación al menos parcial de las prolaminas modificadas.

45 De conformidad con la invención, se pueden preparar bebidas que están seleccionadas del grupo constituido por cerveza alcohólica, cerveza reducida en alcohol, cerveza no alcohólica, cerveza de malta, bebidas de mezcla de cerveza, limonadas, refrescos, bebida de zumo de frutas, bebidas de emulsión, bebidas de mezclas de zumos de frutas y mezclas de las mismas.

Dentro del alcance del proceso, las proteínas e hidrolizados proteicos aprobados para alimentos, tales como gelatina, leche y proteínas de suero, pueden agregarse al precursor de la bebida antes, durante o después del contacto con las enzimas de reticulación.

50 Para eliminar la prolamina modificada, son adecuados procesos de separación usuales, tales como filtración, centrifugación, sedimentación o cribado. Frecuentemente, las etapas del proceso de la producción de bebidas pueden usarse simultáneamente para la separación de la prolamina modificada.

Las enzimas pueden ser empleadas en una forma purificada o en la forma de una preparación, por ejemplo, un extracto de un organismo compatible con la comida.

5 En una realización, el contacto con enzimas de reticulación puede ser efectuado agregando microorganismos que producen de manera combinada enzimas de reticulación. En particular, las levaduras son adecuadas como dichos microorganismos. Alternativamente, también es posible que las enzimas de reticulación ya se estén expresando en los cereales recombinantemente y después contacten con la prolamina dentro del alcance del proceso.

10 La selección de las condiciones del proceso se puede establecer por la persona experta en adaptación al proceso de producción. La persona experta sabe que la velocidad de conversión de una reacción enzimática se incrementa usualmente según se incrementa la cantidad de enzimas o la temperatura. Temperaturas bajas requieren cantidades más altas o tiempos de reacción más largos. A temperaturas más altas, son suficientes cantidades menores o tiempos más cortos de acción.

Típicamente, el contacto con la bebida o el precursor de bebida y las enzimas de reticulación se efectúa durante un período de entre 10 min y 24 horas. Típicamente, la temperatura está entre 5 y 50°C.

15 En una realización del proceso, dicho contacto se sigue por una etapa de inactivación de las enzimas, especialmente un tratamiento con calor.

20 De conformidad con la invención, el contenido de prolamina de la bebida se reduce por el proceso. Preferiblemente, el contenido de prolamina después del tratamiento está por debajo 500 ppm, más preferiblemente por debajo de 100 ppm, aún más preferiblemente debajo de 50 ppm, y lo más preferiblemente por debajo de 20 ppm. Cantidades por debajo de 20 ppm son apropiadas para ingesta por pacientes celíacos y pacientes con dermatitis herpetiformis y se pueden considerar "libre de gluten".

La invención se refiere adicionalmente al uso de enzimas de reticulación para la reducción de prolamina en bebidas fabricados a partir de cereales que contienen prolamina.

25 El proceso de conformidad con la invención produce una bebida que debido a su contenido reducido de prolamina tiene una tolerabilidad mejor para pacientes que sufren de enfermedad celíaca y/o de dermatitis herpetiformis. Sorprendentemente, las bebidas correspondientes también tienen propiedades fisicoquímicas mejoradas, especialmente en vista de estabilidad de enturbiamiento (estabilidad coloidal).

La Figura 1 muestra una línea recta de calibración para determinar la concentración de gliadina en una muestra.

La Figura 2a muestra la reducción de gluten en cerveza Hefeweizen (2 horas, 37°C) como una función de la concentración de enzima.

30 La Figura 2b muestra la reducción de gluten en cerveza Hefeweizen (1 U/ml, 37°C) como una función del tiempo.

La Figura 2c muestra la reducción de gluten en cerveza Hefeweizen (25 U/ml, 2 horas) como una función de la temperatura.

La Figura 3 muestra un esquema relacionando con posibles adiciones de transglutaminasa durante la producción de cerveza.

35 La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplos

1) Determinación del contenido de gliadina en productos

40 La detección analítica de gliadinas en materias primas, productos intermedios y bebidas finales se efectuó con la prueba de gliadina RIDASCREEN®, un inmunoensayo de enzima intercalada para la determinación cuantitativa de gliadinas a partir de trigo y de prolaminas relacionadas a partir de centeno y cebada en alimentos. Con una detección límite de 1,5 ppm, este equipo de prueba representa actualmente el criterio de referencia de los sistemas de prueba analíticos.

45 El principio de prueba se basa en una reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de tiras de microtitulación se revisten con anticuerpos específicos contra gliadinas. Tras adición de gliadina estándar o de una muestra que contiene gliadina, se forma un complejo anticuerpo-antígeno que se reconoce en una etapa subsiguiente por un segundo anticuerpo al que se acopla la enzima peroxidasa. La detección se efectúa agregando sustrato de peróxido de urea así como un cromógeno (tetametilbencidina). La enzima unida al anticuerpo convierte el cromógeno incoloro en un producto final azul. La adición de un reactivo de parada (H₂SO₄) da como resultado un cambio de color de azul a amarillo. La medición se efectúa por fotometría a 450 nm en un lector de placa de multititulación. La concentración de gliadina en µg/kg (ppb), que corresponde a la extinción de la muestra, se lee a partir de la curva de calibración, y el contenido de gluten real de la muestra se calcula a partir de ahí; confróntese la Figura 1.

2) Eliminación de gliadinas a partir de Weizenbier agregando transglutaminasa

2a) Dependencia de concentración de enzima

5 En un recipiente de reacción de 2 ml, se incubaron 40 µl de cada una de las preparaciones enzimáticas con diferentes actividades transglutaminasa con 1960 µl de cerveza a 37°C durante 2 h. Después del lapso del tiempo de incubación, la actividad de la enzima se inactivó durante 10 min a 100°C. El contenido de gluten de las soluciones se determinó por el proceso como se describe en el Ejemplo 1. La Figura 2a muestra el contenido de gliadinas detectables como una función de la concentración de enzima.

2b) Dependencia del tiempo de incubación

10 En un recipiente de reacción de 2 ml, se incubaron 40 µl de cada una de una preparación enzimática con una actividad transglutaminasa de 1 U/ml con 1960 µl de cerveza a 37°C. Después del lapso del tiempo de incubación, la actividad de la enzima fue inactivada durante 10 min a 100°C. El contenido de gluten de las soluciones se determinó por el proceso como se describe en el Ejemplo 1. La Figura 2b muestra el contenido de gliadinas detectables como una función del tiempo de incubación.

2c) Dependencia de la temperatura

15 En un recipiente de reacción de 2ml, se incubaron 40 µl de cada una de una preparación enzimática con una actividad transglutaminasa de 25 U/ml con 1960 µl de cerveza durante 2 h a temperaturas diferentes. Después del lapso del tiempo de incubación, la actividad enzimática se inactivó durante 10 min a 100°C. El contenido de gluten de las soluciones se determinó por el proceso como se describe en el Ejemplo 1. La Figura 2c muestra el contenido de gliadinas detectables como una función de la temperatura de incubación.

3) Preparación de una cerveza libre de gliadina

25 Se realizaron experimentos de conformidad con un proceso de elaboración de cerveza estándar. Se trituraron diez kg de malta y se llevaron a temperatura de machacado con 40 l de agua para elaboración de cerveza. Después de un proceso de machacado típico con 40 l de licor de aspersión, se efectuó filtración de mosto hasta un volumen de 75 l de mosto. La ebullición subsiguiente del mosto se efectuó durante 60 a 90 minutos con agregación de lúpulo y un periodo de descanso de formación de remolinos subsiguiente de 20 a 30 minutos. Esto se siguió por separación de sedimento grueso y el mosto se enfrió hasta una temperatura de separación de 6°C por medio de un enfriador de placa. Para fermentación, se usó la levadura fermentando en el fondo para cervezas tipo pilsener. La fermentación se efectuó durante 6 días en tanques. Subsiguientemente, la levadura se separó de la cerveza verde, la cual fue extraída por sifón en tanques Cornelius para post-fermentación y almacenamiento. Después de 20 a 30 días, las cervezas se filtraron, se embotellaron y se pasteurizaron.

3a) Acción de transglutaminasa en diferentes productos intermedios durante el proceso de elaboración de cerveza

La Figura 3 ilustra esquemáticamente el proceso de elaboración de cerveza para una cerveza del tipo pilsener y muestra ilustrativamente la aplicación de transglutaminasa en diferentes etapas del proceso.

3b) Acción de transglutaminasa en diferentes cervezas comerciales

40 Puesto que la malta de trigo también se usa para la preparación de Weizenbier además de malta de cebada, las cervezas preparadas a partir de ahí tienen un contenido de gluten muy alto, que frecuentemente alcanza valores de claramente >1000 ppm. La tabla 1 muestra ejemplos de la aplicación de transglutaminasa para la eliminación de gliadina en diferentes cervezas disponibles comercialmente. En las cervezas tratadas, no pudieron detectarse más gliadinas después de 24 horas de tratamiento a temperatura ambiente.

Cerveza	Tipo	Concentración de Gluten [ppm]
1	Weizenbier, rubia	1500
2	Weizenbier, rubia	1725
3	Weizenbier, negra	360
4	Pilsener	170
5	Pilsener	590
6	Pilsener, no alcohólica	40

4) Preparación de una base de malta libre de gliadina para bases de bebida

- 5 En 1 l de agua templada, se solubilizan 30 g de extracto de malta que tienen un contenido de materia seca de 80 Brix a 40 hasta 50°C con agitación vigorosa. Subsiguientemente, se agregan 100 a 1000 U de transglutaminasa por l de la mezcla y todo se agita a 50°C durante 1 h. Los componentes insolubles se eliminan subsiguientemente por filtración o separación. La base de malta libre de gliadina se puede formular en una base con productos de materia prima usuales en la industria de elaboración de cerveza (por ejemplo, zumo, emulsiones, estabilizadores, ácidos, carbohidratos, aromatizantes, esencias, colorantes, sustitutos de azúcar) e ingredientes (minerales, vitaminas, ingredientes funcionales) y con el uso de etapas del procesamiento conocidas, tales como homogenización y pasteurización.

5) Preparación de una bebida libre de gliadina

- 10 Para la preparación de una bebida de malta libre de gliadina, la base de malta tratada de conformidad con la invención de conformidad con el Ejemplo 4 se mezcla con 0,3% de esencia de limón, 0,4% de ácido cítrico y aproximadamente 8% de azúcar, se embotella y se somete a una etapa de pasteurización.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una bebida, una base de bebida, un concentrado de bebida o un aditivo de bebida que tiene un contenido de prolamina reducido a partir de materias primas que contiene prolamina, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) poner en contacto la bebida, o un precursor de la bebida, con enzimas de reticulación a fin de obtener prolamina modificada;
 - b) eliminar la prolamina modificada al menos parcialmente.
2. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dichas enzimas de reticulación se seleccionan a partir de las clases de enzima de transglutaminasas (EC 2.3.2.13), peroxidasas (EC 1.11.1.7), hexosa oxidasas (EC 1.1.3.5), tirosinasas (EC 1.14.18.1), laccasas (EC.1.10.3.2), isomerasas de disulfuro de las proteínas (EC 5.3.4.1) y combinaciones de las mismas.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** dichas enzimas de reticulación son transglutaminasas bacterianas, especialmente transglutaminasas independientes de Ca²⁺ de *Streptoverticillium mobaraense*.
- 15 4. El procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** se emplean los cereales tales como trigo, centeno, avena, cebada, escanda, grano de escanda verde, escanda menor, escandia, tritical, bulgur, kamut, otras materias primas que contienen prolamina, o mezclas de los mismos, como la materia prima que contiene prolamina.
- 20 5. El procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** dicha bebida se selecciona del grupo constituido por cerveza alcohólica, cerveza reducida en alcohol, cerveza no alcohólica, cerveza de malta, bebidas de mezcla de cerveza, limonadas, refrescos, bebida de zumo de frutas, bebidas de emulsión, bebidas de mezclas de zumos de frutas, yogurt para beber, bebidas dietéticas que tienen un contenido de cereal, y mezclas de las mismas.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** dichas proteínas e hidrolizados proteicos aprobados para alimentos, tales como gelatina, leche y proteínas de suero se agregan a la bebida del precursor de la bebida antes, durante o después de contactar con las enzimas de reticulación.
- 30 7. El procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** algún proceso de separación usual, tal como filtración, centrifugación, sedimentación o cribado, se lleva a cabo para dicha eliminación al menos parcial de la prolamina modificada.
8. El procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** dicho contacto con las enzimas de reticulación se efectúa por la adición de microorganismos y/o cereales, en donde dichos microorganismos o cereales producen recombinantemente las enzimas de reticulación.
- 35 9. El procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** dicho microorganismo es una levadura.
10. El procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** la inactivación de dichas enzimas de reticulación se efectúa después de dicho contacto, especialmente por tratamiento con calor.
- 40 11. Uso de enzimas de reticulación para la reducción de prolamina en bebidas fabricados a partir de cereales que contienen prolamina.

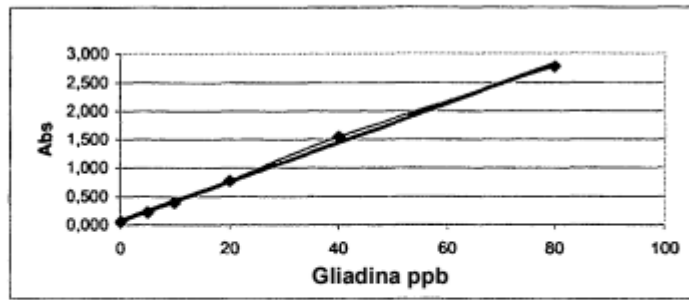


Fig.1

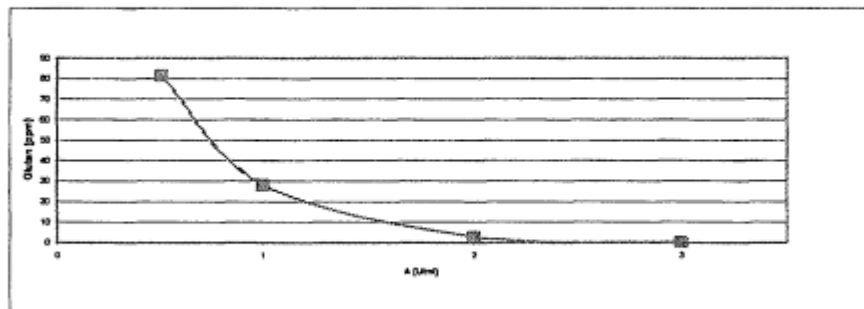


Fig.2a

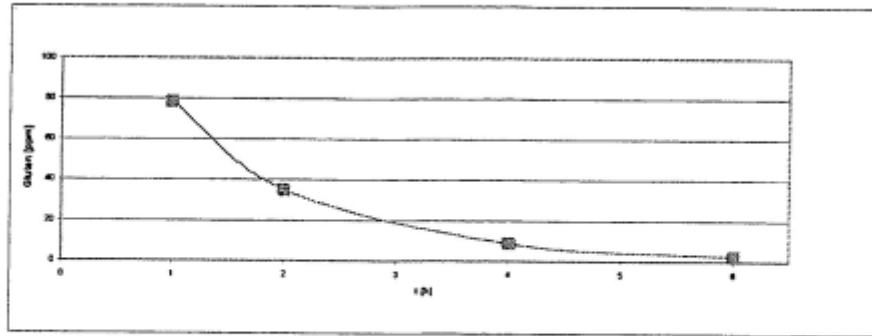


Fig.2b

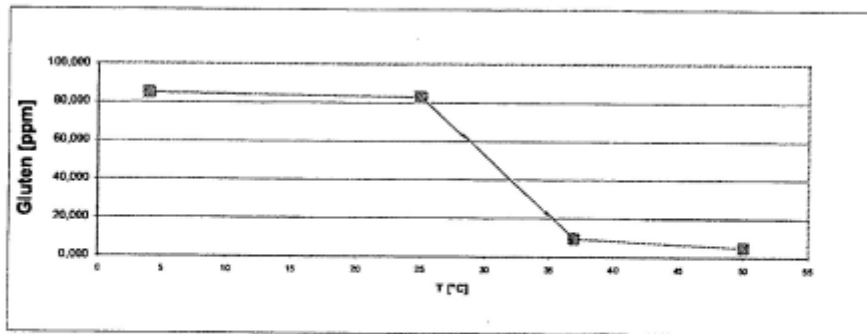


Fig.2c

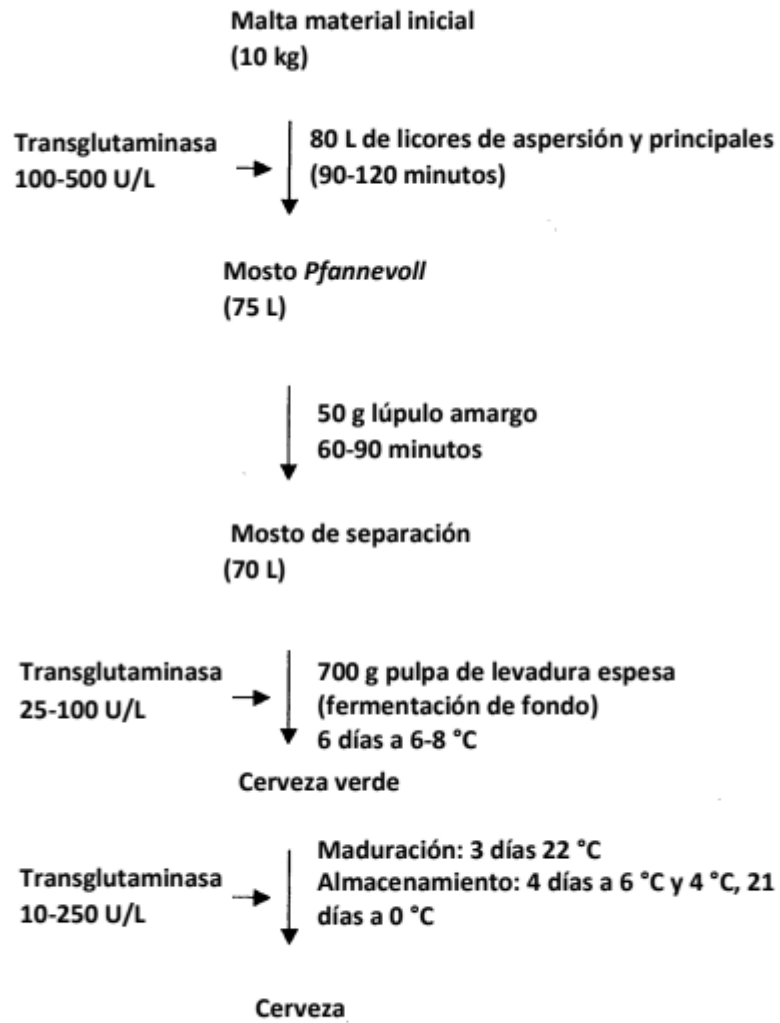


Fig.3