

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
<p>CONSORCIO BACTERIANO MICROENCAPSULADO PARA LA DEGRADACIÓN DE GLUTEN EN MASAS AGRIAS Y PROCESO DE ELABORACIÓN DE LAS MISMAS</p>			
2	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:	GONZÁLEZ-DE LA TORRE, JAVIER	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:	Rinconadas del Arco 346, Col. El Palomar, 45653 Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México	Domicilio/País de constitución:	MEXICO - JALISCO - TLAJOMULCO DE ZUÑIGA
Identificación:			
<input type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA <input checked="" type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA <input type="checkbox"/> PASAPORTE		<input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA <input type="checkbox"/> NIT	
Número:	1074805-		
3	Solicitantes		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1.	GONZÁLEZ-DE LA TORRE, JAVIER	EE	1074805
4	Datos del Inventor		

Nombre:	Ruth PEDROZA-ISLAS	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com	
Dirección:	Municipio Libre 16, Col. Portables, Del. Benito Juárez, 03570 México, D.F.	Domicilio/País de constitución:	MEXICO - DISTRITO FEDERAL - MEXICO	
Identificación:				
<input type="checkbox"/> CEDULA DE CIUDADANIA	<input type="checkbox"/> CEDULA DE EXTRANJERIA			
<input type="checkbox"/> EMPRESA EXTRANJERA	<input type="checkbox"/> NIT			
<input type="checkbox"/> PASAPORTE	<input checked="" type="checkbox"/> No Aplica			
Número:	-			
5	Inventor(es)			
	Apellidos - Nombres	Domicilio		
1.	PEDROZA-ISLAS Ruth	MEXICO		
6	Datos Inventor(es)			
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	MEXICO	DISTRITO FEDERAL	MEXICO	Municipio Libre 16, Col. Portables, Del. Benito Juárez, 03570 México, D.F.
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:	JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com	
Dirección:	CRA 4 No 72-35	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.	
Identificación:				

- CEDULA DE CIUDADANIA
 EMPRESA EXTRANJERA
 PASAPORTE

- CEDULA DE EXTRANJERIA
 NIT

Número: 16209380-

Presentación de Poder

Año de Radicación

Número de Radicación

8 Datos Solicitud: PCT / WO

Número Solicitud: PCT/IB2012/002254 Fecha Solicitud: 06/11/2012

Número Publicacion: WO 2014/072758 A1 Fecha Publicacion: 15/05/2014

9 Declaraciones de prioridad SI NO

(33) País de origen Codigo del país (31) No. Solicitud (32) Fecha _

1
2
3

10 Reivindicaciones

Número reivindicaciones: 20 Pago Reivindicaciones: Si

11 Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

SI NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

- Micro, pequeñas y medianas empresas
 Universidades públicas o privadas
 Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

- Reivindicaciones
 Descripción
 Dibujos y/o Figuras
 Resumen
 Certificado Depósito Material Biológico

- Uso de Conocimiento tradicional
- Listado de secuencias
- Artes finales 12 x 12 cm
- Poderes, si fuere el caso
- Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- Otros Anexos

**“CONSORCIO BACTERIANO MICROENCAPSULADO PARA LA DEGRADACIÓN DE
GLUTEN EN MASAS AGRIAS Y PROCESO DE ELABORACIÓN DE LAS MISMAS”**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con la industria alimenticia para la elaboración de pan y sus derivados, y más particularmente está relacionada con un consorcio bacteriano para la degradación de gluten en masas agrias y el proceso de elaboración de las mismas, así como con la elaboración de productos de panificación utilizando dichas masas agrias libres de gluten.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 La enfermedad celiaca es un trastorno del sistema inmunológico, de origen genético, inducido por el consumo de gluten, el cual es una proteína que se encuentra presente en el trigo, el centeno y la cebada. Esta se digiere de forma deficiente en el tracto
15 gastrointestinal superior de los seres humanos. El gluten está compuesto de dos fracciones, gliadina y glutenina. Las gliadinas son solubles en alcohol y contienen la mayor cantidad de los componentes tóxicos para los celíacos (Green, P.H.R. y Cellier, C. 2007. Celiac disease. N. Engl. J. Med.; 357:1731-1743).

 Cuando un paciente con enfermedad celiaca consume algún alimento que
20 contiene gluten, su sistema inmunológico responde de tal forma que daña o destruye las vellosidades intestinales, lo cual provoca que los nutrientes de los alimentos no sean absorbidos, causando así una mala nutrición. Los síntomas de la enfermedad celiaca varían según la edad del paciente, siendo los más comunes en niños diarrea, distensión abdominal, vómito y pérdida de peso, mientras que en adultos los síntomas que prevalecen son anemia
25 por deficiencia de hierro, fatiga, dolores de hueso, artritis, osteoporosis, entre otras (National Digestive Diseases information Clearinghouse, Publicación NIH No. 08-4269, 2008).

 Hasta hace poco, la enfermedad celiaca, era considerada una enfermedad rara, pero actualmente es una de las intolerancias más comunes, teniendo una incidencia mundial de 1 de cada 150 nacidos, y se estima que sólo el 9% está diagnosticado. De
30 acuerdo a cifras proporcionadas por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en México, hay un volumen aproximado de 2.6 millones de celíacos potenciales (<http://celiacosdemexico.org.mx/manifiesto-celiaco>).

En la actualidad, el único tratamiento aceptado para la enfermedad celiaca es llevar una dieta libre de gluten de por vida. De acuerdo al Codex Alimentarius, se considera que un alimento es libre de gluten cuando la concentración de gluten en el mismo es menor de 20 ppm. No obstante, esto representa implicaciones nutricionales negativas tales como una menor ingestión de polisacáridos y por ende menor ingesta energética, la reducción de la flora intestinal benéfica para la salud humana y un incremento en la presencia de patógenos oportunistas. La flora benéfica reducida por las dietas libres de gluten, afecta negativamente la actividad inmunoestimulante y se disminuye la producción de compuestos antiinflamatorios.

Es por ello que existe la necesidad de contar con productos libres de gluten, que sean adecuados para el consumo de los pacientes celíacos y, en consecuencia, les permita mejorar su dieta al poder disponer de una mayor variedad de productos alimenticios.

Uno de los productos más importantes en la dieta diaria de los seres humanos es el pan, elaborado principalmente a partir de harina de trigo.

Las propiedades de la masa de trigo dependen fundamentalmente de las proteínas del gluten. En los años recientes se han aplicado diversos tratamientos para mejorar la calidad de estas proteínas o bien, para mejorar el proceso de retención de gas para producir un pan más aireado (Arendt et al., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24:165-174). Uno de estos procesos es la producción de pan por medio de masas agrias.

La función principal de este proceso es leudar la masa para producir un mayor contenido de gas y por tanto un pan más esponjado y con miga más suave.

La masa agria se obtiene con una mezcla de harina (trigo, avena y arroz, etc.) y agua que es fermentada con levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) que generalmente pertenecen al género *Lactobacillus* (De Vuyst, L. y Vancanneyt, M. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24,120-127.). El uso de masas agrias ofrece grandes ventajas en la tecnología de buenos horneados, entre las que se encuentran la disminución del pH durante la fermentación, una mejor retención de gas, mayor resistencia de la red del gluten, inhibición de amilasas de la harina, unión del agua con el gluten y los gránulos de almidón, hinchazón de pentosas, solubilización del complejo fitato y prevención de una fermentación deficiente (Di Cagno, R. et al. 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat Flour protein fractions and gliadin peptides

involved in human cereal intolerant. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 623-633). Estas masas agrias se combinan con masa fresca para la elaboración del pan.

Asimismo, las BAL utilizadas en la fermentación con masas agrias permite la modificación del gluten durante la elaboración del pan, lo cual permite eliminar las fracciones proteínicas que resultan tóxicas para los enfermos celíacos. No obstante, no todas las bacterias ácido lácticas pueden disminuir la concentración residual de gluten a dosis que pueden tolerar las personas intolerantes al gluten (celíacos), por lo que es necesario seleccionar el tipo de BAL y encontrar una combinación apropiada entre las mismas, utilizando proteasas que coadyuven en la hidrólisis del gluten.

Durante la fermentación, el sistema proteolítico de las BAL libera péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos, que promueven la actividad metabólica de los microorganismos, contribuyendo a obtener un mejor sabor y a disminuir el contenido de péptidos alergénicos (De Angelis, M. et al. 2005. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue probiotics and gluten intolerant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762(1): 80-93), lo cual abre una gran esperanza para los enfermos celíacos que son sensibles a la fracción gliadina, motivo por el que han sido impedidos del consumo de productos que contengan aún pequeñas proporciones de gluten (Wieser, H. 2007. *Chemistry of Gluten proteins. Food Microbiology* 24: 115-119; Di Cagno et al., 2002). Estudios realizados en la elaboración de pan de masa agria mostraron que las BAL, bajo condiciones específicas de procesamiento (fermentación de tiempo largo y semi-líquida), tienen la capacidad para hidrolizar la fracción de la gliadina del trigo (Di Cagno, R. et al. 2004. *Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Applied and Environmental Microbiology* 70(2):1088-1096.; De Angelis et al., 2005).

Rizzello et al., (Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (14): 4499-4507, 2007) utilizaron mezclas de cepas no comerciales de Lactobacilli (previamente seleccionadas en base a su capacidad para hidrolizar gliadinas) con proteasas de origen fúngico en diferentes combinaciones, en masas agrias para eliminar la toxicidad de la harina de trigo durante una fermentación relativamente larga. Se observó que la cinética de hidrólisis por Lactobacilli fue altamente eficiente, además de que las proteínas extraídas de la masa agria indujeron la activación de interferón

y; las albúminas, globulinas y gliadinas fueron completamente hidrolizadas, mientras que el 20% de gluteninas permanecieron en la masa agria.

Asimismo, la Solicitud de Patente Estadounidense No. US 2008/0131556 describe una mezcla de por lo menos seis especies de BAL y/o bifidobacterias, disponibles
5 comercialmente. Esta mezcla se puede utilizar en la preparación de masas agrias. Asimismo, cuando a estas formulaciones se les agrega una cantidad suficiente de proteasas microbianas utilizadas comúnmente en panadería, la masa agria fermentada tiene una concentración de gluten menor a 200 ppm, lo cual podría no resultar adecuado para el consumo de un enfermo celiaco. Asimismo, la mezcla para lograr esta degradación resulta
10 compleja debido a que es necesario emplear un gran número de especies, ya que entre más especies de BAL son utilizadas se puede apreciar una mayor degradación de gliadinas.

Por otro lado, la Publicación Internacional No. WO 2010/073283 describe una mezcla que comprende dos tipos de BAL, en combinación con una o más proteasas fúngicas. Después de una fermentación de 12 h, no se detectaron trazas de gliadinas ni de
15 gluteninas. Asimismo, la concentración residual de gluten fue menor de 20 ppm.

Como se puede observar, los cultivos bacterianos ya conocidos en el arte previo para la degradación de gluten presentan ciertas desventajas, tales como el uso de mezclas complejas de BAL (de al menos seis especies) en el caso de las cepas comercialmente disponibles, o bien el uso de cepas específicamente seleccionadas, lo cual
20 implica que es necesario activar, reproducir, lavar y agregar el cultivo en suspensión (inóculo) a la masa, lo que requiere la preparación cotidiana del mismo y un manejo altamente especializado para evitar contaminación, mantenerlo activo en una misma fase de crecimiento y en la proporción adecuada entre especies de BAL y en cantidad suficiente, lo que representa un riesgo latente de contaminación.

Una alternativa para reducir las dificultades que representa elaborar el inóculo cada vez que éste se requiera, es microencapsularlo a fin de producir una cantidad suficiente, lo cual implicaría una reducción del manejo de los cultivos, disminuyendo así
25 riesgos sobre la contaminación y viabilidad de los cultivos ácido-lácticos y favoreciendo la eficiencia del proceso para la degradación de masas de trigo.

La viabilidad y actividad de BAL está determinada por una serie de factores, entre ellos, la velocidad de multiplicación de los cultivos, la capacidad de producción de ácido láctico y acético, el contenido de sólidos totales, la temperatura y el tiempo de
30 incubación, la cantidad de inóculo utilizado, y los residuos de antibióticos, desinfectantes o

detergentes (Picot y Lacroix, 2003; Briceño 2005; Desmond et al., 2002; Favaro-Trinidad y Grosso, 2002; Lian et al., 2003; Akalin et al., 2004; Cerdeira et al., 2005; Iyer y Kailasapathy, 2005; Ozer et al., 2005; Ann et al., 2007).

5 Existen diferentes métodos para incrementar la resistencia de las bacterias probióticas a las condiciones adversas, entre los que se encuentra la microencapsulación y la incorporación de micro-nutrientes con función prebiótica (Picot y Lacroix, 2003; Chandramouli et al., 2004; Talwalkar y Kailasapathy, 2004; Cerdeira et al., 2005; Iyer y Kailasapathy, 2005; Ann et al., 2007).

10 La microencapsulación ha sido propuesta para incrementar la viabilidad de los probióticos, ya que puede proteger su sensibilidad a los altos niveles de oxígeno, manufactura, almacenamiento, congelación, condiciones ácidas o alcalinas durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal (Favaro-Trinidad y Grosso, 2002; Picot y Lacroix, 2003; Chandramouli et al., 2004; Iyer y Kailasapathy, 2005; Crittenden et al., 2006; Ann et al., 2007).

15 Aún cuando la microencapsulación de BAL es ya conocida en el estado de la técnica, a fin asegurar una buena protección por los materiales a encapsular, los cuales serán utilizados durante la fermentación de masas agrias para degradar el gluten, es indispensable hacer una buena selección de las condiciones de secado así como de los medios encapsulantes, lo cual no se encuentra descrito en el estado del arte debido a que el
20 diseño de la pared de la microcápsula es un punto crítico que se realiza en función del tipo específico de material a proteger, del medio en que deben aplicarse las microcápsulas y del mecanismo de liberación del material activo que protegen.

OBJETOS DE LA INVENCION

25 Teniendo en cuenta los defectos de la técnica anterior, es un objeto de la presente invención proveer un consorcio microbiano microencapsulado de cepas de BAL, el cual en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico, resulte apropiado para la producción de masas agrias, y que además sea estable, de rápida activación y fácil manejo, para ser adicionado directamente a
30 la masa de trigo a fin de degradar el gluten, incluyendo las fracciones tóxicas para celíacos.

Asimismo, es otro objeto de la presente obtención obtener masas agrias, en donde el gluten se encuentre degradado, utilizando el consorcio microbiano

microencapsulado antes mencionado, y mediante un proceso que resulte sencillo y que se pueda emplear a escala industrial.

Un objeto adicional de la presente invención es obtener un producto de panificación a partir de masas agrias, el cual resulte libre de gluten y sea adecuado para el consumo de pacientes con enfermedad celiaca.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para ello, se ha desarrollado un consorcio bacteriano microencapsulado para la degradación de gluten, el cual comprende: a) tres cepas diferentes de bacterias ácido-lácticas comercialmente disponibles; b) agentes encapsulantes; c) prebióticos; y d) trehalosa; en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico.

Otros aspectos de la invención, consideran un proceso para obtener el consorcio bacteriano microencapsulado para la degradación de gluten; una masa agria elaborada a partir de dicho consorcio bacteriano, en combinación con una proteasa de origen bacteriano y una proteasa de origen fúngico, y la cual tiene una concentración de gluten menor a 20 ppm; el método de elaboración de la masa agria y un producto de panificación libre de gluten obtenido a partir de la masa agria.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Durante el desarrollo de la presente invención, se encontró de manera inesperada que un consorcio bacteriano microencapsulado que comprende tres cepas diferentes de bacterias ácido-lácticas comercialmente disponibles; agentes encapsulantes para brindar una alta protección al consorcio bacteriano y una disolución rápida en el sistema de masas de trigo para que inicie su actividad rápidamente; prebióticos para lograr la mayor sobrevivencia del consorcio; y, trehalosa como un ingrediente nutricional específico de las bacterias que integran, cuando es utilizado en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico, ambas también disponibles comercialmente, es útil para la degradación de gluten durante el proceso de fermentación de masas agrias.

De manera preferida, las cepas de bacterias ácido-lácticas son *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652 y *Lactobacillus brevis* ATCC 14869.

Los agentes encapsulantes se seleccionan del grupo que comprende proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína, maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10, goma arábica, goma de mezquite, alginato de sodio, pectina, proteína aislada de soya, caseína y combinaciones de los mismos, preferiblemente proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína, maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10, goma arábica y combinaciones de los mismos.

Por otro lado, los prebióticos se seleccionan del grupo que comprende polidextrosa, inulina y miel de maguey, preferiblemente miel de maguey.

En cuanto a la enzima proteolítica de origen bacteriano y la enzima proteolítica de origen fúngico, éstas se seleccionan entre enzimas utilizadas comúnmente para panificación.

En una modalidad específica de la invención, el consorcio bacteriano microencapsulado comprende: a) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; b) *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652; c) *Lactobacillus brevis* ATCC 14869; d) proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína; e) maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10; f) goma arábica; g) miel de maguey; y h) trehalosa; en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico.

Más preferiblemente, el consorcio bacteriano microencapsulado comprende: a) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; b) *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652; c) *Lactobacillus brevis* ATCC 14869; d) de 40 a 60% de proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína; e) de 10 a 20% de maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10; f) de 20 a 80% de goma arábica; g) de 1 a 10% de miel de maguey; y h) de 0.5 a 5% de trehalosa; en combinación con 0.005 a 0.03% de una enzima proteolítica de origen bacteriano y 0.001 a 0.02% de una enzima proteolítica de origen fúngico.

El microencapsulado se realiza mediante procesos bien conocidos en el estado de la técnica, tal como el secado por aspersion. Por ejemplo, el consorcio bacteriano microencapsulado puede obtenerse de acuerdo a lo siguiente:

- a) reactivar por separado cada cepa de bacterias ácido-lácticas;
- b) cuando cada cepa está activa, cultivar por separado en medio de cultivo líquido hasta alcanzar la concentración deseada de cada cepa;
- c) para cada cepa, eliminar el medio de cultivo sobrante para concentrar los microorganismos, preferiblemente mediante centrifugación, obteniendo una pastilla;

d) por separado, resuspender la pastilla obtenida para cada cepa en suspensión salina y ajustar al volumen necesario;

e) mezclar las cantidades necesarias de cada cepa y llevar a un volumen final;

f) disolver los agentes encapsulantes en agua, en las proporciones adecuadas
5 para tener de un 20 a un 30% de sólidos disueltos;

g) añadir los prebióticos y la trehalosa;

h) inocular con la mezcla de las tres cepas de bacterias ácido-lácticas, de tal manera que se obtengan aproximadamente 10^{10} UFC de dicha mezcla de tres cepas de bacterias ácido-lácticas por cada gramo de microencapsulado en polvo; y

10 i) secar, preferiblemente mediante un secador por aspersión, a una temperatura de entrada de entre 110 y 160°C, y a una temperatura de salida de entre 60 y 80°C, con una velocidad de alimentación de entre 20 y 50 mL/min.

De manera preferida, en la etapa e), se mezcla *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 en una proporción de 10 a 50%, *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652 en una
15 proporción de 40%, y *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 en una proporción de 10 a 50%.

Preferiblemente, el secado se lleva a cabo mediante un secador por aspersión, a una temperatura de entrada de 150 °C, y a una temperatura de salida de 80 °C, con una velocidad de alimentación de 22 mL/min.

Otro aspecto de la invención considera una masa agria elaborada a partir del
20 consorcio bacteriano microencapsulado de la presente invención, en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico, y en donde la masa agria tiene una concentración de gluten menor a 20 ppm, preferiblemente menor a 10 ppm, resultando adecuada para la elaboración de productos de panificación libres de gluten.

25 De manera preferida, esta concentración de gluten en la masa agria se logra después de al menos 3 horas de fermentación, más preferiblemente después de 31 horas de fermentación.

El proceso para elaborar las masas agrias de la presente invención comprende las siguientes etapas:

30 i) mezclar 30 a 60% de harina con 40 a 80% de agua para obtener una masa con un rendimiento de masa de 150 a 475, preferiblemente de 150 a 160;

ii) adicionar 0.005 a 0.03% de enzima proteolítica de origen bacteriano y 0.001 a 0.02% de enzima proteolítica de origen fúngico previamente disueltas en el agua de amasado;

iii) adicionar el consorcio bacteriano microencapsulado de tal manera que se
5 tengan aproximadamente 10^{10} UFC de la mezcla de las tres cepas de bacterias ácido-lácticas por cada gramo de harina;

iv) mezclar; y

v) fermentar durante 3 a 48 horas, preferiblemente de 28 a 35 horas, a una
10 temperatura de 30 a 37°C, y a una humedad relativa de 70 a 92%, preferiblemente 75 a 80%.

La harina utilizada en la etapa i) se selecciona entre harina de trigo, harina de centeno y harina de avena, preferiblemente harina de trigo.

En cuanto a la fermentación, de manera preferida ésta se lleva a cabo durante
15 31 horas, a una temperatura de 35° C y una humedad relativa de 76%.

Tal como se señaló anteriormente, las masas agrias de la presente invención,
20 obtenidas mediante el proceso antes señalado, tienen una concentración de gluten menor a 20 ppm, preferiblemente menor a 10 ppm. De manera preferida, esta concentración de gluten en las masas agrias se logra después de 3 horas de fermentación.

A partir de estas masas agrias es posible obtener productos de panificación,
25 preferiblemente pan dulce, libres de gluten, los cuales resultan adecuados para el consumo de pacientes con enfermedad celiaca.

La presente invención será mejor entendida a partir de los siguientes
ejemplos, los cuales se presentan únicamente con fines ilustrativos para permitir la
30 comprensión cabal de las modalidades preferidas de la presente invención, sin que por ello se implique que no existen otras modalidades no ilustradas que puedan llevarse a la práctica con base en la descripción detallada arriba realizada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

30 Producción del inóculo

Se obtuvieron de la ATCC, mediante un proveedor, cepas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 y *Lactobacillus sanfranciscensis*

ATCC 27652; las dos primeras se encontraban conservadas en medio sólido y la última se encontraba liofilizada.

A fin de reactivar las cepas, se realizaron siembras en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) (Difco™, EUA) líquido en tubos de ensayo con tapa de rosca, incubando de
5 35 a 37°C por 24 a 48 horas o hasta observar crecimiento por aumento de la turbidez.

Cuando los cultivos presentaron esta característica, se pasaron a medio MRS sólido en caja Petri, incubando a la misma temperatura también durante 24 a 48 horas.

Una vez crecidos los microorganismos se transfirieron, cada uno por separado, a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio MRS, incubando durante
10 8 a 12 horas a 37°C y con agitación de 50 a 100 rpm; éste fue el pre-inóculo.

Transcurrido el tiempo de incubación el cultivo se transfirió nuevamente, en condiciones asépticas, a un matraz Fernbach de 2800 mL con 500 a 1000 mL de medio MRS, el que se incubó a 37°C y de 50 a 150 rpm de agitación durante 10 a 16 horas. Cada matraz se muestreó para medir la absorbancia del medio (turbidez).

15 Para eliminar el medio sobrante y concentrar los microorganismos, se colocó el cultivo en botellas de centrífuga de 250 mL sanitizadas con etanol, y se centrifugó a 2000 a 5000 rpm durante 20 minutos.

La pastilla obtenida se resuspendió en solución salina estéril (cloruro de sodio, 9 g/L). Una vez re-suspendidos los microorganismos y ajustados al volumen necesario, el
20 inóculo para microencapsular se preparó también en condiciones asépticas mezclando las cantidades necesarias de cada cepa y llevando al volumen final.

Ejemplo 2

Microencapsulación del consorcio bacteriano

25 Se seleccionaron como agentes encapsulantes a la proteína aislada de suero lácteo con 90% de proteína por sus propiedades barrera al oxígeno, maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10 y goma arábiga, en diferentes proporciones.

Para apoyar la reactivación de las bacterias del consorcio, se evaluó la adición de tres tipos de agentes prebióticos: polidextrina, inulina y miel de maguey. Asimismo, fue
30 utilizada trehalosa como un ingrediente nutricional específico para las bacterias que integran el consorcio.

Los agentes encapsulantes se disolvieron en agua en las proporciones adecuadas y para tener de un 20% a un 30% de sólidos disueltos. Se añadieron los

prebióticos y la trehalosa y esta dispersión fue inoculada con tal cantidad de consorcio bacteriano para tener 10^{10} UFC/g de microencapsulado en polvo.

La mezcla anterior fue secada mediante un secador por aspersión, a una temperatura de entrada de 150 °C y una de salida de 80 °C, con una velocidad de alimentación de 22 mL/min.

Como resultado, se obtuvo el consorcio microbiano microencapsulado en polvo.

Ejemplo 3

10 Determinación de las proporciones de prebiótico que favorecen el desarrollo de las bacterias ácido-lácticas (BAL)

Tal como se mencionó anteriormente, se evaluó la adición de povidexrosa (P), inulina (I) y miel de maguey (M) al consorcio microencapsulado. Para ello, se experimentó con un diseño de mezclas simplex centroide, tal como se muestra en la Tabla 1:

20

TABLA 1. Formulaciones de prebióticos evaluados para la microencapsulación del consorcio microbiano

25

Tratamiento	Prebiótico (g)		
	P	I	M
1	0.76	2.00	0.23
2	4.50	0	0
3	0	0	1.40
4	0	3.00	0
5	0	1.50	0.70
6	2.25	0	0.70
7	3.00	0.51	0.23
8	1.48	0.90	0.46
9	2.25	1.50	0
10	0.76	0.51	0.93
11	1.48	0.90	0.46

30

Cada mezcla fue adicionada a su correspondiente dispersión de BAL y material de pared y se secó por aspersión, como se describió antes.

Una vez obtenido el microencapsulado, se tomó 1 g de los polvos y se rehidrataron en agua estéril a 30 °C con agitación. Se tomó una alícuota de 1 mL y se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa para determinar el número más probable. Los resultados de la sobrevivencia bacteriana se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. Porcentaje de sobrevivencia de las BAL en función de la combinación de prebióticos

Tratamiento	% Sobrevivencia de BAL
1	84
2	60
3	98
4	70
5	75
6	80
7	72
8	78
9	60
10	80
11	85

De acuerdo a lo anterior, se puede observar que la mayor sobrevivencia (98%) se alcanzó cuando el prebiótico fue miel de maguey.

Ejemplo 4

Elaboración de las masas agrias

Se utilizó harina de trigo comercial blanca, apta para panificación manual, así como el consorcio bacteriano microencapsulado obtenido conforme al Ejemplo 2, con una concentración de 10^{10} UFC/g, y contenido, además de los agentes encapsulantes y trehalosa, miel de maguey como prebiótico.

Como enzimas proteolíticas, se utilizaron una de origen bacteriana (HT Proteolitic 200, Enmex S.A. de C.V., México) y otra de origen fungal (Harizyme G, Enmex S.A. de C.V., México).

Para la elaboración de las masas agrias, se preparó la masa con un RM (rendimiento de masa) entre 150-160 a partir de la harina de trigo, mezclando 400 g de harina, 150 mL de agua. Se adicionaron 0.08 g de enzima proteolítica de origen bacteriano (HT Proteolitic 200, Enmex S.A. de C.V., México) y 0.12 g de enzima proteolítica de origen fúngico (Harizyme G, Enmex S.A. de C.V., México), ambas previamente disueltas en el agua de amasado. Posteriormente, se adicionaron las microcápsulas del consorcio microbiano de la presente invención, suspendidas en agua, de tal manera que se tuvieran 10^{10} UFC/g.

Se mezcló por 8 min en una batidora estándar y se sometió a fermentación 31 h a 35 °C y una humedad relativa de 76%. Se monitoreó el pH durante la fermentación y la intensidad de degradación del gluten al final de la fermentación por análisis electroforético (prueba de Western Blot). Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cinética de degradación de las masas agrias inoculadas con el consorcio bacteriano microencapsulado

	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7
Tipo de inóculo	Polvo						
Tiempo (h)	3	6	7	11	23	27	31
Gliadinas (ppm)	4.1	3.0	<5.0	<3.0	4.1	<3.0	<3.0
Hordeínas (ppm)	ND						
Secalinas (ppm)	ND						
Areninas (ppm)	ND						

De acuerdo a los datos mostrados en la tabla, es posible observar una degradación intensiva de la fracción gliadina del gluten por efecto del consorcio bacteriano microencapsulado de la presente invención, en combinación con las enzimas proteolíticas, desde las primeras 3 horas de fermentación.

Ejemplo 5

Elaboración de pan dulce tipo mantecada Astorga con masas agrias por fermentación ácido-láctica

Se elaboró pan dulce tipo mantecada, libre de gluten, utilizando la masa agria obtenida según el Ejemplo 4. Para ello, se batió mantequilla, margarina y azúcar glass empleando la paleta de la amasadora, primero a velocidad baja hasta incorporación, y aumentando después la velocidad y batiendo por 20 minutos más para incorporar la mayor
5 cantidad de aire al batido.

Se agregaron tres yemas de huevo poco a poco, hasta su completa incorporación, y posteriormente se añadió leche, saborizante (naranja, limón y chocolate) y sorbato de potasio.

Se incorporaron a la mezcla anterior la masa agria fermentada según el
10 Ejemplo 4, fécula de maíz, harina nixtamalizada, bicarbonato de sodio y polvo para hornear, previamente mezclados en una bolsa de plástico. Se agregó agua y se batió a velocidad alta por 8 minutos.

Por separado se batieron las claras de los huevos a punto de turrón y se mezclaron con el resto de la masa, a velocidad media para no romper la espuma formada.

15 La masa fluida se depositó en capachillos colocados en moldes, y se horneó durante 10 minutos a 200 °C.

Ejemplo 6

Evaluación con consumidores de las mantecadas de Astorga

20 A fin de determinar la aceptación de las mantecadas sabor naranja, limón y chocolate preparadas según el Ejemplo 5 (utilizando masa agria obtenida con el consorcio microbiano microencapsulado, en combinación con enzimas proteolíticas, de la presente invención), en comparación con mantecadas “naturales” elaboradas con masa tradicional, se realizó una evaluación entre los consumidores.

25 Para ello, se llevó a cabo una prueba con consumidores de las mantecadas de Astorga entre 70 personas de la Universidad Iberoamericana, campus Ciudad de México. Las personas participantes, 50% hombres y 50% mujeres con una edad desde 15 hasta más de 45 años, eran usuarios de pan dulce comercial que lo consuman por lo menos cada 15 días. El nivel de significancia y de confianza de la prueba es de 0.05% y 95%,
30 respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4. Resultados prueba con consumidores de las mantecadas elaboradas a partir de la masa agria fermentada con el consorcio bacteriano microencapsulado

en combinación con proteasas.

Mantecada	Apariencia	Textura	Sabor	Aceptación general
	Escala: 1-5 (1 menos gusta, 5 más gusta)			Escala: 1-5 (1 menos gusta, 5 más gusta)
Natural ^a	4.01 ^a Buena	3.87 ^a Buena	4.04 ^a Bueno	7.96 ^a
Sabor naranja ^b	3.9 ^{ab} Buena	3.99 ^{ab} Buena	4.00 ^{ab} Bueno	8.1 ^{ab}
Sabor chocolate ^c	3.77 ^{ac} Casi buena	3.89 ^{ac} Buena	3.76 ^{ac} Casi bueno	7.64 ^{ac}
Sabor limón ^d	3.41 ^d Entre regular y buena	3.56 ^d Entre buena y regular	3.26 ^d Regular	6.81 ^d

Los resultados de la Tabla 4 indican que no hay diferencia significativa al 95% (0.05) con respecto a la mantecada natural en todos los atributos evaluados (apariencia, textura y sabor) y en Aceptación general en las mantecadas sabor naranja y sabor chocolate.

Por el contrario, la mantecada de limón sí presenta diferencia significativa al 95% con respecto a la mantecada natural en todos los atributos evaluados, a favor de la mantecada natural.

De conformidad con lo anteriormente descrito, se podrá observar que el consorcio bacteriano microencapsulado para la degradación de gluten en masas agrias y el proceso de elaboración de las mismas, así como los productos de panificación obtenidos a partir de dichas masas agrias, ha sido ideado para contar con productos libres de gluten, que resulten adecuados para el consumo de enfermos celíacos, y será evidente para cualquier experto en la materia que las modalidades del consorcio bacteriano microencapsulado para la degradación de gluten en masas agrias y el proceso de elaboración de las mismas según se describió, son únicamente ilustrativas más no limitativas de la presente invención, ya que son posibles numerosos cambios de consideración en sus detalles sin apartarse del alcance de la invención.

Por lo tanto, la presente invención no deberá considerarse como restringida excepto por lo que exija la técnica anterior y por el alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un consorcio bacteriano microencapsulado para la degradación de gluten, caracterizado porque comprende: a) tres cepas diferentes de bacterias ácido-lácticas comercialmente disponibles; b) agentes encapsulantes; c) prebióticos; y d) trehalosa;

5 en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico.

2. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque las tres cepas de bacterias ácido-lácticas son *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652 y
10 *Lactobacillus brevis* ATCC 14869.

3. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque los agentes encapsulantes se seleccionan del grupo que comprende proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína, maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10, goma arábica, goma de mezquite,
15 alginato de sodio, pectina, proteína aislada de soya, caseína y combinaciones de los mismos.

4. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque los agentes encapsulantes son proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína, maltodextrina con un equivalente de
20 dextrosa de 10, goma arábica y combinaciones de los mismos.

5. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque los prebióticos se seleccionan del grupo que comprende polidextrosa, inulina y miel de maguey,

6. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque el prebiótico es miel de maguey.
25

7. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la enzima proteolítica de origen bacteriano y la enzima proteolítica de origen fúngico, se seleccionan entre enzimas utilizadas comúnmente para panificación.

8. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende: a) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; b) *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652; c) *Lactobacillus brevis* ATCC 14869; d)
30

proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína; e) maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10; f) goma arábica; g) miel de maguey; y h) trehalosa;

en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico.

5 9. Un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque comprende: a) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; b) *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652; c) *Lactobacillus brevis* ATCC 14869; d) de 40 a 60% de proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína; e) de 10 a 20 % de maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10; f) de 20 a 80% de goma arábica; g) de
10 1 a 10% de miel de maguey; y h) trehalosa;

en combinación con 0.005 a 0.03% de una enzima proteolítica de origen bacteriano y 0.001 a 0.02% de una enzima proteolítica de origen fúngico.

10. Un proceso para obtener un consorcio bacteriano microencapsulado para la degradación de gluten, caracterizado porque comprende:

15 a) reactivar por separado cada cepa de bacterias ácido-lácticas;
 b) cuando cada cepa está activa, cultivar por separado en medio de cultivo líquido hasta alcanzar la concentración deseada de cada cepa;

c) para cada cepa, eliminar el medio de cultivo sobrante para concentrar los microorganismos, preferiblemente mediante centrifugación, obteniendo una pastilla;

20 d) por separado, resuspender la pastilla obtenida para cada cepa en suspensión salina y ajustar al volumen necesario;

e) mezclar las cantidades necesarias de cada cepa y llevar a un volumen final;

f) disolver los agentes encapsulantes en agua, en las proporciones adecuadas para tener de un 20 a un 30% de sólidos disueltos;

25 g) añadir los prebióticos y la trehalosa;

h) inocular con la mezcla de las tres cepas de bacterias ácido-ácticas, de tal manera que se obtengan aproximadamente 10^{10} UFC de dicha mezcla de tres cepas de bacterias ácido-lácticas por cada gramo de microencapsulado en polvo; y

30 i) secar, preferiblemente mediante un secador por aspersion, a una temperatura de entrada de entre 110 y 160°C, y a una temperatura de salida de entre 60 y 80°C, con una velocidad de alimentación de entre 20 y 50 mL/min.

11. Un proceso para obtener un consorcio bacteriano microencapsulado, de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque el secado se lleva a

cabo mediante un secador por aspersion, a una temperatura de entrada de 150 °C, y a una temperatura de salida de 80 °C, con una velocidad de alimentaci3n de 22 mL/min.

12. Una masa agria elaborada a partir del consorcio bacteriano microencapsulado de la reivindicaci3n 1, en combinaci3n con una enzima proteol3tica de origen bacteriano y una enzima proteol3tica de origen f3ngico, caracterizada porque tiene una concentraci3n de gluten menor a 20 ppm.

13. Una masa agria, de conformidad con la reivindicaci3n 12, caracterizada adem3s porque tiene una concentraci3n de gluten menor a 10 ppm.

14. Una masa agria, de conformidad con la reivindicaci3n 12, caracterizada adem3s porque la concentraci3n de gluten menor a 20 ppm se logra despu3s de 3 horas de fermentaci3n, preferiblemente despu3s de 31 horas de fermentaci3n.

15. Un proceso para elaborar una masa agria a partir de un consorcio bacteriano microencapsulado para la degradaci3n de gluten, en combinaci3n con una enzima proteol3tica de origen bacteriano y una enzima proteol3tica de origen f3ngico, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

i) mezclar 30 a 60% de harina con 40 a 80% de agua para obtener una masa con un rendimiento de masa de 150 a 475, preferiblemente de 150 a 160;

ii) adicionar 0.005 a 0.03% de enzima proteol3tica de origen bacteriano y 0.001 a 0.02% de enzima proteol3tica de origen f3ngico previamente disueltas en el agua de amasado;

iii) adicionar el consorcio bacteriano microencapsulado de tal manera que se tengan aproximadamente 10^{10} UFC/g de harina;

iv) mezclar; y

v) fermentar durante 3 a 48 horas, preferiblemente durante 28 a 35 horas, a una temperatura de 30 a 37°C, y a una humedad relativa de 70 a 92%, preferiblemente de 75 a 80%.

16. Un proceso para elaborar una masa agria, de conformidad con la reivindicaci3n 15, caracterizado adem3s porque la harina utilizada en la etapa i) se selecciona entre harina de trigo, harina de centeno y harina de avena.

17. Un proceso para elaborar una masa agria, de conformidad con la reivindicaci3n 16, caracterizado adem3s porque la harina es harina de trigo.

18. Un proceso para elaborar una masa agria, de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque la fermentación se lleva a cabo durante 31 horas, a una temperatura de 35° C y una humedad relativa de 76%.

5 19. Un producto de panificación elaborado a partir de la masa agria de la reivindicación 12, caracterizado porque es libre de gluten.

20. Un producto de panificación, de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque es un pan dulce.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

Remitente: LA ADMINISTRACIÓN ENCARGADA
DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Destinatario:

ROMERO-MIRANDA, José Antonio
c/ LEIBNITZ, nº 117, PH1
COLONIA ANZURES -
DELEGACIÓN MIGUEL HIDALGO
C. P. 11590 - MÉXICO, D. F.
- MÉXICO -

PCT

**OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN
ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

(Regla 43bis.1 del PCT)

Fecha de expedición (día/mes/año)	08-JULIO-2013 (08/07/2013)
--------------------------------------	---

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario

GPCT12-101

PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN

Véase el punto 2

Solicitud internacional N°

PCT/IB2012/002254

Fecha de presentación internacional

(día/mes/año)

6 NOVIEMBRE 2012 (06.11.2012)

Fecha de prioridad (día/mes/año)

Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o a la vez clasificación nacional e CIP

VER HOJA ADICIONAL

Solicitante

GONZÁLEZ-DE LA TORRE, Javier y PEDROZA-ISLAS, Ruth.

1. La presente opinión contiene indicaciones relativas a los puntos siguientes:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro I | Base de la opinión |
| <input type="checkbox"/> | Recuadro II | Prioridad |
| <input type="checkbox"/> | Recuadro III | No formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| <input type="checkbox"/> | Recuadro IV | Falta de unidad de invención |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Recuadro V | Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| <input type="checkbox"/> | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| <input type="checkbox"/> | Recuadro VII | Defectos en la solicitud internacional |
| <input type="checkbox"/> | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

2. **CONTINUACIÓN DE LA TRAMITACIÓN**

Si se hace una petición de examen preliminar internacional, esta opinión se considerará como una opinión escrita de la Administración encargada del examen preliminar internacional ("IPEA") salvo en aquellos casos en los que el solicitante elija una Administración distinta a ésta y, la IPEA elegida haya notificado a la Oficina Internacional según lo previsto en la Regla 66.1 bis(b) que las opiniones escritas de esta Administración encargada de la búsqueda internacional no serán consideradas como tales.

Si esta opinión es, como se indica más arriba, considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a que presente ante la IPEA una respuesta por escrito junto con modificaciones, en su caso, antes de la expiración del plazo de 3 meses a contar desde la fecha de envío del formulario PCT/ISA/220 o antes de la expiración del plazo de 22 meses a contar desde la fecha de prioridad, aplicándose el plazo que expire más tarde.

Para otras opciones, consultar el formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

N° de fax: 91 349 53 04

Fecha en que se ha concluido efectivamente esta opinión

6 junio 2013 (06.06.2013)

Funcionario autorizado

A. Maquedano Herrero

N° de teléfono: 91 349 54 74

Recuadro I. Base de la opinión

1. Por lo que respecta al **idioma** esta opinión se ha establecido sobre la base de:
 - la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó
 - una traducción de la solicitud original al , que es el idioma de una traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (según las Reglas 12.3.a) y 23.1.b)).
2. Esta opinión se ha establecido teniendo en cuenta la **rectificación de un error evidente** autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Regla 43bis.1 a)).
3. En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:
 - a. Medios
 - en papel
 - en formato electrónico
 - b. Cuando
 - en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico
 - presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
4. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
5. Comentarios adicionales:

Recuadro V. Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. Declaración

Novedad	Reivindicaciones	1-20	Sí
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva	Reivindicaciones	1-20	Sí
	Reivindicaciones		NO
Aplicación industrial	Reivindicaciones	1-20	Sí
	Reivindicaciones		NO

2. Citas y explicaciones

Doc.	Número Publicación o Identificación	Fecha Pub.
D01	WO 2010073283 A2 (GIULIANI SPA et al.)	01/07/2010
D02	DI CAGNO RAFFAELLA et al. Use of selected sourdough strains of <i>Lactobacillus</i> for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread. Journal of Food Protection JUL 2008 00/07/2008 VOL.: 71 No: 7 Pags: 1491-1495 ISSN 0362-028X (resumen), BIOSIS [en línea], Thomson Scientific, Philadelphia, PA, USA. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 04/06/2013], n° de acceso de BIOSIS PREV200800579343.	30/06/2008
D03	US 2008131556 A1 (DE SIMONE CLAUDIO et al.)	05/06/2008
D04	GRECO L et al. Safety for Patients With Celiac Disease of Baked Goods Made of Wheat Flour Hydrolyzed During Food Processing. CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, 20110101 AMERICAN GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION, US 01/01/2011 VOL: 9 No: 1 Pags: 24 - 29 ISSN 1542-3565 , todo el documento.	01/01/2011
D05	WO 02065842 A1 (PIEMONTE IMP WARENHANDELSGMBH et al.)	29/08/2002
D06	RIZZELLO, CG, et al.: "Highly Efficient Gluten Degradation by <i>Lactobacilli</i> and Fungal Proteases during Food Processing: New Perspectives for Celiac Disease", Appl. Environ. Microbiol. (2007), vol. 73 (14), pp.: 4499-4507.	

La solicitud reivindica un complejo microencapsulado para la degradación de gluten, que comprende tres cepas diferentes de bacterias ácido lácticas, agentes encapsulantes, prebióticos y trehalosa en combinación con una enzima proteolítica bacteriana y otra de origen fúngico.

Continúa en página siguiente...

Continuación Recuadro V. Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración.

Las cepas bacterianas pertenecen a las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis* y *Lactobacillus brevis*.

La idea principal que subyace en la solicitud es la de utilizar este complejo en la fabricación de pan o de productos de panificación, de forma que partiendo de harinas que contienen gluten se obtengan productos libres de esta proteína, mediante la degradación de la misma por dicho complejo encapsulado.

La solicitud reivindica asimismo el procedimiento de obtención del complejo, una masa agria para panificación que lo incluye, así como los productos de panificación que se obtienen mediante el uso del mismo.

El estado de la técnica anterior se encuentra representado en D01-D06.

Se refieren a distintas composiciones a base de bacterias lácticas que se utilizan para fabricar productos de panificación libres de gluten. En ningún caso estos documentos se refieren a complejos microencapsulados, ni siquiera encapsulados. Tampoco hacen referencia alguna a la asociación de las cepas de bacterias reivindicadas por la solicitud.

Además, en el estado de la técnica anterior no aparece la asociación de las bacterias lácticas con prebióticos, trehalosa, y dos proteasas, una de origen fúngico y la otra de origen bacteriano. Por otro lado, del contenido de D01-D06 no se infiere de forma obvia la composición del complejo reivindicado en la solicitud, ni tampoco su procedimiento de obtención ni sus posibles usos.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1 a 20 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad (Art. 33 (2) PCT), actividad inventiva (Art. 33 (3) PCT), y aplicación industrial (Art. 33 (4) PCT).

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A21D13/06 (2006.01)

C12N1/20 (2006.01)

A21D8/04 (2006.01)

A23L1/29 (2006.01)

RESUMEN

La presente invención está relacionada con un consorcio bacteriano microencapsulado para la degradación de gluten, el cual comprende: a) tres cepas diferentes de bacterias ácido-lácticas comercialmente disponibles; b) agentes encapsulantes; c) 5 prebióticos; y d) trehalosa; en combinación con una enzima proteolítica de origen bacteriano y una enzima proteolítica de origen fúngico. De manera preferida, el consorcio bacteriano microencapsulado comprende: a) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; b) *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27652; c) *Lactobacillus brevis* ATCC 14869; d) proteína aislada de suero de leche con 90% de proteína; e) maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 10; 10 f) goma arábica; g) miel de maguey; y h) trehalosa; en combinación con una proteasa de origen bacteriano y una proteasa de origen fúngico. También se describe un proceso para obtener el consorcio bacteriano microencapsulado, así como la elaboración de masas agrias a partir del mismo, y el uso de dichas masas agrias para obtener productos de panificación.