

Preparación que comprende cepas probióticas para la degradación del gluten

La presente invención se refiere a preparaciones que comprenden cepas probióticas pertenecientes a los géneros *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.* y *Pediococcus sp.* como células viables o extracto citoplasmático de las mismas, y proteasas y su uso para la degradación segura del gluten en seres humanos y durante la producción de alimentos para seres humanos y animales.

El gluten es la principal red proteica de cereales tales como el trigo, el centeno y la cebada. El gluten incluye α -gliadinas, γ -gliadinas, Ω -gliadinas, que portan secuencias de péptidos con potencial inmunogénico y/o tóxico (los ejemplos más destacados se enumeran en la tabla 1).

Gliadina	Posición	Secuencia
α 9-gliadina	57-68	QLQPFPPQPQLPY
A-gliadina	62-75	PQPQLPYPQPQSFP
Y-gliadina	134-153	QQLPQPQQPQQSFPQQQRPF
α 2-gliadina	57-89	LQLQPFPPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFP

Tabla 1: Péptidos de gliadina inmunogénicos

La digestión incompleta de gliadinas puede liberar estos péptidos, lo que da lugar a reacciones adversas en individuos susceptibles. La bibliografía también muestra la liberación de péptidos inmunogénicos de las gluteninas, la otra fracción proteica que constituye el gluten. El espectro de trastornos relacionados con el gluten incluye la enfermedad celíaca (EC), la alergia al trigo (WA, por su sigla en inglés), la sensibilidad al gluten no celíaca (NCGS, por su sigla en inglés) y el síndrome del intestino irritable sensible al gluten [1]. Si bien estos trastornos tienen diferencias patogénicas, muestran síntomas

relacionados y, como no son curables, se tratan evitando el gluten o alimentos que contienen gluten. Además, se ha sugerido que diversas otras afecciones de salud (por ej., esquizofrenia, atopia, fibromialgia, endometriosis, obesidad, síntomas gastrointestinales inespecíficos) se benefician de la evitación del gluten [2]. Estos hechos explican el aumento de las dietas libres de gluten (GFD, por su sigla en inglés); y dicha práctica también se extiende a un número grande y creciente de personas sanas y asintomáticas. Por ejemplo, de acuerdo con lo informado, el 33% de la población de EE. UU. quiere evitar el gluten, y el 41% de la población de atletas informó haber estado en una dieta
5 libres de gluten durante más del 50% del tiempo [3].

Sin embargo, practicar una GFD se asocia con desafíos y efectos adversos, que se deben tener en cuenta en una evaluación de riesgos y beneficios, en especial cuando no hay una indicación clara para mantener una GFD, es decir, cuando evitar el gluten es más una elección de estilo de vida que una
15 necesidad médica. Una GFD a menudo está desequilibrada, por ej., debido a que se evitan los productos de cereales, con deficiencias de micronutrientes y fibra, junto con un exceso de calorías y un mayor contenido de azúcar y grasas saturadas que se encuentran en muchos alimentos que reemplazan el gluten [4 a 6]. Por lo tanto, los daños potenciales de una GFD incluyen un retraso del
20 crecimiento/desarrollo en niños y adolescentes, diversos trastornos asociados con la desnutrición, la hiperlipidemia, la hiperglucemia y la enfermedad de las arterias coronarias [6]. Además, la adherencia a largo plazo a una GFD puede provocar disbiosis del microbioma intestinal con los consiguientes efectos adversos para la salud [7].

25 En la actualidad, una GFD es la única terapia eficaz para pacientes con EC,

WA y NCGS. En particular para la EC, la ingestión de gluten o proteínas similares son el desencadenante del desarrollo y exacerbación de la enfermedad, por lo que es de vital importancia evitar estrictamente la ingestión de gluten. Sin embargo, incluso los productos alimenticios considerados o
5 declarados libres de gluten a menudo contienen cantidades (trazas) de gluten que están por encima de un límite seguro de ingesta de gluten (por lo general < 20 ppm para pacientes con EC). Para garantizar la seguridad alimentaria de los pacientes con EC, se han concebido estrategias para apoyar la evitación del gluten o la desintoxicación. Un determinante clave del destino intestinal del
10 gluten y la respuesta fisiológica al mismo es la microbiota intestinal, de acuerdo con lo revelado a partir de experimentos con ratones colonizados diferencialmente [8] y a partir de comparaciones de microbiota de pacientes con EC versus individuos sanos [9, 10]. En consonancia con esto, se han desarrollado diversas tecnologías dirigidas a la microbiota con el objetivo de
15 mejorar los trastornos relacionados con el gluten. Estas tecnologías se pueden clasificar en: 1. Aplicación oral de *Lactobacillus spp.* o *Bifidobacterium spp.* para corregir la disbiosis asociada con GFD o trastornos relacionados con el gluten, 2. Aplicación oral de *Lactobacillus spp.* o *Bifidobacterium spp.* como apoyo no específico para los trastornos relacionados con el gluten a través de
20 mecanismos indefinidos. 3. Aplicación oral de *Lactobacillus spp.* o *Bifidobacterium spp.* para apoyar la degradación del gluten, 4. Aplicación oral de péptido hidrolasas para apoyar la degradación del gluten ("glutenasas"). La degradación de los epítomos del gluten tóxicos/inmunogénicos requiere actividades combinadas de las peptidasas PepN, PepO, PepI, PepX, PepP
25 [11].

Recientemente, se ha actualizado la clasificación taxonómica de diversas especies del género *Lactobacillus*, de acuerdo con Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Cmap Franz H. M. B., Harris P., Mattarelli P. W., O'Toole B., Pot P., Vandamme J., Walter K., Watanabe S., Wuyts G. E., Felis M.G., Ganzle A. y Lebeer S., 2020. A taxonomic note on the genus lactobacillus: description of 23 novel genera, emended description of the genus lactobacillus Beijerinck 1901, and Union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. De particular relevancia en el contexto de esta invención son las siguientes especies:

Denominación “antigua”	Denominación actualizada (desde 2020)
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Frutilactobacillus sanfranciscensis</i>

El documento AU2015261774 AA reivindica el uso de *Lactobacillus casei* (*Lacticaseibacillus casei*) IPLA12038 para prevenir o tratar la EC. Se ha descrito que esta cepa degrada una cierta cantidad del 33-mer, pero no cualquier otro péptido inmunogénico importante, en 12 horas y posee las siguientes actividades enzimáticas: PepN 8,03 mEU/mg; PepQ 9,5 mEU/mg; PepI 0,58 mEU/mg; PepX 3,19 mEU/mg. La cepa no sobrevive a condiciones ácidas (pH < 3,0) y, por lo tanto, no ofrece una solución técnica para los

trastornos relacionados con el gluten.

El documento WO2017139659 A1 reivindica la escisión de motivos XPQ y solo dos péptidos inmunogénicos (33-mer y 26-mer) por subtilisinas de especies de *Rothia*.

- 5 El documento AU2008341708 AA reivindica el uso de *Bifidobacterium longum* CECT 7347 en el tratamiento de trastornos relacionados con el gluten; no se hace referencia a ninguna actividad de peptidasa o proteasa de esta cepa contra el gluten o los epítomos críticos de la misma.

- El documento WO17134240 A1 reivindica composiciones que contienen las
10 especies *Faecalibacterium prausnitzii*, *Butyricicoccus pullicaecorum*, *Roseburia inulinivorans*, *Roseburia hominis*, *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) y *Anaerostipes caccae* para el tratamiento de la EC.

- El documento US2017000830 AA reivindica composiciones que contienen
15 especies de *Lactococcus* y enzimas para mejorar la sensibilidad al gluten. Francavilla *et al.* informó de una mejoría de los síntomas similares al síndrome del intestino irritable (IBS, por su sigla en inglés) de pacientes con EC en una GFD después de la aplicación de una combinación de cinco cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* [12]. Este tratamiento se asoció con un
20 cambio en la composición de la microbiota intestinal; Sin embargo, no se informaron los efectos de las cepas sobre la digestión del gluten. Mientras tanto, el mismo grupo evaluó las actividades de peptidasa *in vitro* de cepas de *Lactobacillus*, que muestran actividades de hasta 10 mU/mg para PepN, 10 mU/mg para Pepl, 5 mU/mg para Pep, 25 mU/mg para PepQ para cepas de las
25 especies *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*), *Lactobacillus*

bulgaricus, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*), y *Lactobacillus casei* (*Lacticaseibacillus casei*) [13]. La aplicación combinada de diez de estas cepas condujo a la hidrólisis de los epítomos de gliadina enumerados en la Tabla 1 después de 24 horas de incubación. No se determinó la supervivencia de las cepas en condiciones gástricas y del intestino delgado, por lo que no se puede predecir la eficacia de estas cepas en la digestión del gluten en el tracto gastrointestinal de los seres humanos.

Herran *et al.* aisló 27 cepas bacterianas pertenecientes a las especies *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*), *L. casei* (*Lacticaseibacillus casei*), *L. oris*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*), *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, y *B. licheniformis* del intestino delgado de seres humanos que mostraron actividad proteolítica contra el 33-mer solo después de un tiempo de incubación muy largo de 24 horas y no contra otros péptidos [14]. De manera similar, se encontró una actividad débil contra este epítipo para otras cepas de origen del intestino delgado humano, incluidas nuevamente las especies *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis* [15].

El documento CA3069659A1 revela un método para la preparación de harina libres de gluten por medio de composiciones que contienen enzimas fúngicas y bacterias probióticas seleccionadas de las especies *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*), *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*), y *Lactobacillus helveticus*. No se determinó la supervivencia de estas bacterias en condiciones gástricas y del intestino delgado, por lo que no se puede predecir la eficacia de estas cepas en

la digestión del gluten en el tracto gastrointestinal de los seres humanos. Además, no se ha revelado el destino del gluten digerido por estas composiciones; no se ha evaluado la aparición o desaparición de péptidos inmunogénicos ni la inmunogenicidad de los digeridos.

- 5 Se ha descrito el uso comercial de péptido hidrolasas con la intención de desintoxicar el gluten durante el procesamiento de alimentos [16] y en seres humanos [17]. Sin embargo, los productos relacionados que contienen estas enzimas tienen evidencia mínima de eficacia [17].

En conclusión, los problemas de los trastornos relacionados con el gluten
10 siguen sin resolverse, ya que todas las aplicaciones mencionadas con anterioridad tienen diversos problemas y no se han trasladado con éxito a la clínica. Las aplicaciones 1 y 2 pueden proporcionar simplemente un beneficio indirecto, ya que el problema subyacente de la toxicidad del gluten no se aborda directamente. La aplicación 3 se ha limitado hasta ahora a la digestión
15 *ex vivo* del gluten, la evaluación de la actividad de proteasa únicamente frente a las proteínas del gluten/gliadina, lo que lleva a una digestión solo parcial, o la evaluación de la digestión de muy pocos péptidos del gluten inmunogénicos después de tiempos de incubación muy largos de 12 horas o más.

La falta de una traducción clínica exitosa se puede explicar por la escasa
20 supervivencia de las cepas microbianas combinadas en condiciones realistas en el tracto gastrointestinal, y debido a la actividad limitada contra los péptidos de gluten en las matrices alimentarias.

Los tratamientos con enzimas microbianas para pacientes con EC (Aplicación 4) tienen la principal limitación de la escasa resistencia proteolítica, el grado y
25 la duración de la actividad enzimática durante el tránsito gastrointestinal [18].

Además, incluso se consideran peligrosos porque solo pueden degradar parcialmente el gluten y, por lo tanto, liberar epítomos tóxicos [17].

El objetivo era superar estas limitaciones por medio del desarrollo de una tecnología inventiva y eficaz en base a las siguientes consideraciones:

- 5 ▪ La degradación del gluten/gliadina/glutenina durante la digestión humana no es beneficiosa *per se*, porque la degradación incompleta puede conducir a la formación de péptidos tóxicos y/o inmunogénicos.
- Se han expresado preocupaciones sobre la seguridad de los medios actualmente disponibles para desencadenar la degradación del gluten
- 10 *in vivo*, ya que estos pueden hacerlo solo parcialmente y, por lo tanto, pueden inducir o empeorar la toxicidad del gluten.
- Cualquier intento de desencadenar la degradación del gluten *in vivo* debe asegurarse de que dicha degradación sea completa y conduzca a productos de degradación seguros.
- 15 ▪ Dada la diversidad de secuencias de péptidos inherentes al gluten con potencial inmunogénico, se requiere una combinación de hidrolasas de péptidos de diferentes microbios para asegurar la degradación completa de todos los péptidos.
- Dicha combinación con preferencia es proporcionada por un consorcio
- 20 de microorganismos probióticos que son metabólicamente activos y se sinergizan entre sí en partes relevantes del tracto gastrointestinal (es decir, el estómago y el duodeno) para la promoción de una digestión segura, rápida y completa de las proteínas del gluten de las matrices de alimentos relevantes a pequeños péptidos o aminoácidos no
- 25 tóxicos, no inmunogénicos

- Fue concebido que tal sinergia se puede lograr por medio de la combinación de cepas resistentes a ácidos y bilis con especificidades de sustrato de proteína/péptido adecuadas y se ha hallado que combinaciones de ciertos *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.*, y en algunos casos también *Pediococcus sp.*, incluyendo sus extractos citoplasmáticos, de nichos ecológicos específicos son útiles en particular para eso.

En esta invención se revela la aplicación de consorcios compuestos por especies de *Lactobacillus* y *Bacillus*, con la adición opcional de cepas de *Pediococcus* como tecnología para su uso en la degradación del gluten en el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales así como también durante la producción de alimentos.

La forma en que dicha tecnología puede aportar un beneficio a las personas que la necesitan, así como también a las personas dispuestas a minimizar su exposición al gluten por razones de precaución o de otro tipo, es de la siguiente manera:

- (i) Eliminación segura del gluten ingerido de manera intencional o accidental como una cura o terapia complementaria para pacientes con EC, WA y NCGS. La posibilidad de volver a una dieta convencional que contenga gluten.
- (ii) Eliminación segura del gluten ingerido de manera intencional o accidental como una cura o terapia complementaria para personas con síntomas intestinales o extra intestinales inespecíficos que pueden surgir de la ingestión de gluten. La posibilidad de volver a una dieta convencional que contenga gluten.

- (iii) El ofrecimiento de una solución para personas sin síntomas que quieran minimizar su exposición al gluten como alternativa para adherirse a una GFD.

5 La presente invención está dirigida a preparaciones que comprenden especies de *Lactobacillus* y *Bacillus*, con la adición opcional de cepas de *Pediococcus*. Estas nuevas preparaciones promueven la digestión del gluten en péptidos/aminoácidos no tóxicos y no inmunogénicos en el tracto gastrointestinal humano y durante la producción de alimentos que contienen
10 gluten.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es una preparación que comprende consorcios de por lo menos una cepa probiótica seleccionada del género *Bacillus* y por lo menos una cepa probiótica seleccionada del género *Lactobacillus*, para su uso en la degradación segura y completa del gluten.

15 La presente invención está dirigida a una preparación que comprende consorcios de por lo menos una cepa bacteriana seleccionada del género *Bacillus* y por lo menos una cepa bacteriana seleccionada del género *Lactobacillus*, para su uso en la degradación del gluten a un contenido de gluten de 20 ppm o menos.

20 a) en la que dicho consorcio de cepas puede degradar el péptido de 12-mer QLQFPQPQLPY (SEC. ID NÚM. 1), el péptido de 14-mer PQPQLPYPQPQSFP (SEC. ID NÚM. 2), el péptido de 20-mer QQLPQPQQPQQSFPQQRPF (SEC. ID NÚM. 3), el péptido de 33-mer LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPQP (SEC. ID NÚM. 4).

25 En una configuración preferida, el consorcio de cepas puede degradar el

péptido de 12-mer QLQFPQPQLPY (SEC. ID NÚM. 1), el péptido de 14-mer PQPQLPYQPQSFP (SEC. ID NÚM. 2), el péptido de 20-mer QQLPQPQPQQSFPQQRP (SEC. ID NÚM. 3), el péptido de 33-mer LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQP (SEC. ID NÚM. 4) en por lo
5 menos 1% o por lo menos 10%, o por lo menos 20% o por lo menos 30% o por lo menos 40%, o por lo menos 50% o por lo menos 60% o por lo menos 70%, con preferencia por lo menos 80%, o por lo menos 90%, con preferencia por lo menos 95%, con mayor preferencia por lo menos 98%.

El contenido de gluten se determina por medio de un ensayo de ELISA, con
10 preferencia por medio de la determinación del gluten hidrolizado de acuerdo con un método de análisis oficial internacional (OMA, por su sigla en inglés) de la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (AOAC, por su sigla en inglés) (Método Núm. AACCI 38-55.01) mediante el uso de un sándwich basado en anticuerpos R5 y ELISA competitivo (R5-ELISA) [22] o por medio de la
15 determinación del gluten residual mediante el uso de un kit de detección de residuos de gluten de ELISA Systems (Windsor, Australia).

En una configuración preferida, la preparación es capaz de reducir el gluten residual en por lo menos un 85%, con preferencia en por lo menos un 90%, con mayor preferencia en por lo menos un 95% después de 6 hs, o en por lo menos
20 un 95%, con mayor preferencia en por lo menos un 98% después de 16 hs, o por lo menos en un 99% después de 48 hs. De manera alternativa, la preparación es capaz de reducir los fragmentos de gluten en por lo menos un 90% después de 6 hs, o en por lo menos un 95% después de 16 hs, o en por lo menos un 97% después de 48 hs.

25 En otra configuración preferida, la preparación es capaz de reducir el gluten

residual en por lo menos un 95%, con preferencia en por lo menos un 97% después de 6 hs, o en por lo menos un 99% después de 16 hs. De manera alternativa, la preparación es capaz de reducir los fragmentos de gluten en por lo menos un 94% después de 6 hs, o en por lo menos un 97% después de 16
 5 hs, o en un 100% después de 48 hs.

Otra configuración preferida es una preparación para su uso,

b) en la que dicho consorcio de cepas es capaz de degradar el gluten a una digestión que no provoca una respuesta inmunogénica o tóxica en el intestino delgado o explante de intestino delgado de un sujeto o animal
 10 afectado por un trastorno relacionado con el gluten, y/o

c) en la que todas las cepas del consorcio sobreviven (menos de 2 log de pérdida de UFC) condiciones gástricas simuladas (pH de 1,0 a 4,0) e intestinales (pH de 5,4 a 6,8; de 0,05 a 0,6% de ácidos biliares, o la concentración de ácidos biliares presentes en seres humanos bajo
 15 condiciones *in vivo*), y/o

d) en la que los miembros del consorcio tienen actividades complementarias de PepP, PepO, PepX, PepI y PepN con por lo menos una actividad de peptidasa igual o superior a 3 U/g (PepP), 5 U/g (PepO), 20 U/g (PepX), 17 U/g (PepI), 20 U/g (PepN).

20 Las bacterias de las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*), *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*), *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*), *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*), *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*), y en algunos casos
 25

también *Pediococcus* sp. resultaron ser en especial adecuados para este efecto.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, las cepas de *Bacillus* se seleccionan de *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*
 5 *megaterium*, con preferencia seleccionadas de *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, DSM 33301, *Bacillus subtilis* DSM 33353, DSM 33298, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356.

Las cepas de *Lactobacillus* se seleccionan de *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*), *Lactobacillus casei* (*Lacticaseibacillus casei*),
 10 *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*), *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*), *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*), *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*), con preferencia se seleccionan de *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33363, DSM 33364, DSM 33366, DSM 33367,
 15 DSM 33368, DSM 33369, DSM 33370, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, DSM 33375, DSM 33376, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, DSM 33379.

20 En una forma de realización preferida, la preparación para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una o más de las siguientes cepas:

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363, DSM 33364; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373; *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377; *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM
 25 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300 y

Bacillus subtilis DSM 33353, o

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367, DSM 33368; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379; *Bacillus*
 5 *pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356, *Bacillus subtilis* DSM 33298, DSM 33353 o

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369; *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376; *Pediococcus pentosaceus* DSM
 10 33371; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378; *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33298, o

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus pumilus* DSM
 15 33297 y *Bacillus megaterium* DSM 33300, o

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301.

Las preparaciones en particular preferidas para usar de acuerdo con la
 20 presente invención comprenden las siguientes cepas:

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301, o

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L.*
 25 *paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Lactobacillus reuteri*

(*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300 y *Bacillus pumilus* DSM 33297, o

L. plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lactocaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus reuteri*

5 (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus pumilus* DSM 33355.

Las células de las cepas de la presente invención pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención, como esporas (que están inactivas), como células vegetativas (que están creciendo), como células en
10 estado de transición (que están pasando de células vegetativas a esporas), o a la inversa), como extractos de células completas o como fracciones enzimáticas enriquecidas o enzimas purificadas o como una combinación de por lo menos dos de estos tipos de células o extractos/aislados.

La presente invención también está relacionada con composiciones que
15 comprenden cepas microbianas a las que se han transferido genes de proteasa aislados de las cepas mencionadas con anterioridad por medio de procedimientos de clonación y transferencia de genes y el uso de cepas modificadas genéticamente como esporas (si corresponde), como células vegetativas, como células en estado de transición, como extractos de células
20 completas o como fracciones enzimáticas enriquecidas o enzimas purificadas o como una combinación de por lo menos dos de estos tipos de células o extractos/aislados.

En una forma de realización preferida, la cepa probiótica está presente en forma latente o como células vegetativas. En una forma de realización
25 alternativa, se usan extractos citoplasmáticos o sobrenadantes exentos de

células o biomasa eliminada por calor de las cepas probióticas.

En una forma de realización preferida adicional, la preparación además comprende una o más cepas probióticas, con preferencia seleccionadas de *Pediococcus sp.*, *Weissella sp.*, con mayor preferencia *Pediococcus*
5 *pentosaceus* DSM 33371.

En una forma de realización preferida adicional, la preparación además comprende uno o más de los siguientes: proteasas microbianas purificadas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Weissella sp.*, *Rothia mucilaginosa*, *Rothia aeria*, subtilisinas,
10 natoquinasa, arabinoxilanos, fibra de grano de cebada, fibra de grano de avena, fibra de centeno, fibra de salvado de trigo, inulinas, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), almidón resistente, betaglucanos, glucomananos, galactoglucomananos, goma guar, xilooligosacáridos, alginato.

La invención también está dirigida a preparaciones para su uso para el
15 tratamiento o la prevención de trastornos relacionados con el gluten, con preferencia seleccionados entre una enfermedad celíaca, la sensibilidad al gluten no celíaca, la alergia al trigo y el síndrome del intestino irritable sensible al gluten en un sujeto o animal en necesidad de la misma.

Además, la invención está dirigida a preparaciones para su uso en la
20 producción de alimentos libres de gluten, a partir de cereales que contienen gluten, tales como trigo, cebada, centeno y avena, que con preferencia contienen menos de 20 ppm de gluten.

En una forma de realización preferida, la preparación para su uso además comprende una sustancia que actúa como permeabilizante de la membrana
25 celular microbiana de miembros de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus*

sp., *Weissella sp.*, con preferencia alginato.

En una forma de realización alternativa, una o más de las cepas probióticas seleccionadas de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.* y *Weissella sp.* se inmovilizan de manera individual o como consorcios. La inmovilización

5 se puede llevar a cabo en superficies sólidas tales como celulosa y quitosano, como atrapamiento dentro de una matriz porosa tales como geles de polisacáridos como alginatos, k-carragenano, agar, quitosano y ácido poligalacturónico u otras matrices poliméricas como gelatina, colágeno y alcohol polivinílico o por medio de tecnologías de floculación y

10 microencapsulación o electropulverización. Se cribaron cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Pediococcus* para la supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas y para las actividades PepN, PepO, PEP, PepX, PepQ. Las siguientes cepas sobrevivieron en condiciones gastrointestinales simuladas (reducción de menos de 2 log de UFC) y mostraron actividades de

15 peptidasa excepcionalmente altas tales como PepN, PepO, PEP, PepX, PepQ:

Lactobacillus plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33362, DSM 33363, DSM 33364, DSM 33367, DSM 33366, DSM 33369, DSM 33368

Lactobacillus reuteri (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374

20 *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377

Lactobacillus paracasei (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, DSM 33375, DSM 33376

Lactobacillus sanfranciscensis (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, DSM 33379

25 *Bacillus subtilis* DSM 33298, DSM 33353

Bacillus pumilus DSM 33301, DSM 33297, DSM 33355

Bacillus megaterium DSM 33300, DSM 33356

Bacillus licheniformis DSM 33354

Pediococcus pentosaceus DSM 33371

- 5 Por lo tanto, las cepas de *Bacillus/Lactobacillus/Pediococcus* que se usan con preferencia para preparaciones de acuerdo con la presente invención se seleccionan de los siguientes grupos:

Las cepas de *Bacillus subtilis* depositadas bajo DSM 33298, DSM 33353 en el DSMZ; las cepas de *Bacillus pumilus* depositadas bajo DSM 33301, DSM
 10 33297, DSM 33355 en el DSMZ; las cepas de *Bacillus megaterium* depositadas bajo DSM 33300, DSM 33356 en el DSMZ; la cepa de *Bacillus licheniformis* depositada bajo DSM 33354 en el DSMZ; la cepa de *Pediococcus pentosaceus* depositada bajo DSM 33371 en el DSMZ; las cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) depositadas bajo DSM
 15 33378, DSM 33379 en el DSMZ; las cepas de *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) depositadas bajo DSM 33370, DSM 33362, DSM 33363, DSM 33364, DSM 33367, DSM 33366, DSM 33369, DSM 33368 en el DSMZ; la cepa de *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) depositada bajo DSM 33374 en el DSMZ; la cepa de *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus*
 20 *brevis*) depositada bajo DSM 33377 en el DSMZ; las cepas de *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) depositada bajo DSM 33373, DSM 33375, DSM 33376 en el DSMZ.

Cuando se combinaron las cepas *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*)
 25 DSM 33370, DSM 33363, DSM 33364; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus*

paracasei) DSM 33373; *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377; *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Bacillus subtilis* DSM 33353 (combinación 1), los cuatro epítomos de gluten probados enumerados en la Tabla 1 se degradaron
5 completamente en 12 horas.

Asimismo, la combinación 2, que comprendía *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367, DSM 33368; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379; *Bacillus pumilus* DSM 33301,
10 *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356, *Bacillus subtilis* DSM 33298, DSM 33353,

y la combinación 3, que comprendía *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366 y DSM 33369, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376;
15 *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378; *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356, *Bacillus subtilis* DSM 33298 condujeron a la degradación completa de los epítomos del gluten enumerados en la Tabla 1 en 12 horas.

20 Además, una combinación de *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, y *Bacillus pumilus* DSM 33297 y *Bacillus megaterium* DSM 33300 fueron efectivas de manera similar como las combinaciones de cepas 1 a 3.

25 Además, una combinación de *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus*

plantarum) DSM 33363 y DSM 33364, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus pumilus* DSM 33297 y DSM 33355, y *Bacillus megaterium* DSM 33300 fueron efectivas de manera similar
5 como las combinaciones de cepas 1 a 3.

Por lo tanto, una configuración preferida de la presente invención se dirige a una preparación que comprende combinaciones de cepas seleccionadas de las siguientes:

10 *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363, DSM 33364; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373; *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377; *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300 y *Bacillus subtilis* DSM 33353, o

15 *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367, DSM 33368; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379; *Bacillus pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y DSM 33353, o

20 *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366 y DSM 33369, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376; *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378; *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356 y *Bacillus subtilis*
25 DSM 33298, o

Lactobacillus plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, y *Bacillus pumilus* DSM 33297 y *Bacillus megaterium* DSM 33300, o

5 *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus pumilus* DSM 33297 y DSM 33355, y *Bacillus megaterium* DSM 33300.

Numerosas otras combinaciones entre las cepas mencionadas con anterioridad

10 de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.* y *Pediococcus sp.* mostraron un rendimiento comparable a los indicados con anterioridad.

De manera más específica, las configuraciones preferidas de esta invención comprenden combinaciones de cepas que, en suma, proporcionan alta actividad enzimática de PepI, PepN, PepX, PepO y PepP; en consecuencia,

15 tales combinaciones contienen por lo menos una cepa de cada uno de los siguientes grupos 1 a 5, en los que los miembros del grupo tienen una actividad enzimática en particular alta para PepI (grupo 1), PepN (grupo 2), PepX (grupo 3), PepO (grupo 4), PepP (grupo 5).

Otro objeto de la presente invención es, por lo tanto, una preparación que

20 comprende por lo menos una cepa de cada uno de los siguientes grupos 1 a 5:

Grupo 1: *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375,

Grupo 2: *Bacillus subtilis* DSM 33298, *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33356,

25 *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Lactobacillus plantarum*

- (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362,
- Grupo 3: *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33369, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373,
- Grupo 4: *Bacillus subtilis* DSM 33353, *Bacillus pumilus* DSM 33355, *Bacillus pumilus* DSM 33301,
- Grupo 5: *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33368, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374,
- Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367,

Lactobacillus plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366,
Lactobacillus plantarum (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33364,
Lactobacillus paracasei (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373.

En una configuración preferida, la preparación comprende por lo menos tres
 5 cepas diferentes, con preferencia por lo menos cuatro cepas diferentes, con
 mayor preferencia por lo menos cinco cepas diferentes.

En particular se prefiere cuando la preparación comprende las siguientes
 cepas:

- 10 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363,
 DSM 33364; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373; *L.*
brevis (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377; *Bacillus pumilus* DSM
 33297, DSM 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus*
megaterium DSM 33300 y *Bacillus subtilis* DSM 33353, o
- 15 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367,
 DSM 33368; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375; *L.*
sanfranciscensis (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379;
Bacillus pumilus DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM
 33356, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y DSM 33353, o
- 20 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366 y DSM 33369,
Lactobacillus reuteri (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *L.*
paracasei (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376; *Pediococcus*
pentosaceus DSM 33371; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus*
sanfranciscensis) DSM 33378; *Bacillus licheniformis* DSM 33354,
 25 *Bacillus pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM

- 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33298, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301, o
- 5 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300 y *Bacillus pumilus* DSM 33297, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364,
- 10 *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus pumilus* DSM 33355, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363 y
- 15 DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, DSM 33301, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362 y DSM 33367,
- 20 DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Bacillus subtilis* DSM 33298, *Bacillus licheniformis* DSM 33354 y *Bacillus megaterium* DSM 33300, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369,
- 25 *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus*

subtilis DSM 33353, o

- *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33369, *Bacillus pumilus* DSM 33297 y *Bacillus megaterium* DSM 33300, o
- *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, DSM 33368; *Bacillus pumilus* DSM 33355 y *Bacillus licheniformis* DSM 33354, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33362 y DSM 33366, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33353, o
- *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, *B. licheniformis* DSM 33354, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, DSM 33364, DSM 33370, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *B. pumilus* DSM 33297, *Bacillus megaterium* DSM 33356, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367, DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *B. megaterium* DSM 33300, *B. subtilis* DSM 33353, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *P. pentosaceus* DSM

33371, *B. pumilus* DSM 33297, DSM 33355, o

- *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *P. pentosaceus* DSM 33371, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, o
- 5 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, *B. licheniformis* DSM 33354, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33366,
- 10 DSM 33370, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, DSM 33379, *B. licheniformis* DSM 33354, *B. subtilis* DSM 33353.

En otra configuración preferida, la preparación comprende las siguientes cepas:

- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364,
- 15 *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364,
- L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium*
- 20 DSM 33300 y *Bacillus pumilus* DSM 33297, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364,
- L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium*
- 25 DSM 33300, *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus pumilus* DSM 33355.

Otra configuración preferida de la presente invención son las formulaciones que se usarán en la preparación de productos alimenticios a partir de cereales por medio de, por ej., procesos de fermentación y horneado.

- 5 Por lo tanto, la invención también está relacionada con un alimento o complemento alimenticio para mascotas o alimento o producto alimenticio para mascotas, que comprende una preparación de acuerdo con la presente invención.

Un objeto de la presente invención es el uso de una preparación de acuerdo
10 con la presente invención como complemento alimenticio o su uso en productos alimenticios. Los productos alimenticios preferidos de acuerdo con la invención son productos de chocolate, gomitas, mueslis, barras de muesli y productos lácteos.

Otro objeto de la presente invención también es el uso de una preparación de
15 la presente invención como ingrediente simbiótico en alimentos o piensos.

Otro objeto de la presente invención es una composición alimenticia que contiene una preparación de acuerdo con la presente invención y por lo menos un ingrediente alimentario adicional, con preferencia seleccionado entre
20 proteínas, carbohidratos, grasas, otros probióticos, prebióticos, enzimas, vitaminas, inmunomoduladores, sustitutos de la leche, minerales, aminoácidos, coccidiostáticos, productos a base de ácido, medicamentos y combinaciones de los mismos.

La composición de producto alimenticio o pienso de acuerdo con la presente invención también incluye suplementos dietéticos, por ej., en forma de píldora,
25 cápsula, comprimido, polvo o líquido.

Un objeto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene una preparación de acuerdo con la presente invención y un portador aceptable para uso farmacéutico.

Las preparaciones de acuerdo con la presente invención, cuando se administran a seres humanos o animales, con preferencia mejoran el estado de salud, en particular la salud intestinal, la salud cardiovascular, la salud mental o la salud inmunológica de un ser humano.

Una configuración ventajosa de acuerdo con la presente invención es una composición para mejorar el estado de salud de un ser humano o un animal por medio de uno o más de los siguientes:

- Disminuir la cantidad de epítomos tóxicos del gluten, con preferencia los enumerados en la Tabla 1.
- Disminuir la cantidad de gluten inicial a menos de 20 ppm.

15 **Puntos**

1. Una preparación que comprende consorcios de por lo menos una cepa bacteriana seleccionada del género *Bacillus* y por lo menos una cepa bacteriana seleccionada del género *Lactobacillus*, para su uso en la degradación del gluten.
2. Una preparación que comprende consorcios de por lo menos una cepa bacteriana seleccionada del género *Bacillus* y por lo menos una cepa bacteriana seleccionada del género *Lactobacillus*, para su uso en la degradación del gluten hasta un contenido de gluten de 20 ppm o menos.

3. Una preparación para su uso de acuerdo con el punto 1 o 2,
a) en la que dicho consorcio de cepas puede degradar el péptido de 12-mer QLQPFPPQQLPY (SEC. ID NÚM. 1), el péptido de 14-mer PQPQLPYPQPQSFP (SEC. ID NÚM. 2), el péptido de 20-mer
5 QQLPQPQQPQQSFPQQRP (SEC. ID NÚM. 3), el péptido de 33-mer LQLQPFPPQQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP (SEC. ID NÚM. 4).
4. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que el contenido de gluten se determina por medio de un
10 ensayo de ELISA, con preferencia un sándwich basado en anticuerpos o un ensayo competitivo.
5. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que la preparación es capaz de reducir el gluten residual
15 en por lo menos un 85%, con preferencia en por lo menos un 90%, con mayor preferencia en por lo menos un 95% después de 6 hs, o en por lo menos un 95%, con mayor preferencia en por lo menos un 98% después de 16 hs, o en por lo menos un 99% después de 48 hs.
- 20 6. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que la preparación es capaz de reducir los fragmentos de gluten en por lo menos un 90% después de 6 hs, o en por lo menos un 95% después de 16 hs, o en por lo menos un 97% después de 48 hs.
- 25 7. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos

anteriores, en la que la preparación es capaz de reducir el gluten residual en por lo menos un 95%, con preferencia en por lo menos un 97% después de 6 hs, o en por lo menos un 99% después de 16 hs.

- 5 8. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que la preparación es capaz de reducir los fragmentos de gluten en por lo menos un 94% después de 6 hs, o en por lo menos un 97% después de 16 hs, o en un 100% después de 48 hs.

- 10 9. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que el consorcio de cepas puede degradar el péptido de 12-mer QLQFPQPQLPY (SEC. ID NÚM. 1), el péptido de 14-mer PQPQLPYPQPQSFP (SEC. ID NÚM. 2), el péptido de 20-mer QQLPQPQQPQQSFPQQRPF (SEC. ID NÚM. 3), el péptido de 33-mer
 15 LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPQP (SEC. ID NÚM. 4) en por lo menos 80%, o por lo menos 90%, con preferencia por lo menos 95%, con mayor preferencia por lo menos 98%.

- 20 10. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores,
 b) en la que dicho consorcio de cepas es capaz de degradar el gluten a una digestión que no provoca una respuesta inmunogénica o tóxica en el intestino delgado o explante de intestino delgado de un sujeto o animal afectado por un trastorno relacionado con el gluten, y/o
 25 c) en la que todas las cepas del consorcio sobreviven (menos de 2 log de

pérdida de UFC) condiciones gástricas simuladas (pH de 1,0 a 4,0) e intestinales (pH de 5,4 a 6,8; de 0,05 a 0,6% de ácidos biliares, o la concentración de ácidos biliares presentes en seres humanos bajo condiciones *in vivo*), y/o

- 5 d) en la que los miembros del consorcio tienen actividades complementarias de PepP, PepO, PepX, PepI y PepN con por lo menos una actividad de peptidasa igual o superior a 3 U/g (PepP), 5 U/g (PepO), 20 U/g (PepX), 17 U/g (PepI), 20 U/g (PepN).
- 10 11. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que las cepas de *Bacillus* se seleccionan de *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, con preferencia se seleccionan de *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, DSM 33301, *Bacillus subtilis* DSM 33353, DSM 33298, *Bacillus*
15 *licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356.
12. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que las cepas de *Lactobacillus* se seleccionan de *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*), *Lactobacillus casei*
20 (*Lacticaseibacillus casei*), *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*), *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*), *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*), *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*), con preferencia se seleccionan de *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM
25 33363, DSM 33364, DSM 33366, DSM 33367, DSM 33368, DSM 33369,

DSM 33370, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, DSM 33375, DSM 33376, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, DSM 33379.

5

13. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que las cepas probióticas están presentes en forma latente o como células vegetativas.

10

14. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que se usan extractos citoplasmáticos o sobrenadantes exentos de células o biomasa eliminada por calor de las cepas probióticas.

15

15. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que la preparación además comprende una o más cepas probióticas, con preferencia seleccionadas de *Pediococcus* sp., *Weissella* sp., con mayor preferencia *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371.

20

16. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en la que la preparación además comprende uno o más de los siguientes: proteasas microbianas purificadas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Weissella* sp., *Rothia mucilaginosa*, *Rothia aeria*, subtilisinas,

25

- 5 natoquinasa, arabinoxilanos, fibra de grano de cebada, fibra de grano de avena, fibra de centeno, fibra de salvado de trigo, inulinas, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), almidón resistente, betaglucanos, glucomananos, galactoglucomananos, goma guar, xilooligosacáridos, alginato.
- 10 17. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores para el tratamiento o la prevención de trastornos relacionados con el gluten, con preferencia seleccionados de una enfermedad celíaca, la sensibilidad al gluten no celíaca, la alergia al trigo y el síndrome del intestino irritable sensible al gluten en un sujeto o animal en necesidad de la misma.
- 15 18. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores para la producción de alimentos libres de gluten, a partir de cereales que contienen gluten, tales como trigo, cebada, centeno y avena, que con preferencia contienen menos de 20 ppm de gluten.
- 20 19. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, que además comprende una sustancia que actúa como permeabilizante de la membrana celular microbiana de miembros de *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Weissella sp.*, con preferencia alginato.
- 25 20. Una preparación para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos

anteriores, en la que una o más de las cepas probióticas seleccionadas de *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp. y *Weissella* sp. se inmovilizan de manera individual o como consorcios.

- 5 21. Una preparación que comprende por lo menos una cepa de cada uno de los siguientes grupos 1 a 5:
- Grupo 1: *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375,
- 10 Grupo 2: *Bacillus subtilis* DSM 33298, *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33356, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362,
- 15 Grupo 3: *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus*
- 20 *plantarum*) DSM 33370, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus*
- 25 *plantarum*) DSM 33370, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus*

- plantarum*) DSM 33369, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, Grupo 4: *Bacillus subtilis* DSM 33353, *Bacillus pumilus* DSM 33355, *Bacillus pumilus* DSM 33301,
- Grupo 5: *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Lactobacillus sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33368, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33364, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373.
22. Una preparación de acuerdo con el punto 21, que comprende por lo menos tres cepas diferentes, con preferencia por lo menos cuatro cepas diferentes, con mayor preferencia por lo menos cinco cepas diferentes.
23. Una preparación de acuerdo con el punto 21 o 22, que comprende las siguientes cepas:
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363, DSM 33364; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373; *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377; *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354,

- Bacillus megaterium* DSM 33300 y *Bacillus subtilis* DSM 33353, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367, DSM 33368; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379; *Bacillus pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y DSM 33353, o
 - *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366 y DSM 33369, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376; *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378; *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus pumilus* DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33298, o
 - *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301, o
 - *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300 y *Bacillus pumilus* DSM 33297, o
 - *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus pumilus* DSM 33355, o

- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, DSM 33301, o
- 5 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362 y DSM 33367, DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Bacillus subtilis* DSM 33298, *Bacillus licheniformis* DSM 33354 y *Bacillus megaterium* DSM 33300, o
- 10 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33353, o
- 15 – *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33369, *Bacillus pumilus* DSM 33297 y *Bacillus megaterium* DSM 33300, o
- 20 – *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, DSM 33368; *Bacillus pumilus* DSM 33355 y *Bacillus licheniformis* DSM 33354, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33362 y DSM 33366, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33353, o
- 25 – *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. plantarum*

- (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, *B. licheniformis* DSM 33354, o
- 5 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, DSM 33364, DSM 33370, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *B. pumilus* DSM 33297, *Bacillus megaterium* DSM 33356, o
- 10 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367, DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *B. megaterium* DSM 33300, *B. subtilis* DSM 33353, o
- 15 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *P. pentosaceus* DSM 33371, *B. pumilus* DSM 33297, DSM 33355, o
- 20 – *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *P. pentosaceus* DSM 33371, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, o
- 25 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, *B. licheniformis* DSM 33354, o
- *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33366, DSM 33370, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, DSM 33379, *B. licheniformis* DSM 33354, *B. subtilis* DSM 33353.

24. Una preparación de acuerdo con cualquiera de los puntos 21 a 23, que comprende las siguientes cepas:

- 5 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301, o
- 10 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300 y *Bacillus pumilus* DSM 33297, o
- 15 – *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus pumilus* DSM 33355.

25. Una preparación de acuerdo con cualquiera de los puntos 21 a 24, en la que las cepas probióticas están presentes en forma latente o como células vegetativas.

20

26. Una preparación de acuerdo con cualquiera de los puntos 21 a 25, en la que se usan extractos citoplasmáticos o sobrenadantes exentos de células o fracciones enzimáticas enriquecidas o enzimas purificadas o biomasa eliminada por calor de las cepas probióticas.

25

27. Una preparación de acuerdo con cualquiera de los puntos 21 a 26, en la que la preparación además comprende una o más cepas probióticas, con preferencia seleccionadas de *Pediococcus sp.*, *Weissella sp.*, con mayor preferencia *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371.
- 5
28. Una preparación de acuerdo con cualquiera de los puntos 21 a 27, en la que la preparación además comprende uno o más de los siguientes: proteasas microbianas purificadas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*,
 10 *Weissella sp.*, *Rothia mucilaginosa*, *Rothia aeria*, subtilisinas, natoquinasa, arabinoxilanos, fibra de grano de cebada, fibra de grano de avena, fibra de centeno, fibra de salvado de trigo, inulinas, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), almidón resistente, betaglucanos, glucomananos, galactoglucomananos, goma
 15 guar, xilooligosacáridos, alginato.
29. Un alimento o complemento alimenticio para mascotas o alimento o producto alimenticio para mascotas o producto farmacéutico, que comprende una preparación de acuerdo con cualquiera de los puntos 21 a
 20 28.

Ejemplos de trabajo

Ejemplo 1. Microorganismos probióticos resistentes a enfermedades gastrointestinales

- 25 Se usaron fluidos gástricos e intestinales simulados de acuerdo con lo descrito

por Fernández *et al.* [19]. Las células cultivadas en fase estacionaria se recolectaron a 8000 g durante 10 min, se lavaron con solución fisiológica y se suspendieron en 50 ml de jugo gástrico simulado (densidad celular de 10 log UFC/ml), que contiene NaCl (125 mM/l), KCl (7 mM/l), NaHCO₃ (45 mM/l) y pepsina (3 g/l) (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, EE. UU.) [20]. El pH final se ajustó a 2,0, 3,0 y 8,0. El valor de pH 8,0 se usó para investigar la influencia de los componentes del jugo gástrico simulado, además del efecto del pH bajo. La suspensión se incubó a 37 °C en condiciones anaeróbicas y agitación para simular la peristalsis. Se tomaron alícuotas de esta suspensión a los 0, 90 y 180 min, y se determinó el recuento de viables. El efecto de la digestión gástrica también se determinó por medio de la suspensión de las células en leche desnatada reconstituida (RSM, por su sigla en inglés) (11% de sólidos, p/v) antes de la inoculación de jugo gástrico simulado a un pH de 2,0. El pH final después de la adición de RSM fue de aprox. 3,0. Esta condición se ensayó para simular el efecto de la matriz alimentaria durante el tránsito gástrico [20]. Después de 180 min de digestión gástrica, las células se recolectaron y suspendieron en fluido intestinal simulado, que contiene pancreatina al 0,1% (p/v) y sal biliar Oxgall al 0,15% (p/v) (Sigma-Aldrich Co.) a un pH de 8,0. La suspensión se incubó a 37 °C con agitación y se tomaron alícuotas a 0, 90 y 180 min [21]. 119 de < 400 cepas probadas mostraron una disminución de menos de 2 log de 1x10¹⁰ UFC/ml inicial y se definieron como resistentes a condiciones gastrointestinales simuladas.

Ejemplo 2. Actividades de proteasa y peptidasa de cepas individuales resistentes a afecciones gastrointestinales

Las 119 cepas (*Lactobacillus sp.*, 63 cepas; *Weissella sp.*, 3 cepas; *Pediococcus sp.*, 1 cepa; y *Bacillus sp.*, 51 cepas) que mostraban resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas se probaron para sus actividades de peptidasa y proteinasa hacia sustratos sintéticos. Para ensayar las actividades

5 de peptidasa, se usaron cultivos de cada cepa de la fase exponencial tardía de crecimiento (aproximadamente $9,0 \log \text{ UFC/ml}$). Se resuspendieron alícuotas (0,3 g [peso seco]) de sedimentos celulares lavados en Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), se incubaron a 30°C durante 30 min y se centrifugaron a $13.000 \times g$ durante 10 min para eliminar las enzimas vagamente asociadas a la pared

10 celular. El extracto citoplasmático se preparó por medio de la incubación de suspensiones bacterianas con lisozima en un tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contiene sacarosa al 24% a 37°C durante 60 min, en condiciones de agitación (aproximadamente 160 rpm). Los esferoblastos se resuspendieron en tampón isotónico y se sometieron a sonicación durante 40 seg a 16 A/s (Sony

15 Prep modelo 150; Sanyo, Reino Unido). Los extractos se concentraron 10 veces por medio de liofilización, se resuspendieron en Tris-HCl 5 mM (pH 7,0) y se dializaron durante 24 hs a 4°C . Las actividades generales de aminopeptidasa de tipo N (PepN), prolina iminopeptidasa (PepI), X-prolil dipeptidil aminopeptidasa (PepX) endopeptidasa (PepO) y prolil endopeptidasa

20 (PepP) de los extractos citoplasmáticos de lactobacilos se midieron mediante el uso de Leu-p-nitroanilidas (p -NA), sustratos Pro-p-NA, Gly-Pro-p-NA, Z-Gly-Gly-Leu-p-NA y Z-Gly-Pro-4-nitroanilida (Sigma Chemical Co.), respectivamente. La mezcla de ensayo contenía 900 μl de sustrato 2,0 mM en tampón de fosfato de potasio 0,05 M, a un pH de 7,0 y 100 μl de extracto

25 citoplasmático. La mezcla se incubó a 37°C durante 180 min y la absorbancia

se midió a 410 nm. Los datos se compararon con las curvas estándar establecidas mediante el uso de p-nitroanilina. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-nitroanilina por minuto en las condiciones del ensayo. De acuerdo con los datos

5 del análisis de componentes principales (PCA) de las actividades de peptidasa anteriores, algunas cepas se separaron claramente de las otras (Fig. 1). La Fig. 2 informa las cepas que muestran actividades de peptidasa muy altas (por lo menos para una actividad de peptidasa). La actividad de PepN osciló entre 0,0 (U002-C04; U541-C05; U776-C02; DSM 33301; U021-C01; DSM32540; U567-

10 C04) a $31,400 \pm 0,09$ U (DSM 33362) (valor mediano 3,08). Las cepas con baja actividad de peptidasa (con los números internos/o depositadas en el DSMZ: U002-C04; U541-C05; U776-C02; DSM 33301; U021-C01; DSM32540; U567-C04) no fueron más evaluadas. Las otras cepas más activas fueron DSM 33367, DSM 33374, DSM 33370, DSM 33371, DSM 33377, DSM 33373,

15 *Bacillus pumilus* DSM 33297, *Bacillus subtilis* DSM 33298, DSM 33376, DSM 33375, DSM 33363, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, y *Bacillus megaterium* DSM 33356 (Fig. 1, Fig. 2). El valor mediano de Pepl fue de 1,66. Las cepas más activas (actividad de Pepl > 18 U) fueron DSM 33375, DSM 33373. La actividad de PepX osciló entre 0,0 y aprox. 24 U. Las cepas más activas fueron

20 DSM 33379, DSM 33371, DSM 33370, DSM 33369, DSM 33374, DSM 33373 y DSM 33363 (Fig. 1 y Fig. 2) (valor mediano de 1,81). El valor mediano de PepO fue de 0,54. Las cepas más activas (actividad de PepO > 5 U) fueron DSM 33353, DSM 33355 y DSM 33301. La actividad de PepP osciló entre 0,0 y 6,23 U (DSM 33368) (valor mediano 0,22). Las otras cepas más activas (actividad

25 de PepP > 3 U) fueron *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33378, DSM

33371, DSM 33377, DSM 33367, DSM 33374, DSM 33366, DSM 33373 y DSM 33364.

La Figura 1 muestra los gráficos de puntuación (A) y carga (B) del primer y el segundo componente principal después del análisis de componentes principales (PCA) basados en la aminopeptidasa general de tipo N (PepN),
 5 prolina iminopeptidasa (PepI), X-prolil dipeptidil aminopeptidasa (PepX), actividades de endopeptidasa (PepO) y prolil endopeptidasa (PepP) de los extractos citoplasmáticos de las 119 cepas de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella*. PepN, PepI, PepX, PepP se midieron mediante el
 10 uso de Leu-p-nitroanilidas (p-NA), Pro-p-NA, Gly-Pro-p-NA, Z-Gly-Gly-Leu-p-NA y sustratos de Z-Gly-Pro-4-nitroanilida, respectivamente. Las cepas que mostraban actividades de peptidasa muy altas (por lo menos para una peptidasa) se indicaron en rojo.

La Figura 2 muestra las actividades de peptidasa (PepN, PepI, PepX, PepO y
 15 PepP) de cepas individuales seleccionadas de *Bacillus* (B.), *Lactobacillus* (L.) y *Pediococcus* (P.). Una unidad (U) de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-nitroanilida por minuto en las condiciones del ensayo.

20 **Ejemplo 3. Actividades de peptidasa de una mezcla de cepas contra epítomos inmunogénicos**

Las cepas de *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* que muestran actividades de peptidasa muy altas (por lo menos para una peptidasa) se evaluaron como
 cepas mixtas para combinar actividades enzimáticas intensas y
 25 complementarias. Se usaron diversas mezclas para ensayar su capacidad para

degradar *in vitro* los epítomos inmunogénicos responsables de la intolerancia al gluten.

La hidrólisis de péptidos se llevó a cabo mediante el uso de combinaciones de extractos citoplasmáticos de cepas de bacterias previamente seleccionadas.

5 Los epítomos inmunogénicos correspondientes a los fragmentos 57-68 (Q-L-Q-P-F-P-Q-P-Q-L-P-Y) de α 9-gliadina, 62-75 (P-Q-P-Q-L-P-Y-P-Q-P-Q-S-F-P) de A-gliadina, 134-153 (Q-Q-L-P-Q-P-Q-Q-P-Q-Q-S-F-P-Q-Q-Q-R-P-F) de γ -gliadina, y 57-89 (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-Y-P-Q-P-Q-P-F) (33-mer) de α 2-gliadina se sintetizaron químicamente y se
10 usaron a una concentración inicial de 1 mM. La hidrólisis se controló por medio de RP-HPLC. Los picos individuales de RP-HPLC se analizaron por medio de espectrometría de masas en tándem nano-ESI (nano-ESI-MS/MS). Las mezclas de cepas que mostraron la mejor hidrólisis de epítomos inmunogénicos sintéticos fueron los números 3, 4 y 5 (Figura 3), que hidrolizaron
15 completamente todos los péptidos tóxicos (90% de hidrólisis o más). La Figura 3 muestra las actividades de peptidasa de mezclas de cepas contra epítomos inmunogénicos.

Las mezclas de cepas fueron de la siguiente manera:

1. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33363,
20 DSM 33364, DSM 33366; *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379; *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300, *Bacillus subtilis* DSM 33353.
2. *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, DSM 33376; *L.*
25 *plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33369, DSM 33368; *L.*

- sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378; *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356, *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33301.
3. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363,
 5 DSM 33364; *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*)
 DSM 33373, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377; *Bacillus*
pumilus DSM 33297, DSM 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354,
Bacillus megaterium DSM 33300, *Bacillus subtilis* DSM 33353.
4. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367,
 10 DSM 33368; *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375; *L.*
sanfranciscensis (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379;
Bacillus pumilus DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM
 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33298, DSM 33353.
5. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369,
 15 *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *L.*
paracasei (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376; *Pediococcus*
pentosaceus DSM 33371, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus*
sanfranciscensis) DSM 33378; *Bacillus licheniformis* DSM 33354,
Bacillus pumilus DSM 33301, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM
 20 33356, *Bacillus subtilis* DSM 33298.
6. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33367,
Lactobacillus reuteri (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *L. brevis*
 (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377; *Bacillus pumilus* DSM 33301,
Bacillus megaterium DSM 33300, DSM 33356, *Bacillus subtilis* DSM
 25 33298.

Ejemplo 4. Degradación del gluten en condiciones gastrointestinales simuladas por diferentes consorcios

Se evaluó la degradación del gluten bajo digestión gastrointestinal simulada.

- 5 Con la intención de desarrollar una solución técnica viable para la degradación total del gluten *in vivo*, se buscaron combinaciones mínimas que contuvieran la menor cantidad posible de cepas y tantas como sea necesario.

Mediante el uso de las mezclas 1 a 6 del Ejemplo 3 como punto de partida, se prepararon los siguientes consorcios, seleccionados de un total de 22 cepas

- 10 (*Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33362, DSM 33363, DSM 33364, DSM 33366, DSM 33368, DSM 33369 y DSM 33367; *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374; *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, DSM 33375;
- 15 *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, DSM 33301, DSM 33355, *Bacillus licheniformis* DSM 33354, *Bacillus megaterium* DSM 33300, DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33298, DSM 33353):

1. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33363 y
20 DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355, DSM 33301;
2. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362 y DSM 33367,
DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375,
25 *Bacillus subtilis* DSM 33298, *Bacillus licheniformis* DSM 33354 y

- Bacillus megaterium* DSM 33300;
3. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33353;
 4. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301;
 5. *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *Pediococcus pentosaceus* DSM 33371, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33369, *Bacillus pumilus* DSM 33297 y *Bacillus megaterium* DSM 33300;
 6. *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, DSM 33368; *Bacillus pumilus* DSM 33355 y *Bacillus licheniformis* DSM 33354;
 7. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33362 y DSM 33366, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33353.
 8. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297;
 9. *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33367, *L. reuteri*

- (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, *B. licheniformis* DSM 33354;
10. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, DSM 33364, DSM 33370, *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *B. pumilus* DSM 33297, *Bacillus megaterium* DSM 33356;
11. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33367, DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *B. megaterium* DSM 33300, *B. subtilis* DSM 33353;
12. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33366, DSM 33369, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33376, *P. pentosaceus* DSM 33371, *B. pumilus* DSM 33297, DSM 33355;
13. *L. brevis* (*Levilactobacillus brevis*) DSM 33377, *P. pentosaceus* DSM 33371, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33379, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297;
14. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33368, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33375, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, *B. licheniformis* DSM 33354;
15. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33366, DSM 33370, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L. sanfranciscensis* (*Fructilactobacillus sanfranciscensis*) DSM 33378, DSM 33379, *B. licheniformis* DSM 33354, *B. subtilis* DSM 33353;
16. *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *L. reuteri*

(*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *B. megaterium* DSM 33300, *B. pumilus* DSM 33297, DSM 33355.

Se suspendieron cinco gramos de pan de trigo (masticados durante 30 seg y recogidos en un vaso de precipitados con 10 ml de fosfato de NaK 0,05 M, a un pH de 6,9) o masa relacionada en jugo gástrico simulado que contenía NaCl (125 mM), KCl (7 mM), NaHCO₃ (45 mM) y pepsina (3 g/L) (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, EE. UU.). La suspensión se añadió de las cepas seleccionadas agrupadas como vivas (con una densidad celular final de aproximadamente 9,0 log UFC/ml) y bacterias lisadas (correspondientes a 9,0 log células/ml). La cantidad inicial calculada de gluten en la mezcla de reacción fue de 7.000 ppm. Una masa de control, sin adición de mezcla bacteriana, también se sometió a digestión simulada. La suspensión se incubó a 37 °C, con agitación para simular la peristalsis. Después de 180 min de digestión gástrica, la suspensión se añadió con fluido intestinal simulado, que contenía pancreatina al 0,1% (p/v) y sal biliar Oxgall (Sigma-Aldrich Co.) al 0,15% (p/v) a un pH de 8,0. Además de pancreatina y sal biliar, el líquido contenía la preparación enzimática E1, E2 (cada una a 0,2 g/kg), enzimas Veron HPP (10 g/100 kg de proteína) y Veron PS (25 g/100 kg de proteína). Proteasas de *Aspergillus oryzae* (500.000 unidades de hemoglobina en base a tirosina/g; enzima 1 [E1]) y *Aspergillus niger* (3000 unidades espectrofotométricas de proteasa ácida/g; enzima 2 [E2]), que se usan habitualmente para aplicaciones de panadería, fueron suministradas por BIO-CAT Inc. (Troy, VA). Veron HPP y Veron PS son proteasas bacterianas de *Bacillus subtilis* (AB Enzymes). No se añadió mezcla enzimática (E1, E2, Veron PS, Veron HPP) en la masa de control. La digestión intestinal se llevó a cabo durante 48 hs a 37 °C en condiciones de agitación

(aproximadamente 200 rpm). Después de la digestión, las muestras se pusieron en hielo y la concentración de gluten hidrolizado se determinó de acuerdo con un método de análisis oficial internacional (OMA) de la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (AOAC) (Método Núm. AACCI 38-55.01) mediante el uso de sándwich a base de anticuerpos R5 y ELISA competitivo (R5-ELISA) [22]. El análisis de R5-ELISA se llevó a cabo con el kit de detección competitiva RIDASCREEN® Gliadin de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R-Biopharm AG, Alemania). Además, se usó el kit de detección de residuos de gluten de ELISA Systems (Windsor, Australia) para la cuantificación del gluten residual. La presencia de epítomos en las muestras digeridas se controló después de 6, 16, 24, 36 y 48 hs de incubación por medio de análisis por HPLC. La cromatografía líquida junto con la espectrometría de masas en tándem de trampa de iones de ionización por nanoelectropulverización (nano-ESI-MS/MS) también se usó para confirmar la hidrólisis del gluten y la ausencia de epítomos tóxicos.

De acuerdo con lo estimado por el R5-ELISA (Método Oficial de Análisis de AOAC, Método Núm. AACCI 38-55.01), después de 6 hs de digestión la concentración de gluten hidrolizado estuvo en el intervalo de $810 \pm 0,02$ ppm para el control y $310 \pm 0,06$ ppm. para la mezcla 3 (Tabla 2). Después de 16 y 24 hs de digestión, el contenido de gluten fue ≥ 100 ppm para la mayoría de las mezclas, con la excepción de la mezcla 16. Es importante destacar que los niveles de fragmentos de gluten estaban por debajo de 20 ppm después de 36 hs de digestión con las mezclas 4 y 16; mientras que los fragmentos de gluten estaban completamente ausentes al final de la incubación (48 hs) para las mezclas 4, 5, 6, 8 y 16.

Con respecto al gluten residual, la mayoría de las mezclas (MC1-9, 16) lo redujeron por debajo del umbral crítico de 20 ppm dentro de las 24 hs de la digestión. Además, las mezclas 4 a 9 y 16 pudieron disminuir el gluten residual a ≤ 20 ppm en 16 hs. Más importante aún, la mezcla 4 se mostró completa
5 después de 16 hs de digestión (Figura 5). MC8 y MC16 dieron como resultado la degradación completa del gluten ya dentro de las primeras seis horas de digestión. En total, MC4, MC8 y MC16 provocaron la eliminación más eficiente de gluten intacto y fragmentado (Tabla 2).

	Cepas	Ensayo de ELISA de tipo sándwich (gluten residual)					Ensayo de ELISA competitivo (fragmentos de gluten)				
		6 hs	16 hs	24 hs	36 hs	48 hs	6 hs	16 hs	24 hs	36 hs	48 hs
Control	<i>L. plantarium</i> DSM33370, DSM33363, DSM33364; <i>L. paracasei</i> DSM33373; <i>L. brevis</i> DSM33377; <i>B. pumilus</i> DSM33297, DSM33355, DSM33301	1100 ^a ±0.06	620 ^a ±0.09	367 ^a ±0.05	256 ^a ±0.04	75 ^a ±0.06	810 ^a ±0.03	400 ^a ±0.02	397 ^a ±0.08	381 ^a ±0.07	375 ^a ±0.05
MC1	<i>L. plantarium</i> DSM33362, DSM33367, DSM33368; <i>L. paracasei</i> DSM33375; <i>B. subtilis</i> DSM33298; <i>B. licheniformis</i> DSM33354; <i>B. megaterium</i> DSM33300	406 ^b ±0.04	135 ^b ±0.06	19 ^a ±0.01	0 ^a	0 ^a	310 ^d ±0.05	250 ^d ±0.03	200 ^a ±0.04	170 ^a ±0.02	65 ^a ±0.01
MC2	<i>L. plantarium</i> DSM33362, DSM33367, DSM33368; <i>L. paracasei</i> DSM33375; <i>B. subtilis</i> DSM33298; <i>B. licheniformis</i> DSM33354; <i>B. megaterium</i> DSM33300	346 ^c ±0.07	121 ^b ±0.03	15 ^a ±0.01	0 ^a	0 ^a	332 ^d ±0.05	226 ^d ±0.04	167 ^b ±0.03	158 ^a ±0.02	150 ^a ±0.02
MC3	<i>L. plantarium</i> DSM33366, DSM33369; <i>L. reuteri</i> DSM33374; <i>L. paracasei</i> DSM33376; <i>P. pentosaceus</i> DSM33371; <i>B. megaterium</i> DSM33356; <i>B. subtilis</i> DSM33353	382 ^c ±0.03	99 ^a ±0.02	12 ^a ±0.01	0 ^a	0 ^a	315 ^d ±0.06	272 ^d ±0.07	256 ^d ±0.04	244 ^c ±0.05	228 ^b ±0.02
MC4	<i>L. plantarium</i> DSM33363, DSM33364; <i>L. paracasei</i> DSM33373; <i>B. subtilis</i> DSM33298; <i>B. pumilus</i> DSM33301	190 ^{cd} ±0.05	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	399 ^a ±0.08	233 ^a ±0.07	112 ^a ±0.05	0 ⁱ	0 ^a
MC5	<i>L. brevis</i> DSM33377; <i>P. pentosaceus</i> DSM33371; <i>L. plantarium</i> DSM33369; <i>B. pumilus</i> DSM33297; <i>B. megaterium</i> DSM33300	380 ^b ±0.06	18 ^a ±0.01	5 ^a ±0.01	0 ^a	0 ^a	398 ^a ±0.04	221 ^a ±0.05	154 ^a ±0.03	46 ^a ±0.02	0 ^a
MC6	<i>L. paracasei</i> DSM33375; <i>L. plantarium</i> DSM33367; DSM33368; <i>B. pumilus</i> DSM33355; <i>B. licheniformis</i> DSM33354	350 ^c ±0.06	15 ^a ±0.02	2 ^a ±0.01	0 ^a	0 ^a	404 ^a ±0.06	245 ^d ±0.05	100 ^a ±0.08	79 ^a ±0.04	0 ^a
MC7	<i>L. plantarium</i> DSM33370, DSM33362, DSM33366; <i>L. reuteri</i> DSM33374; <i>B. megaterium</i> DSM33356; <i>B. subtilis</i> DSM33353	360 ^c ±0.09	20 ^a ±0.06	10 ^a ±0.01	0 ^a	0 ^a	401 ^a ±0.07	261 ^d ±0.05	150 ^a ±0.03	99 ^a ±0.04	78 ^a ±0.05
MC8	<i>L. plantarium</i> DSM33363, DSM33364; <i>L. paracasei</i> DSM33375; <i>L. reuteri</i> DSM33374; <i>B. megaterium</i> DSM33300; <i>B. pumilus</i> DSM33297	18 ^a ±0.03	3 ^a ±0.01	0 ^a	0 ^a	0 ^a	323 ^d ±0.08	228 ^a ±0.06	218 ^a ±0.05	157 ^a ±0.06	0 ^a

MC9	<i>L. paracasei</i> DSM33375; <i>L. plantarum</i> DSM33367; <i>L. reuteri</i> DSM33374; <i>B. megaterium</i> DSM33300; <i>B. pumilus</i> DSM33297; <i>B. licheniformis</i> DSM33354	60 [±] 0.04	12 [±] 0.01	0 [#]	0 [*]	0 [*]	319 [±] 0.06	211 [±] 0.05	196 [±] 0.03	195 [±] 0.07	152 [±] 0.02
MC10	<i>L. plantarum</i> DSM33363, DSM33364, DSM33370; <i>L. brevis</i> DSM33377; <i>B. pumilus</i> DSM33297; <i>B. megaterium</i> DSM33356	112 [±] 0.06	77 [±] 0.04	70 [±] 0.02	0 [*]	0 [*]	465 [±] 0.09	370 [±] 0.06	243 [±] 0.05	145 [±] 0.04	97 [±] 0.03
MC11	<i>L. plantarum</i> DSM33368, DSM33362, DSM33367; <i>L. paracasei</i> DSM33375; <i>B. megaterium</i> DSM33300; <i>B. subtilis</i> DSM33353	221 [±] 0.05	89 [±] 0.07	69 [±] 0.06	50 [±] 0.04	43 [±] 0.03	512 [±] 0.06	367 [±] 0.08	340 [±] 0.09	300 [±] 0.06	123 [±] 0.05
MC12	<i>L. plantarum</i> DSM33366, DSM33369; <i>L. reuteri</i> DSM33374; <i>L. paracasei</i> DSM33376; <i>P. pentosaceus</i> DSM33371; <i>B. pumilus</i> DSM33297, DSM33355	145 [±] 0.06	110 [±] 0.05	89 [±] 0.03	75 [±] 0.02	63 [±] 0.03	601 [±] 0.09	312 [±] 0.06	289 [±] 0.07	288 [±] 0.05	143 [±] 0.03
MC13	<i>L. brevis</i> DSM33377; <i>P. pentosaceus</i> DSM33371; <i>L. sanfranciscensis</i> DSM33379; <i>B. megaterium</i> DSM33300; <i>B. pumilus</i> DSM33297	163 [±] 0.06	122 [±] 0.04	82 [±] 0.02	45 [±] 0.03	0 [*]	523 [±] 0.07	322 [±] 0.07	321 [±] 0.06	215 [±] 0.07	134 [±] 0.05
MC14	<i>L. plantarum</i> DSM33368; <i>L. paracasei</i> DSM33375; <i>L. sanfranciscensis</i> DSM33378; <i>B. megaterium</i> DSM33300; <i>B. pumilus</i> DSM33297; <i>B. licheniformis</i> DSM33354	234 [±] 0.08	135 [±] 0.07	120 [±] 0.07	108 [±] 0.05	56 [±] 0.03	587 [±] 0.09	333 [±] 0.09	256 [±] 0.08	211 [±] 0.08	167 [±] 0.07
MC15	<i>L. plantarum</i> DSM33362, DSM33366, DSM33370; <i>L. reuteri</i> DSM33374; <i>L. sanfranciscensis</i> DSM33378, DSM33379; <i>B. licheniformis</i> DSM33354; <i>B. subtilis</i> DSM33353	199 [±] 0.05	100 [±] 0.04	81 [±] 0.05	59 [±] 0.04	40 [±] 0.03	498 [±] 0.08	318 [±] 0.04	280 [±] 0.03	256 [±] 0.08	118 [±] 0.05
MC16	<i>L. plantarum</i> DSM33363, DSM33364; <i>L. paracasei</i> DSM33373; <i>L. reuteri</i> DSM33374; <i>B. megaterium</i> DSM33300; <i>B. pumilus</i> DSM33297, DSM33355	19 [±] 0.03	11 [±] 0.01	0 [#]	0 [*]	0 [*]	280 [±] 0.06	200 [±] 0.05	50 [±] 0.03	10 [±] 0.01	0 [#]

Tabla 2. Concentración (ppm) de gluten residual y fragmentos peptídicos de prolaminas después de 6, 16, 24, 36 y 48 hs de digestión gastrointestinal simulada, estimada por medio de pruebas ELISA específicas. Control: masa digerida sin células bacterianas ni enzimas comerciales; MC1 a MC16:

5 Consorcios microbianos contruidos mediante el uso de células vivas y lisadas de cepas seleccionadas de *Lactobacillus* (L.) y *Bacillus* (B.) y las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP. Los datos son la media de tres análisis independientes. ^{a-j}Los valores con diferentes letras en superíndice, en la misma fila, difieren de manera significativa ($P < 0,05$).

10 Con base en la cantidad inicial calculada de gluten en la mezcla de reacción de 7.000 ppm, con respecto al gluten residual, todas las mezclas pudieron reducirlo en por lo menos un 94% después de 6 hs (en comparación con una reducción de aproximadamente el 84% para el control), en por lo menos un 98% después de 16 hs y hasta en por lo menos un 99,1% después de 48 hs.

15 En cuanto a los fragmentos de gluten, se redujeron en todas las mezclas en por lo menos un 91% después de 6 hs (en comparación con una reducción de aproximadamente el 88% para el control), en por lo menos un 95% después de 16 hs y hasta en por lo menos un 97% después de 48 hs.

En cuanto al gluten residual, las cepas más eficientes MC4, MC8 y MC16

20 fueron capaces de reducirlo por lo menos en un 97% a las 6 hs, por lo menos en un 99,8% a las 16 hs y hasta en un 100% a las 24 hs. En cuanto a los fragmentos de gluten, los de las cepas más eficientes MC4, MC8 y MC16 los redujeron en por lo menos un 94% a las 6 hs, en por lo menos un 97% a las 16 hs, en por lo menos un 98% a las 36 hs y en un 100% a las 48 hs. La Figura 4

25 muestra los perfiles de péptido RP-HPLC de muestras de pan de trigo digerido

de control (panel A), la Mezcla 4 (panel B) y la Mezcla 7 (panel C). M4 y M7 se combinaron con las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP. La Mezcla 4 llevó a la hidrólisis completa (93%) de todos los péptidos inmunogénicos, mientras que la Mezcla 7 solo logró una hidrólisis parcial (56%). En conclusión, se han hallado mezclas completamente funcionales que comprenden solo 4 a 7 cepas seleccionadas, en comparación con mezclas más extensas reveladas en el Ejemplo 3.

Para consorcios microbianos de ejemplo, se llevaron a cabo experimentos con y sin enzimas comerciales añadidas. Los consorcios por sí solos dieron lugar a fuertes reducciones del gluten residual e hidrolizado, y esto se mejoró aún más con la adición de enzimas.

Ejemplo 5. Evaluación de la inmunogenicidad de las digestiones de gluten mediante el uso de explantes duodenales de pacientes celíacos

La inmunogenicidad de los digeridos se estimó *ex vivo* por medio de la prueba de la expresión de citocinas en muestras de biopsia duodenal de pacientes con enfermedad celíaca (EC). Todos los pacientes con EC expresaron el fenotipo HLA-DQ2. La EC se diagnosticó de acuerdo con los criterios de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica [23]. Inmediatamente después de la escisión, todas las muestras de biopsia se colocaron en medio de cultivo refrigerado con hielo (RPMI 1640; Gibco-Invitrogen, Reino Unido) y se transportaron al laboratorio en 30 minutos. Las muestras de biopsia duodenal se cultivaron durante 4 hs mediante el uso del método de cultivo de tejido orgánico descrito originalmente por Browning y Trier [24]. Brevemente, las muestras de biopsia se orientaron con el lado vellosos

hacia arriba sobre una malla de acero inoxidable y se colocaron sobre el pocillo central de una placa de cultivo de tejidos de órganos (Falcon, EE.UU.). El pocillo contenía RPMI suplementado con suero de ternero fetal al 15% (Gibco-Invitrogen) y penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco-Invitrogen, Reino Unido).

5 Los platos se colocaron en una jarra anaeróbica y se incubaron a 37 °C.

Las muestras digeridas de masa control (control positivo) (pan de trigo digerido sin la adición de células bacterianas y enzimas microbianas), la Mezcla 4 (pan de trigo digerido con la adición de células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y

10 *Bacillus pumilus* DSM 33301 y las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP) y la Mezcla 7 (pan de trigo digerido con la adición de células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362 y DSM 33366, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *L.*

15 *plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33353 y las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP) se sometieron a extracción de polipéptidos de gliadina y glutenina y se usaron para evaluar su capacidad para inducir la expresión de citocinas en muestras de biopsia duodenal de pacientes con EC. Se cultivaron

20 cuatro muestras de biopsia de cada paciente con EC con medio de cultivo en cinco condiciones: (i) con masa que contenía la Mezcla 4 (pan de trigo digerido con la adición de células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM

25 33301 y las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP) digeridas

durante 48 hs; (ii) con masa que contenía la Mezcla 7 (pan de trigo digerido con la adición de células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33370, DSM 33362 y DSM 33366, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y

5 *Bacillus subtilis* DSM 33353 y las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP) digeridas durante 48 hs; (iii) con masa que contenía la Mezcla 16 (pan de trigo digerido con la adición de células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33330, y

10 *Bacillus pumilus* DSM 33297 y DSM 33355 y las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP) digeridas durante 48 hs; (iv) con masa de control digerida durante 48 hs (Control); y (v) con medio de cultivo (RPMI 1640 + jugo gástrico e intestinal, control negativo). Las muestras de biopsia de cada paciente se enjuagaron y almacenaron en RNAlater (Qiagen GmbH, Alemania)

15 a -80 °C para preservar el ARN. El ARN total se extrajo de los tejidos mediante el uso del minikit RNeasy (Qiagen GmbH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARNm se estimó por medio de la determinación de la absorbancia de UV a 260 nm. Se sometieron a transcripción inversa alícuotas de ARN total (500 ng) mediante el uso de

20 hexámeros aleatorios, reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Monza, Italia) y 3,125 U/μl de transcriptasa inversa MultiScribe hasta un volumen final de 50 μl. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C. La RT-PCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos mediante el uso de un sistema de detección de secuencia rápida ABI Prism 7500HT (Applied

25 Biosystems). La recopilación y el análisis de datos se llevaron a cabo mediante

el uso del software de la máquina. Se adquirieron cebadores de PCR y sondas fluorogénicas para los genes diana (IFN- γ , IL-2 e IL-10) y el control endógeno (gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [GAPDH]) como un ensayo de expresión génica TaqMan y un ensayo TaqMan desarrollado
5 previamente (Applied Biosystems), respectivamente. Los ensayos se suministraron como una mezcla 20x de cebadores de PCR y sondas marcadas con colorante de 6-carboxifluoresceína TaqMan Minor Groove Binder con un atenuador no fluorescente en el extremo 3' de la sonda. Se llevó a cabo una PCR de transcripción inversa de dos pasos mediante el uso de ADNc de
10 primera cadena con una concentración final de 1x TaqMan mezcla de ensayo de expresión génica y 1x TaqMan universal PCR mezcla maestra. El volumen de reacción final fue de 25 μ l. Cada muestra se analizó por triplicado y todos los experimentos se repitieron dos veces. Con cada placa se incluyó un control sin molde (agua sin ARNasa). Se usaron las siguientes condiciones de
15 termociclador: 2 min a 50 °C (activación de uracil ADN glicosilasa), 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C. Inicialmente, se llevaron a cabo una curva estándar y un experimento de validación para cada conjunto de cebador/sonda. Seis diluciones seriadas (20 a 0,1 ng/ μ l) de ADNc de IFN- γ , IL-2, o IL-10 se usaron como molde para cada conjunto de cebadores/sondas. Se
20 generó una curva estándar por medio del trazado de los valores del ciclo umbral (CT) frente al logaritmo de la cantidad de ADNc de entrada. El valor de CT es el ciclo de PCR en el que se detecta por primera vez un aumento de la fluorescencia del indicador por encima del nivel de referencia. El valor mediano para el gen diana se normalizó mediante el uso de un gen de referencia
25 endógeno (el gen GAPDH). Se usó una muestra de biopsia duodenal sana para

calibrar todos los experimentos. Los niveles de las proteínas IFN- γ , IL-2 e IL-10 secretadas en el sobrenadante se cuantificaron por medio de ELISA en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Tema Ricerca, Milán, Italia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

- 5 Como se esperaba, las muestras de biopsia duodenal incubadas con control positivo produjeron una expresión significativamente más alta ($P < 0,05$) de ARNm de interleucina 2 (IL-2), interleucina 10 (IL-10) (B) e interferón gamma (IFN- γ) que el control negativo (RPMI 1640 + jugo gástrico e intestinal) (Figura 5). En comparación con el control negativo, las muestras digeridas con las
- 10 Mezclas 4 y 16 mostraron el mismo nivel ($P > 0,05$) de IL-2, IL-10 e IFN- γ . La mezcla 7 se caracterizó por una menor síntesis de IL-2 que el control positivo, pero, en comparación con el control negativo, así como también las mezclas 4 y 16, por una mayor síntesis de IL-2. También se encontraron tendencias similares para IL-10 e IFN- γ . Estos resultados se correlacionan muy bien con la
- 15 eliminación total y parcial de péptidos inmunogénicos por la mezcla 4 y 7, respectivamente, de acuerdo lo mostrado en la Figura 4 A-C.

- La Figura 5 A muestra la concentración (ng/ μ l) de interleucina 2 (IL-2) en muestras de biopsia duodenal de pacientes con EC. Control: pan de trigo digerido sin la adición de células bacterianas y enzimas microbianas; RPMI +
- 20 jugo gástrico e intestinal: control negativo; Consorcio Microbiano 4: pan de trigo digerido con la adición de células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363 y DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *Bacillus subtilis* DSM 33298 y *Bacillus pumilus* DSM 33301 y las Enzimas comerciales E1, E2, Veron PS,
- 25 Veron HPP); Consorcio Microbiano 7: pan de trigo digerido con la adición de

células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33362, DSM 33366 y DSM 33370, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33356 y *Bacillus subtilis* DSM 33353 y las enzimas comerciales E1, E2, Veron PS, Veron HPP; y Consorcio Microbiano

5 16: pan de trigo digerido con la adición de células vivas y lisadas de *L. plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) DSM 33363, DSM 33364, *L. paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*) DSM 33373, *L. reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) DSM 33374, *Bacillus megaterium* DSM 33330, *Bacillus pumilus* DSM 33297, DSM 33355. CD1 a CD10, muestras de biopsia duodenal de pacientes

10 celíacos.

La Figura 5 B muestra la concentración (ng/μl) de interleucina 10 (IL-10) en muestras de biopsia duodenal de pacientes con EC. Las muestras y los consorcios microbianos son equivalentes a la Figura 5 A.

La Figura 5 C muestra la concentración (ng/μl) de interferón gamma (IFN-γ) en

15 muestras de biopsia duodenal de pacientes con EC. Las muestras y los consorcios microbianos son equivalentes a la Figura 5 A.

Los hallazgos de esta invención proporcionan evidencia de que las combinaciones seleccionadas de cepas bacterianas probióticas tienen el potencial de mejorar la digestión del gluten en pacientes sensibles al gluten y

20 de hidrolizar péptidos inmunogénicos durante la digestión gastrointestinal, lo que disminuye la toxicidad del gluten para los pacientes sensibles al gluten en general y para pacientes con EC en particular.

Referencias

1. Sapone A., Bai J. C., Ciacci C., Dolinsek J., Green P. H., Hadjivassiliou M., Kaukinen K., Rostami K., Sanders D. S., Schumann M. *et. al.*: **Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification.** *BMC Med.* 2012, **10**:13.
5
2. Niland B., Cash B. D.: **Health Benefits and Adverse Effects of a Gluten-Free Diet in Non-Celiac Disease Patients.** *Gastroenterol. Hepatol. (N Y)* 2018, **14** (2):82 a 91.
3. Lis D. M., Stellingwerff T., Shing C. M., Ahuja K. D., Fell J. W.: **Exploring the popularity, experiences, and beliefs surrounding gluten-free diets in nonceliac athletes.** *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2015, **25** (1):37 a 45.
10
4. Wild D., Robins G. G., Burley V. J., Howdle P. D.: **Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet.** *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2010, **32** (4):573 a 581.
15
5. Thompson T., Dennis M., Higgins L. A., Lee A. R., Sharrett M. K.: **Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods?** *J. Hum. Nutr. Diet.* 2005, **18** (3):163 a 169.
6. Larretxi I., Simon E., Benjumea L., Miranda J., Bustamante M. A., Lasa A., Eizaguirre F. J., Churrua I.: **Gluten-free-rendered products contribute to imbalanced diets in children and adolescents with celiac disease.** *Eur. J. Nutr.* 2018.
20
7. De Palma G., Nadal I., Collado M. C., Sanz Y.: **Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human**
25

- subjects.** *Br. J. Nutr.* 2009, **102** (8):1154 a 1160.
8. Galipeau H. J., McCarville J. L., Huebener S., Litwin O., Meisel M., Jabri B., Sanz Y., Murray J. A., Jordana M., Alaedini A. *et. al.*: **Intestinal microbiota modulates gluten-induced immunopathology in humanized mice.** *Am. J. Pathol.* 2015, **185** (11):2969 a 2982.
 9. Caminero A., Galipeau H. J., McCarville J. L., Johnston C. W., Bernier S. P., Russell A. K., Jury J., Herran A. R., Casqueiro J., Tye-Din J. A. *et. al.*: **Duodenal Bacteria From Patients With Celiac Disease and Healthy Subjects Distinctly Affect Gluten Breakdown and Immunogenicity.** *Gastroenterology* 2016, **151** (4):670 a 683.
 10. Francavilla R., Ercolini D., Piccolo M., Vannini L., Siragusa S., De Filippis F., De Pasquale I., Di Cagno R., Di Toma M., Gozzi G. *et. al.*: **Salivary microbiota and metabolome associated with celiac disease.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, **80** (11):3416 a 3425.
 11. De Angelis M., Cassone A., Rizzello C. G., Gagliardi F., Minervini F., Calasso M., Di Cagno R., Francavilla R., Gobbetti M.: **Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, **76** (2):508 a 518.
 12. Francavilla R., Cristofori F., Verzillo L., Gentile A., Castellaneta S., Polloni C., Giorgio V., Verduci E., D'Angelo E., Dellatte S. *et. al.*: **Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Crossover Trial for the Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity in Children.** *Am. J. Gastroenterol.* 2018, **113** (3):421 a 430.
 13. Francavilla R., De Angelis M., Rizzello C. G., Cavallo N., Dal Bello F.,

- Gobbetti M.: **Selected Probiotic Lactobacilli Have the Capacity To Hydrolyze Gluten Peptides during Simulated Gastrointestinal Digestion.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2017, **83** (14).
14. Herran A. R., Perez-Andres J., Caminero A., Nistal E., Vivas S., Ruiz de
5 Morales J. M., Casqueiro J.: **Gluten-degrading bacteria are present in the human small intestine of healthy volunteers and celiac patients.** *Res. Microbiol.* 2017, **168** (7):673 a 684.
15. Caminero A., Herran A. R., Nistal E., Perez-Andres J., Vaquero L., Vivas S., Ruiz de Morales J. M., Albillos S. M., Casqueiro J.: **Diversity of the
10 cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease.** *FEMS. Microbiol. Ecol.* 2014, **88** (2):309 a 319.
16. Pyle G. G., Paaso B., Anderson B. E., Allen D. D., Marti T., Li Q., Siegel M., Khosla C., Gray G.M.: **Effect of pretreatment of food gluten with
15 prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue.** *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2005, **3** (7):687 a 694.
17. Krishnareddy S., Stier K., Recanati M., Lebwohl B., Green P. H.: **Commercially available glutenases: a potential hazard in coeliac disease.** *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2017, **10** (6):473 a 481.
- 20 18. Shan L., Marti T., Sollid L. M., Gray G. M., Khosla C.: **Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue.** *Biochem. J.* 2004, **383** (Pt 2):311 a 318.
19. Fernandez M. F., Boris S., Barbes C.: **Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract.** *J. Appl.
25 Microbiol.* 2003, **94** (3):449 a 455.

20. Zarate G., Chaia A. P., Gonzalez S., Oliver G.: **Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids.** *J. Food Prot.* 2000, **63** (9):1214 a 1221.
- 5 21. De Angelis M., Siragusa S., Berloco M., Caputo L., Settanni L., Alfonsi G., Amerio M., Grandi A., Ragni A., Gobbetti M.: **Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding.** *Res. Microbiol.* 2006, **157** (8):792 a 801.
- 10 22. Valdes I., Garcia E., Llorente M., Mendez E.: **Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol.** *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003, **15** (5):465 a 474.
- 15 23. De ES: **Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition.** *Arch Dis Child* 1990, **65** (8):909 a 911.
24. Browning T.H., Trier J.S.: **Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine.** *J. Clin. Invest.* 1969, **48** (8):1423 a 1432.