



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103788** (13) **C2**
(51) МПК**A21D 8/04** (2006.01)**A21D 13/06** (2006.01)**C12N 1/20** (2006.01)**C12R 1/225** (2006.01)**C12R 1/25** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2011 09222**
(22) Дата подання заявки: **17.12.2009**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.11.2013**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **RM2008A000690**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **23.12.2008**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **ІТ**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.08.2011, Бюл.№ 16**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.11.2013, Бюл.№ 22**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/ІТ2009/000569, 17.12.2009**

(72) Винахідник(и):
Джуліані Джаммарія (ІТ), Бенедузі Анна (ІТ), ді Каньо Рафаела (ІТ), Ріцело Карло Джузеппе (ІТ), де Анджеліс Марія (ІТ), Гобеті Марко (ІТ), Касоне Анджела (ІТ)
(73) Власник(и):
ДЖУЛІАНІ С.П.А., Via Palagi 2, I-20129, Milano, Italy (ІТ)
(74) Представник:
Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2008/010252 A, 24.01.2008.
Di Cagno, Rizzello, De Angelis, Cassone, GIULIANI, DENEDUSI Use of selected sourdough strains of Lactobacillus for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread // Journal of food protection. - 2008. - Vol. 71, no. 7, US 2008/131556 AI, 05.06.2008.
Corsetti et al., Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2000. - Vol. 48. - P. 3044-3051.
Moore M.M. et al., Effect of lactic acid bacteria on properties of gluten-free sourdoughs, batters, and quality and ultrastructure of gluten-free bread // CEREAL CHEMISTRY. - 2007. - Vol. 84. - № 4. - P. 357-364.
COPPOLA S., Pepe O. Effect of leavening microflora on pizza dough properties // Journal of Applied Microbiology. - 1998. - Vol. 85. - P. 891-897.
Moore M.M. Sourdough fermented by Lactobacillus plantarum FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread // European Food Research and Technology. - 2007. - Vol. 226. - P. 1309-1316.

UA 103788 C2

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ДРІЖДЖОВИХ ХЛІБОБУЛОЧНИХ ВИРОБІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ГЛЮТЕН-ДЕТОКСИФІКОВАНОГО БОРОШНА

(57) Реферат:

Винахід належить до застосування виділених молочнокислих бактерій *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 та *Lactobacillus plantarum* DSM 22064 і ферментів цвілевих грибів для повного розкладання глютену в отриманому із зернових культур борошні, яке після детоксикації може використовуватися для виробництва харчових продуктів, що не містять глютену.

Даний винахід стосується застосування мікробіологічної технології для повного розкладання глютену в борошні. Зокрема, спосіб згідно винаходу включає застосування в умовах ферментації в рідкій фазі виділених молочних бактерій і грибкових протеаз, зазвичай використовуваних у виробництві хлібобулочних виробів з дріжджового тіста, для повного розкладання глютену (залишкова концентрація глютену нижче 20 ч./млн.) Зернове борошно, що виходить в результаті ферментації, може застосовуватися як початковий матеріал для виробництва харчових продуктів, що не містять глютену, призначених для харчування пацієнтів, які страждають на глютенову хворобу. Запропонований біотехнологічний спосіб приводить до отримання різних економічних, соціальних, поживних і органолептичних переваг у порівнянні з існуючою технологією виробництва харчових продуктів, що не містять глютену, виготовляються з інгредієнтів, що не містять глютену природним чином або в результаті обробки екстракційними способами.

Епідеміологічна поширеність непереносимості глютену, або глютеніт, або глютеніт, безперервно росте. Останні обстеження населення повідомляють про схильність до цього стану кожного сотого жителя Європи і Сполучених Штатів (Rewers, 2005. Epidemiology of celiac disease; what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease (Епідеміологія глютенітної хвороби; поширеність, частота виникнення та розвиток глютенітної хвороби). Gastroenterology 128:47-51). Згідно сучасним уявленням, єдиним ефективним терапевтичним засобом проти цієї харчової непереносимості є повністю безглютеніт дієта, яка повинна строго дотримуватися впродовж всього життя (Hamer, 2005. Celiac Disease: Background and biochemical aspects (Глютеніт хвороба: передумови і біохімічні аспекти). Biotechnol Advanc 23:401-408). Відоме, наприклад, застосування молочних бактерій для приготування хлібобулочних виробів з борошна, що не містить білків (More та ін. Cereal Chemistry, American Association of Cereal Chemists. Міннеаполіс, США, том 84 №4, 1 січня 2007, стор. 357-364 і Moore та ін., European Food Research and Technology, том 226, 6 червня 2007, стор. 1309-1316). Проте дієта, яка не містить глютену, також має очевидні недоліки. Продукти, що не містять глютену, в порівнянні з продуктами на основі зернових виявляються дуже дорогими, демонструють знижені органолептичні якості і властивості при зберіганні, дієта є важкою для строгого її дотримання і повинна постійно контролюватися дієтологами, що також беруть до уваги дисбаланс поживних речовин (наприклад, волокон, мінеральних речовин і вітамінів), що є наслідком повної відсутності злаків в їжі (Grehn та ін., 2001. Dietary habits of Swedish adult coeliac patients treated by a gluten-free diet for 10 years (Особливості харчування дорослих, які страждають на глютеніт хворобу пацієнтів у Швеції, що отримували терапію безглютеніт дієтою впродовж 10 років). Scand J Nutr 45: 178-182; Mariani та ін., 1998. The gluten-free diet: a nutritional risk factor for adolescents with celiac disease (Безглютеніт дієта: харчовий чинник ризику для підлітків з глютеніт хворобою). J Pediatr Gastroenterol Nut 27: 519-523; Thompson та ін., 2005. Gluten-free diet survey: are Americans with celiac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods? (Огляд дієти, що не містить глютену: чи отримують американці з глютеніт хворобою рекомендовані кількості волокон, заліза, кальцію і зернових продуктів?) J. Human. Nutr. Diet. 18:163-169). Більш того, в деяких випадках (наприклад, "стійкого синдрому мальабсорбції") строге дотримання дієти, що не містить глютену, також не дає можливості повного відновлення функціональності кишечника (Sollid і Khosla, 2004. Future therapeutic options for celiac disease (Майбутні можливі методи лікування глютенітної хвороби). Gastroenterol. Hepatol. 2:140-147). В рамках альтернативних варіантів терапевтичного лікування із застосуванням безглютеніт дієти в різних дослідженнях були використані переваги сучасних уявлень про послідовності токсичних епітопів, і розглядалося застосування мікробіологічних ферментів, зокрема, пролілендопептидази (PEPs) для гідролізу цих поліпептидів. Ферменти мікроорганізмів були запропоновані як дієтичні добавки (Shan та ін., 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl-endopeptidases: implications for celiac sprue (Порівняльний біохімічний аналіз трьох бактерійних пролілендопептидаз: значення для целиакії). Biochem. J. 383:311-318) і/або для in vitro детоксикації глютену (Chen та ін., 2003. Identification and characterization of Lactobacillus helveticus PePO2, an endopeptidase with post-proline specificity (Ідентифікація та визначення характеристик Lactobacillus helveticus PePO2, постпролін-специфічної ендопептидази). Appl. Environ. Microbiol. 69:1276-1282; Stepniak та ін., 2005. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl-endoprotease: implications for celiac disease (Високоєфективне розкладання глютену за допомогою недавно ідентифікованої пролілендопептидази: значення для глютенітної хвороби). Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 291:G621-G629).

Публікація WO2008/010252 і Cagno та ін. (Journal of Food Protection, том 71 №7, 2008, стор. 1491-1495), розкривають спосіб приготування хлібопекарних виробів з борошна, що не містить

білків, орієнтований на поліпшення поживних, органолептичних властивостей і характеристик зберігання цих продуктів, які готуються з інгредієнтів, що не містять глютену.

Впродовж декількох останніх десятиліть також значно змінилася біотехнологія хлібобулочних виробів з дріжджового тіста, впливаючи тим самим на особливості харчування цілих груп населення, що раніше сиділи на дієті, що ґрунтується на глютені. В даний час дріжджові хлібобулочні вироби виробляються за допомогою надзвичайно швидких технологічних способів (наприклад, з використанням хімічних розпушувачів або хлібопекарських дріжджів), повністю замінюючи тривалі процеси ферментації за допомогою диких молочнокислих бактерій і дріжджів, що утворюються з сировинних матеріалів і застосовуються як "закваска". При сучасних способах зернові компоненти (наприклад, білки) в ході технологічної обробки харчових продуктів не піддаються дії якої-небудь гідролітичної активності, зберігаючи характеристики початкової сировини (Gobbetti, 1998. Trends Food Sci. Technol. 9:267-274). Пізні дослідження, засновані на цих ознаках і використовуючі переваги ферментативних здібностей суміші вибраних молочних бактерій, продемонстрували, що за допомогою звичайної біотехнології, заснованої на використанні вибраних молочнокислих бактерій і тривалих періодах часу ферментації, виявляється можливим помітне зниження початкової концентрації глютену в зернових продуктах (Di Cagno та ін., 2002. Proteolysis by sourdough lactic bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance (Протеоліз заквашувальними молочними бактеріями: дія на білкові фракції пшеничного борошна і пептиди гліадину, залучені в непереносимість зернових продуктів людським організмом). Appl. Environ. Microbiol. 68:623-633; Di Cagno та ін., 2004. Sourdough bread made from wheat and non toxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients (Переносимий страждаючими целіакією пацієнтами хліб з тіста на заквасці, виготовлений з пшеничного нетоксичного борошна і заквашений з виділеними молочними бактеріями). Appl. Environ. Microbiol. 70:1088-1096; Di Cagno та ін., 2005. Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance (Макаронні вироби, виготовлені з пшеничної крупчатки, ферментовані селекційними молочними бактеріями, як засіб для потенційного ослаблення непереносимості глютену). J. Agr. Food Chem. 53:4393-4402; De Angelis та ін., 2005. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue (Препарат пробіотика VSL#3, що володіє здатністю гідролізувати поліпептиди гліадину, відповідальні за целіакію). Biochim. Biophys. Acta. 1762:80-93).

Кодекс Аліментаріус, прийнятий WHO (Усесвітня організація охорони здоров'я) і FAO (Продовольча і сільськогосподарська організація), розрізняє "продукти, що не містять глютену", які містять інгредієнти з концентрацією глютену нижче 20 ч./млн. та "продукти, зроблені без глютену", мають залишкову концентрацію глютену меншу 200 ч./млн. Проте різні дослідження, що призвели до створення керівних принципів, виданих "Робочою групою по проламінам", пропонують, щоб у будь-якому випадку поріг вмісту глютену підтримувався на рівні нижче 20 ч./млн. (Stern та ін., 2001. Analysis and clinical effects of gluten in celiac disease (Аналіз та клінічні ефекти глютену при глютенівій хворобі). Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13:741-747). Недавнє дослідження Rizzello та ін. (Rizzello та ін., 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease (Високоєфективне розкладання глютену молочними бактеріями та грибовими протеазами в ході технологічної обробки харчових продуктів: нові перспективи відносно глютенівій хвороби). Appl. Environ. Microbiol. 73:4499-4507) розглядало застосування складнішої суміші, що складається з 10 видів виділених молочнокислих бактерій, грибових протеаз, і тривалого часу ферментації (48 годин при 37 °C) в умовах замісу в напіврідкому стані. Згідно даним електрофоретичного, хроматографічного та імунологічного аналізу, глютен, що містився в пшеничному борошні, розклався до порогової концентрації нижче 20 ч./млн.

Відома, крім того, патентна заявка WO2006/097415, в якій, аналогічно вищезазначеному дослідженню, описаний спосіб розкладання глютену за допомогою застосування складної суміші, що складається з щонайменше шести видів молочнокислих бактерій і/або біфідобактерій, при тривалому часі ферментації (24-31 години). Проте описаний в цьому документі спосіб не є придатним для забезпечення повного розкладання глютену, наслідком чого є неможливість його застосування пацієнтами з глютенівією хворобою. Фіг. 1В в патентній заявці WO2006/097415 фактично показує, що після гідролізу за допомогою мікроорганізмів все ж таки зберігаються прозорі плями гліадинів, що не розпалися, і це підтверджується таблицею 2 в тому ж документі, з чого стає очевидно, що, тоді як деякі гліадини частково гідролізуються, інші виявляються нечутливими до процесу гідролізу.

Виходячи з літературних і раніше описаних даних, можна зробити висновок, що основним предметом турботи при виробництві харчових продуктів, що не містять глютену, з детоксифікованого зернового борошна є деякі наступні проблеми: (i) спрощення композиції виділених молочних бактерій, призначених для застосування в процесі розкладання; (ii) значне скорочення часу ферментації, що повинне зробити даний спосіб придатним для застосування в промислових процесах; (iii) демонстрація здатності молочнокислих бактерій і ферментів цвілевих грибів ефективно впливати на борошно з м'якої і твердої пшениці, що належить до різних сортів, а також з ячменю, жита і вівса; (iv) забезпечення біотехнологічного процесу гідролізу глютену, що робить можливим застосування для отримання продуктів детоксифікованого зернового борошна, що не містять глютену; і (v) демонстрація за допомогою тривалих медичних випробувань *in vivo* абсолютної переносимості пацієнтами з глютенною хворобою тривалого прийому продуктів, що не містять глютену, заснованих на детоксифікованому пшеничному борошні.

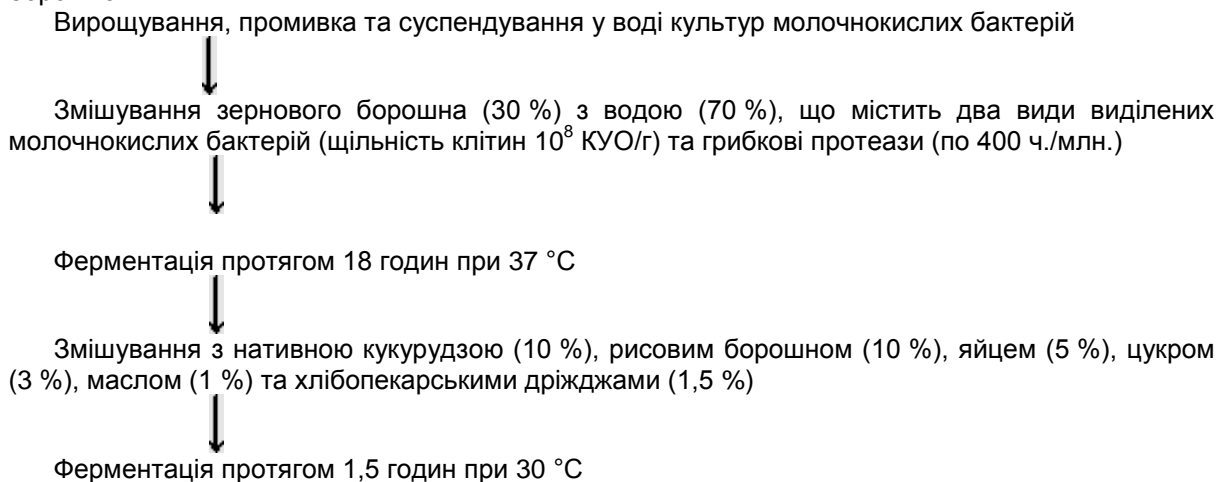
Тому, в світлі вищесказаного, очевидно є необхідність забезпечення матеріалів і способів для приготування хлібобулочних виробів, що не містять глютену, виготовляються з детоксифікованого зернового борошна, які, з одного боку, не демонстрували б недоліків, виявлених з огляду літературних даних відносно економічного, соціального, поживного і органолептичного аспектів, і, з іншого боку, недоліків, властивих продуктам, що не містять глютену, наявним в продажу в даний час.

Автори даного винаходу зараз виявили, що за допомогою всього лише двох виділених молочнокислих бактерій в комбінації з грибковими протеазами час ферментації, необхідний для розкладання глютену, може бути помітно зменшений. Більш того, була доведена здібність молочнокислих бактерій і грибкових протеаз до повного розкладання глютену в борошні з різних сортів м'якої і твердої пшениці, ячменю, жита і вівса; був представлений біотехнологічний протокол для виробництва різних дріжджових хлібобулочних виробів з детоксифікованого пшеничного борошна; продемонстрована абсолютна переносимість продукту пацієнтами з глютенною хворобою, таким чином, абсолютно новаторським способом роблячи можливим застосування пшеничного борошна як інгредієнт для виробництва дріжджових хлібобулочних виробів, що не містять глютену.

Молочнокислі бактерії відповідно до даного винаходу належать до роду *Lactobacillus* і були виділені з "заквасок", використовуваних для виробництва сортів хліба, типових для Південної Італії. *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12 (депонований як DSMZ N. DSM22063 28 листопада 2008) і *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (депонований як DSMZ N. DSM22064 28 листопада 2008).

Був стандартизований і оптимізований біотехнологічний протокол, що включає застосування виділених молочнокислих бактерій і грибкових протеаз в надзвичайно швидкому процесі ферментації (12-20 годин при 30-37 °C) зернового борошна, ресуспендованого у воді до досягнення концентрації в 20-50 мас. %, і подальше застосування їх в різних, згідно необхідним показникам, процентних долях як інгредієнт для швидкого (близько 1-3 години) розпушування за допомогою хлібопекарських дріжджів у виробництві дріжджових хлібобулочних виробів, що не містять глютену (залишковий вміст глютену менше 20 ч./млн.)

Нижче представлена схема біотехнологічного протоколу для отримання дріжджових хлібобулочних виробів з детоксифікованого, такого, що не містить глютену, пшеничного борошна.





Випікання протягом 50 хв. при 250 °C

Пацієнтам з глютенною хворобою щодня протягом 60 днів давали хлібобулочні вироби згідно однієї з можливих рецептур, що містять 10 г еквівалента початкового глютену.

Імунохімічні та гістологічні проби показали абсолютну переносимість препарату, отриманого з детоксифікованого борошна, що не містить глютену.

Згідно додатковим аналізам, що використовують електрофоретичні, хроматографічні та імунологічні методи, спосіб ферментації відповідно до даного винаходу за допомогою виділених молочнокислих бактерій, що не застосовувалися в попередніх дослідженнях, а також грибкових протеаз робить можливим: (i) повну детоксикацію глютену (вміст залишкового глютену нижчий 20 ч./млн.); (ii) виробництво гідролізованого борошна, що складається з суміші низькомолекулярних пептидів і, особливо, амінокислот (приблизно 15000 міліграм/кг в порівнянні з <1000 міліграм/кг в пшеничному борошні), що покращує поживні характеристики в порівнянні зі звичайними продуктами, що не містять глютену; (iii) помітне скорочення часу процесу в порівнянні з опублікованими літературними даними, що робить вказаний спосіб придатним для перетворення до рівня промислового масштабу; (iv) виробництво хлібобулочних виробів, що не містять глютену, з різними рецептурами інгредієнтів, що включають застосування детоксифікованого пшеничного борошна в різних концентраціях (20-50 %); і (v) абсолютну переносимість після тривалого прийому даних продуктів пацієнтами з глютенною хворобою, згідно з первинними медичними даними.

Продукти, що отримуються відповідно до способу даного винаходу, демонструють переважні органолептичні, реологічні та хімічні властивості, не пропоновані продуктами існуючого рівня техніки (продукти, що не містять глютену, отримані з борошна, що не містить білків природним чином). Продукти згідно цьому винаходу фактично зберігають харчові якості борошна, що містить глютен, і тим самим пропонують кращі поживні характеристики в порівнянні з продуктами, отриманими з борошна, що не містить білків.

Більш того, в результаті процесу розкладання глютену, здійснюваного молочнокислими бактеріями, що є предметом винаходу, продукти згідно винаходу є такими, що повністю не містять глютену, на противагу продуктам, що отримуються за допомогою відомих молочнокислих бактерій (WO2006/097415, WO 2008/010252). Молочнокислі бактерії згідно патентній заявці WO 2008/010252 застосовувалися в тих же умовах, що і молочнокислі бактерії відповідно до даного винаходу, і виявилися не відповідними для розкладання глютену, фактично залишковий вміст глютену склав приблизно 6000-10000 ч./млн. (Фіг. 5). Тому вказані бактерії можуть використовуватися тільки для видалення слідів глютену, проте ефективності бактерій відповідно до даного винаходу вони не демонструють.

Що стосується статті Rizzello та ін. (Appl. Environ. Microbiol. 73:4499-4507, 2007), то можливість досягнення повного розкладання глютену протягом помітно коротшого часу (18 годин в порівнянні з 48 годинами) спричиняє, по-перше, значну технологічну перевагу, що робить процес перетворення співставним з найбільш частими та звичайними промисловими способами виробництва хлібобулочних продуктів. До того ж дуже тривалий (48 годин) процес ферментації, окрім збільшення технологічних витрат, може призводити до появи санітарно-гігієнічних ризиків. Крім того, швидший спосіб розкладання глютену неминуче призводить до отримання початкового матеріалу (борошно з повністю гідролізованим глютенном), який відрізняється іншим профілем вільних амінокислот і тому придатного для забезпечення інших органолептичних показників продуктів, що не містять глютену, в порівнянні з тривалішим процесом, що відрізняється неминуче іншою ферментативною кінетикою.

Тому конкретним об'єктом даного винаходу є суміш, що містить або складається з молочнокислих бактерій *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 і *Lactobacillus plantarum* DSM 22064. Дана суміш може додатково містити грибкові протеолітичні ферменти, такі як, наприклад, протеази *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* або їх суміші.

Наступним об'єктом цього винаходу є застосування вказаної вище суміші для повного розкладання глютену в борошні як з м'якої, так і твердої пшениці, з ячменю, жита та вівса.

Даний винахід, крім того, відноситься до способу приготування рідкого тіста з борошна з повністю розкладеним глютенном, придатного для виробництва дріжджових продуктів, що не містять глютену, який містить або складається з наступних етапів:

а) розмноження культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 та *Lactobacillus plantarum* DSM 22064;

б) змішування борошна в концентрації 20-50 %, переважно 30 %, та води в концентрації 50-80 %, переважно 70 %, що містить суміш двох бактерій етапу а) з щільністю клітин приблизно 10^8 КУО/г;

с) додавання однієї або декількох грибкових протеаз, кожної в концентрації 200-500 ч./млн., переважно 400 ч./млн.;

d) ферментація протягом 8-20 годин, переважно 12 годин при 30-37 °С.

Спосіб може, крім того, містити етап е) висушування рідкого тіста, отриманого на етапі d). До борошна, придатного для застосування при даному способі, відноситься борошно як з м'якої, так і твердої пшениці, з ячменю, жита, вівса або їх суміші, переважними є м'яка і тверда пшениця.

Грибкові протеолітичні ферменти можуть бути вибрані з групи, яка складається з протеаз *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* або їх сумішей.

Тому винахід також відноситься до рідкого або сухого борошняного тіста, в якому глютен є повністю розкладеним відповідно до зазначеного вище способу.

Наступним об'єктом винаходу є суміш, що містить або складається з зазначеного вище тіста в комбінації з одним або декількома видами борошна, що не містить білків природним чином, як, наприклад, вибрані з групи, що складається з борошна, отриманого з нативної кукурудзи, білої кукурудзи, рису, лободи-квіноа, тефу або амаранту та гречки. Вищезазначені види борошна можуть використовуватися, зокрема, в наступних відсотках: борошно з нативної кукурудзи 5-15 %, переважно 10 %, білої кукурудзи 5-15 %, переважно 10 %, рису, лободи-квіноа, тефу або амаранту 10-30 %, переважно 20 %, та гречки 1-10 %, переважно 5 %, при цьому вказані відсотки виражають масові відсотки по відношенню до загальної маси композиції борошна. Інші інгредієнти, які можуть бути додані до рецептури хлібобулочних виробів, що не містять глютену, заснованих на детоксифікованому пшеничному борошні, представлені, наприклад, цукром, маслом, яйцями і тваринними вершками в рідкій формі.

Додатковим об'єктом винаходу є спосіб приготування дріжджових хлібобулочних виробів із застосуванням глютен-детоксифікованого борошна відповідно до зазначеного вище способу, який містить або складається з наступних етапів:

а) додавання суміші борошна (10-40 %, переважно 30 %), що природним чином не містить білків, хлібопекарських дріжджів (1-2 %), солі (0,1-1,0 %) та структуруючих агентів (0,5-1 %), до глютен-детоксифікованого рідкого борошняного тіста за допомогою описаного вище способу та заміс;

б) проходження ферментації протягом приблизного 1-3 годин, переважно 1,5 години при 30 °С;

с) випікання протягом 50 хвилин при 220 °С. Коли глютен-детоксифіковане борошняне тісто сушиться, процентне відношення інгредієнта до води складає приблизно 1,2: 0,8.

Борошно, що природним чином не містить білків, може бути вибрано з групи, яка складається з борошна, приготованого з природної кукурудзи, білої кукурудзи, рису, лободи-квіноа, тефу, амаранту, гречки або їх суміші. З іншого боку, глютен-детоксифіковане борошно може бути вибрано з групи, яка складається з борошна, приготованого як з м'якої, так і твердої пшениці, ячменю, жита, вівса або їх суміші, переважним є борошно з м'якої або твердої пшениці.

Тому об'єктом даного винаходу також є хлібобулочні вироби з дріжджового тіста, що отримуються за допомогою вказаного вище способу.

Наступним об'єктом даного винаходу є спосіб отримання хлібобулочних виробів з дріжджового тіста, що містить або складається з наступних етапів:

а) пряме додавання нативної кукурудзи, рисового борошна, яєць, цукру, масла та хлібопекарських дріжджів до глютен-детоксифікованого борошняного тіста відповідно до зазначеного вище способу та заміс;

б) проходження ферментації протягом 1,5 година при 30 °С та

с) випікання дріжджового тіста протягом 50 хвилин при 250 °С.

Зокрема, на етапі а) процентний вміст інгредієнтів є наступним: нативна кукурудза 10 %, рисове борошно 10 %, яйця 5 %, цукор 3 %, масло 1 % та хлібопекарські дріжджі 1,5 %.

Тому об'єкт даного винаходу також складають дріжджові хлібобулочні вироби, що отримуються за допомогою зазначеного вище способу.

Наступним об'єктом даного винаходу також є застосування продуктів відповідно до даного винаходу, тобто борошняного тіста, суміші тіста з борошном, що не містить білків, дріжджових хлібобулочних виробів, придатних для покриття дисбалансу поживних речовин, що виникає в результаті дотримання безглютенової дієти.

Нарешті, об'єкт цього винаходу представляють молочнокислі бактерії *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 і *Lactobacillus plantarum* DSM 22064.

Далі даний винахід описується ілюстративним, але не обмежувальним чином, згідно його переважним втіленням з конкретною прив'язкою до креслень, що додаються.

Фіг. 1 показує амінопептидазну N-типу (PEPN), дипептидазну (PEPV) і трипептидазну (PEPT) (a), і пролінимінопептидазну (PEPI), пролідазну (PEPQ), проліназну (PEPR), дипептидилпептидазну (PEPX) (b) активність *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) та *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064) на LEU-P-NA, Leu-Leu, Leu-Leu-Leu і PRO-P-NA, Val-For-Gly і Gly-For-Wing синтетичних субстратах, відповідно. Як контроль застосовувалися молочнокислі бактерії, що використовувалися в дослідженні Rizzello та ін. (Rizzello та ін., 2007. Appl. Environ. Microbiol. 73:4499-4507): *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, *Lactobacillus hilgardii* 51B і *L. sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 і LS47. Ферментативна активність виражалася в одиницях активності (U), тобто в кількостях ферменту, необхідних для вивільнення 1 мкмоль/хв п-нітроаніліду або 1 мкмоль/хв. амінокислоти при визначенні активності на субстратах, відмінних від п-нітроаніліду.

Фіг. 2 показує двомірні електрофоретичні профілі різних сортів твердої пшениці (Svevo і Duilio) до та після обробки селекційними молочнокислими бактеріями і грибовими протеазами.

Фіг. 3 показує білковий склад пшеничного борошна до та після процесу гідролізу селекційними молочнокислими бактеріями та грибовими протеазами.

Фіг. 4 показує амінопептидазну (A), пролінимінопептидазну (B) і пролідипептидамінопептидазну (C) активність молочнокислих бактерій, вживаних згідно WO2008/010252 (*Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 і LS41) та відповідно до даного винаходу [*L. sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) і *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064)]. Скорочення 15M, 14G, 7A, 51B, LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 і LS47 означають біотики так, як це використовується в публікації Rizzello та ін., 2007.

Фіг. 5 показує залишкову концентрацію глютену (ч./млн.) в тісті, ферментованому *Lactobacillus sanfranciscensis* LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 і LS41 (WO2008/010252), *L. sanfranciscensis* DPPMA12 (DSM22063) і *Lactobacillus plantarum* DPPMA125 (DSM22064) протягом 12 годин при 37 °C.

Фіг. 6 показує загальну концентрацію вільних амінокислот (міліграм/кг) у ферментованому тісті при використанні різних комбінацій молочних бактерій згідно WO2008/010252 (тісто 1, 2, 3, 4 і 5) та пшеничному тісті, ферментованому двома молочнокислими бактеріями (DPPMA12 і DPPMA125) даного винаходу.

Фіг. 7 приводить обробку методом головних компонент (PCA) даних, отриманих при органолептичному аналізі хлібів (1, 2, 4 і 5) згідно WO2008/010252 та хліба (DPPMA12 і DPPMA125), отриманого із застосуванням детоксифікованого пшеничного борошна згідно винаходу.

Приклад 1. Пептидазна активність виділених молочних бактерій.

L. sanfranciscensis DPPMA12 і *L. plantarum* DPPMA125 з колекції культур Dipartimento di Protezione delle Piante і Microbiologia Applicata dell'Università degli Studi di Bari, заздалегідь виділені з "заквасок", були розмножені при 30 °C протягом 24 годин в модифікованому середовищі MRS (mMRS), що містить на додаток до звичайних інгредієнтів 5 % мальтози та 10 % дріжджової води, яка має підсумковий pH 5,6. Як контроль при оцінці пептидазної активності молочнокислих бактерій застосовувалися *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, *Lactobacillus hilgardii* 51B і *L. sanfranciscensis* LS3, LS10, LS19, LS23, LS38 і LS47, що використовувалися в недавній публікації Rizzello та ін. (Rizzello та ін., 2007. Appl. Environ. Microbiol. 73:4499-4507).

Для ферментних проб використовувалася вирощена протягом 24 годин клітина, які відділялися центрифугуванням (10000 об/хв., 4 °C), двічі промивалися у фосфатному буфері 50 мМ, pH 7,0 та ресуспендувалися в тому ж самому буфері до оптичної щільності 2,5 (A620 нм), відповідній 10⁸ КУО/мл. Були визначені амінопептидазна N-типу (PEPN) та пролінимінопептидазна (PEPI) активність за допомогою LEU-P-NA і PRO-P-NA синтетичних субстратів, відповідно. Реакційна суміш складалася з 0,9 мл К-фосфатного буфера 50 мМ, pH 7,0, що містить розчинений синтетичний субстрат (кінцева концентрація 2 мМ) та 100 мл клітинної суспензії. Ферментативна активність, виражена в одиницях активності (U), відповідає кількості ферменту, необхідній для вивільнення 1 мкмоль/хв п-нітроаніліду (Gobbetti та ін., 1996. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase (Протеолітична система *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: очищення та визначення характеристик протеїнази, дипептидази та амінопептидази). Appl. Environ. Microbiol. 62: 3220-3226). Пролідаза (PEPQ), проліназа (PEPR) та дипептидилпептидаза (PEPX) визначалися як описано Cagno і співробітниками (Di Cagno та ін., 2004. Sour dough bread made from wheat and nontoxic flours and starter with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients (Переносимий страждаючими целиацією пацієнтами хліб з тіста

на заквасці, виготовлений з нетоксичних сортів пшеничного борошна і заквашений з селекційними молочними бактеріями), Appl. Environ. Microbiol. 70: 1088-1096) на, відповідно, Val-Pro, Pro-Gly і Gly-Pro-Ala. Дипептидаза (PEPV) і трипептидаза (PEPT) визначалися згідно Cd-нингідринному способу (Gobbetti та ін., 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic bacteria by quadratic response surface methodology (Дослідження дії температури, pH, NaCl і aw на протеолітичну та ліполітичну активність використовуваних в сироварінні молочних бактерій відповідно до методу квадратичної поверхні відгуку), Enzyme Microbial Technol 25: 795-809) з використанням, відповідно, Leu-Leu і Leu-Leu-Leu. Одна одиниця активності (U) визначається як кількість ферменту, необхідна для вивільнення 1 мкмоль/хв амінокислоти.

Для порівняльних цілей випробування було також повторене і для молочних бактерій, описаних в WO2008/010252 (L. sanfranciscensis LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 і LS41).

Приклад 2. Екстракція білків пшеничного борошна та електрофоретичний аналіз.

Білки екстрагувалися з пшеничного борошна згідно способу, описаному Weiss та ін. (Weiss та ін., 1993. Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma (Електрофоретичне дослідження алергенів пшеничного зерна різних культиварів, залучених в астму пекарів). Electrophoresis. 14:805-816). Був виконаний двовірний електрофоретичний аналіз приблизно 30 мкг екстрагованої білкової фракції згідно іммобулін-поліакриламідному методу (De Angelis та ін., 2005. Biochim. Biophys. Acta. 1762:80-93). Для кожної незалежної ферментації було проаналізовано по чотири гелі та отримані дані, піддані нормалізації згідно методики, запропонованій Bini та ін. (Bini та ін., 1997. Профілі експресії білків при прострумовій карциномі грудей людини та у разі гістологічно нормальної тканини. Electrophoresis. 18:2831-2841).

Приклад 3. Імунологічний та MALDI-TOF мас-спектрометричний аналізи.

Імунологічні аналізи були виконані при використанні антитіл R5 і "сендвіч"-ІФА і конкурентного ІФА-метода (Transia Plate, Diffchamb) (Valdez та ін., 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol (Інноваційний підхід до визначення низьких рівнів глютену в харчових продуктах за допомогою "сендвіч"-методу твердофазного імуноферментного аналізу). Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 15:465-474). Був виконаний MALDI-TOF спектрометричний аналіз на установці Voyager-De Pro-workstation (PerSeptive Biosystems, Великобританія) згідно способу, представленою Hernando та ін. (Hernando та ін., 2003. New strategy for the determination of gliadin in maize or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fractionation of gliadin from maize or rice-prolamins by acid treatment (Нова стратегія визначення гліадину в харчових продуктах на основі кукурудзи або рису фракціонуванням часопротіною мас-спектрометрією з лазерною іонізацією та десорбцією з рідкої матриці гліадину кукурудзи або проламінів рису при обробці кислотою. J. Mass Spectrom. 38:862-871).

Концентрація білка була визначена згідно методу Бредфорда (Bradford, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (Швидкий і чутливий спосіб визначення кількостей мікрограмів білка, заснований на скріпленні білками барвника). Anal. Biochem. 72:248-254). Концентрація органічного азоту була визначена по методу Кьельдаля. Концентрація вільних амінокислот визначалася за допомогою амінокислотного аналізатора (Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, Великобританія) (Di Cagno та ін., 2004. Appl. Environ. Microbiol. 70:1088-1096).

Для порівняльних цілей була також визначена концентрація вільних амінокислот в тісті, отриманому із застосуванням молочних бактерій, описаних в WO2008/010252 (L. sanfranciscensis LS40, LS13, LS44, LS35, LS14, LS11, LS18, LS4, LS15 і LS41), після ферментації протягом 24 годин при 30 °C згідно методикам, викладеним в протоколі, представленою на Фіг. 8 вказаного документа.

Приклад 4. Виробництво дріжджових хлібобулочних виробів із застосуванням детоксифікованого пшеничного борошна.

Культури двох виділених молочнокислих бактерій були розмножені в поживному середовищі, промиті і ресуспендовані у воді, як описано вище. Пшеничне борошно (30 %) було змішане з водою (70 %), що містить суміш двох вказаних молочнокислих бактерій з клітинною щільністю приблизно 10^8 КУО/Г, і були додані ферменти цвілевих грибів в концентрації по 400 ч./млн. Протягом 12 годин при 37 °C проводилася ферментація. Після ферментації безпосередньо до рідкого тіста були додані нативна кукурудза (10 %), рисове борошно (10 %), яйце (5 %), цукор (3 %), масло (1 %) і хлібопекарські дріжджі (1,5 %). Величини концентрації

представлені по відношенню до загальної маси тіста. Після замісу і перед випічкою дріжджового тіста протягом 50 хвилин при 250 °С проводилася ферментація протягом 1,5 година при 30 °С.

Спосіб може додатково включати етап сушки рідкого пшеничного тіста. Також при виготовленні хліба, що не містить глютену, застосовувалися і різні інші інгредієнти.

5 Для цілей порівняння були також виготовлені варіанти хліба №№1, 2, 4 і 5 згідно протоколу патентної заявки WO2008/010252. Був проведений сенсорний аналіз хлібів, отриманих згідно винаходу і за відомою в даній області технологією, розглядалися, зокрема, наступні ознаки: пружність, кислий запах, кислий смак, солодкість, сухість і аромат. Кожна ознака оцінювалася за шкалою від 0 до 100 балів. Результати сенсорного аналізу були піддані обробці методом

10 головних компонент. Крім того, хліби були проаналізовані на питомий об'єм, структуру м'якшк, щільність і вміст волокон згідно стандартним методикам Американської асоціації по хімії зернових культур (AACC).

Приклад 5. Прийом пацієнтами з глютенною хворобою дріжджових хлібобулочних виробів, виготовлених з детоксифікованого пшеничного борошна.

15 Хлібобулочні вироби, засновані на детоксифікованому пшеничному борошні, отриманому як описано раніше, давалися 5 пацієнтам з глютенною хворобою. Діагноз наявності целиакиї встановлювався згідно критеріям, запропонованим Європейським суспільством педіатричної гастроентерології, гепатології і харчування (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition). Середній вік пацієнтів складав приблизно 15 років. Пацієнти з

20 глютенною хворобою знаходилися в стані ремісії протягом, щонайменше двох років і витримували контрольовану безглютенову дієту. Всі пацієнти при відборі продемонстрували негативні показники за даними серологічних аналізів, а також негативні результати гістохімічних проб. Кожен пацієнт протягом періоду в 60 днів щодня споживав хлібобулочні вироби, які містили детоксифіковане пшеничне борошно в кількостях, відповідних 10 г еквівалента

25 нативного глютену. Імунохімічні та гістологічні дослідження були виконані в Dipartimento di Pediatria e Gastroenterologia dell'Università degli Studi di Napoli, Federico II. Набір пацієнтів-учасників дослідження проводився на основі інформованої згоди батьків, яким був представлений план проведення експериментів, заздалегідь схвалений Етичним комітетом Університету Неаполя.

30 Результати.

(1) Пептидазна активність виділених молочнокислих бактерій.

Пептидазна активність визначалася на синтетичних субстратах, щодо специфічної по відношенню до активності пептидази, яка грає важливу роль в розкладанні отримуваних з глютену олігопептидів (Fig. 1). Видно, що *L. sanfranciscensis* DPPMA12 і *L. plantarum* DPPMA125

35 демонструють всі дані типи ферментативної активності. За винятком трипсиназного (PERT) типу активності, дві виділені молочнокислі бактерії і, зокрема, *L. plantarum* DPPMA125 демонструють відносно інших типів пептидазної активності показники значно ($P < 0,05$) вищі, ніж біотики, що застосовувалися в дослідженні Rizzello та ін. (Rizzello та ін., 2007. Appl. Environ. Microbiol. 73:4499-4507). Були виявлені значні відмінності, зокрема, відносно активності PER1, PERQ, PERP і PERX, із знаходженням залишків проліну в різних положеннях. Глутенін і, зокрема, гліадини мають дуже високу і незвичайну процентну частку вмісту (45-60 %) залишків проліну і глутаміну. Внаслідок цього ця остання амінокислота, зокрема, зустрічається в токсичних епітопах, що утворюються з пшеничного борошна, і є відповідальною за пов'язувану з целиакією патологію. При забезпеченні мікроорганізмів, придатних для глибокого розкладання сполуки, в

40 яку включений пролін, ця ферментативна активність є обов'язковою передумовою інтенсивного розкладання глютену і швидко протікаючого процесу гідролізу. Тому для отримання тих, що немає широко поширеними виділених штамів потрібна доступність для ретельної перевірки крупних колекцій культур і проведення великої кількості досліджень ферментативної активності. Пептидазна активність виділених молочних бактерій посилена додатковим застосуванням

50 грибкових протеаз, зазвичай використовуваних в процесах хлібопекарського виробництва. Такі ферменти використовуються в хлібопекарській промисловості для модифікування концентрації білка і, внаслідок цього, "сили" борошна, залежно від тих хлібобулочних виробів, для яких воно призначається.

Фіг. 4 представляє порівняння пептидазної активності для відомих в даній області молочнокислих бактерій і двох молочнокислих бактерій (DPPMA12 і DPPMA125) згідно винаходу, відповідно, при цьому очевидно, що останні демонструють помітно вищу амінопептидазну, пролінімінопептидазну і пролілдипептиділамінопептидазну активність.

(2) Визначення характеристик гідролізованого борошна.

Після ферментації протягом 12 годин при 37 °С білкові фракції були селективно

60 екстраговані і піддані додатковим аналітичним дослідженням. Як стає абсолютно очевидно при

використанні двомірного електрофоретичного аналізу (Fig. 2), після завершення процесу ферментації ніяких слідів гліадинів в борошні, отриманому з сортів твердої пшениці Svevo і Duilio, виявити не вдається. Подібні результати були отримані і в глютеніновій фракції борошна з м'якої, пропонованої у продажу пшениці "00" типу, інших досліджених сортів твердої пшениці (Arcangelo, Ciccio, Colosseo, Gargano і Simeto), ячменю, жита і вівса. Білки пшеничного борошна, екстраговані 60 % етанолом, були піддані аналізу методом MALDI-TOF MS (мас-спектрометрія з лазерною іонізацією і десорбцією з рідкої матриці). Після ферментації протягом 12 годин при 37 °C піки, відповідні гліадину за європейським стандартом, повністю зникли. Спектрометричним аналізом було виявлено тільки декілька піків з молекулярною масою нижче 8 кДа. Імунологічні аналізи, виконані за допомогою антитіл R5, і випробування ІФА підтвердили, що ніяких слідів гліадину у ферментованому зразку виявити не вдається. Визначена тим же способом залишкова концентрація глютену в борошні з представлених у продажу м'якій пшениці типу "00", борошні з різних сортів твердої пшениці і ячменю, жита і вівса у всіх випадках складала менше 20 ч./млн. Метод, що використовувався при цих визначеннях, є офіційним способом AIC (Associazione Italiana Celiachia - Італійська асоціація целиакиї), WHO (Усесвітня організація охорони здоров'я) і FAO (Продовольча і сільськогосподарська організація). Що стосується представлених в літературі даних (Rizzello та ін., 2007. Appl. Environ. Microbiol. 73:4499-4507), то процес гідролізу виконується з такою ж ефективністю (залишковий глютен <20 ч./млн.), але в помітно коротший час (12 проти 48 годин). Цей спосіб є високоефективним унаслідок, з одного боку, застосування вищої концентрації кожного з грибкових протеолітичних ферментів (400 ч./млн.) і, з іншого боку, головним чином завдяки вищій пептидазній активності біотипів виділених молочних бактерій. До того ж, порівняно з вказаним літературним посиланням, в якому розглядається тільки борошно з м'якої пшениці з низькою початковою концентрацією глютену, даний винахід демонструє ефективність даного підходу також і на борошні з різних сортів твердої пшениці, а також борошні з ячменю, жита і вівса, що також мають збільшені початкові концентрації білка.

На Fig. 3 представлені зведення про вміст органічного азоту в пропонованому у продажу борошні з м'якої пшениці типу "00" до і після проведення процесу ферментації. Гідролізоване борошно майже повністю складається з суміші низькомолекулярних пептидів і амінокислот. Лише менше 20 % від початкової кількості глютенінів все ще присутній в гідролізованому борошні. Концентрація амінокислот в гідролізованому борошні складає близько 15000 міліграма/кг в порівнянні з <1000 міліграмами/кг, що спостерігаються в пшеничному борошні. Вища біологічна доступність вільних амінокислот робить це гідролізоване пшеничне борошно сировиною з високою харчовою цінністю, зберігаючи в той же самий час і інші харчові показники зернових культур, що відносяться до мінеральних солей, вітамінів і волокон. Коли гідролізоване пшеничне борошно застосовується як інгредієнт для отримання харчових продуктів, що не містять глютену, воно покриває харчовий дисбаланс, що виникає унаслідок застосування безглютенової дієти (Grehn та ін., 2001. Scand J Nutr 45: 178-182; Mariani та ін., 1998. J Pediatr Gastroenterol Nut 27: 519-523; Thompson та ін., 2005. J. Human. Nutr. Diet. 18:163-169).

Порівняльне випробування з відомими в даній області молочнокислими бактеріями показує, що концентрація амінокислот в тісті в цьому випадку виявляється помітно нижчою і такою, що становить навіть після гідролізу в найжорсткіших умовах до близько 2000 міліграм/кг (Fig. 6). Це підтверджує наявність різних ступенів гідролізу пшеничних білків. Більш того, оскільки амінокислоти, що вивільняються, є попередниками летких сполук, які утворюються під час процесу випікання і є відповідальними за смак хлібобулочних виробів, помітно вища концентрація вільних амінокислот (як у разі даного винаходу), служить ознакою інтенсивнішого синтезу летких сполук і, внаслідок цього, кращого смаку продуктів згідно винаходу.

(3) Виготовлення дріжджових хлібобулочних виробів із застосуванням детоксифікованого пшеничного борошна.

Вище представлений приклад застосування біотехнологічного протоколу для виробництва дріжджових хлібобулочних виробів, заснованих на детоксифікованому пшеничному борошні. На додаток до виробництва хлібобулочних виробів, даний протокол був також стандартизований і оптимізований для виготовлення з використанням описаних вище інгредієнтів глютену хліба, що не містить. На додаток до можливого прямого застосування детоксифікованого пшеничного борошна, також можлива його обробка распилюючою сушкою і подальше використання у вигляді сухого матеріалу. Ця додаткова технологічна можливість дозволяє легко зберігати сировину протягом тривалого часу без якої-небудь зміни харчових характеристик пшеничного борошна.

Fig. 7 показує перевагу сенсорних якостей хліба відповідно до даного винаходу (DPPMA12+DPPMA125) над сортами хліба відомого рівня техніки. Більш того, таблиця 1

показує, що хліб відповідно до даного винаходу відрізняється вищим питомим об'ємом, більшою пористістю м'якиша, нижчою щільністю і вищим вмістом волокон в порівнянні з сортами хліба відомого рівня техніки. Ці відмінності є наслідком присутності пшеничного борошна, яке, хоча і є детоксифікованим, але здатне сприяти поліпшенню реологічних і хімічних показників.

5

Таблиця 1

Реологічні і хімічні параметри	Хліб Заквашувальна культура 1*	Хліб (DPPMA12+DPPMA125)
Питомий об'єм (см3/г)	1,35±0,04	1,48±0,07
Пористість м'якиша (%)	39,2±0,34	42,3±0,47
Щільність (Н)	16,62±0,27	14,75±0,21
Вміст волокон (%)	1,5±0,44	2,0±0,52

*Lactobacillus sanfranciscensis DSM18426, DSM18427, Lactobacillus plantarum DSM18430.

(4) Прийом пацієнтами з глютенною хворобою хлібобулочних виробів, виготовлених з детоксифікованого пшеничного борошна.

10

Хлібобулочні вироби, приготовані згідно описаному вище біотехнологічному протоколу, щодня давалися пацієнтам з глютенною хворобою у відповідному дозуванні, еквівалентному 10 г нативного глютену. У Таблиці 2 представлені відомості про імунохімічні і гістологічні індекси у пацієнтів з глютенною хворобою, що знаходяться в ремісії, вживали продукти, засновані на детоксифікованому пшеничному борошні (по 10 г в глютенном еквіваленті в день впродовж 60 днів).

15

Таблиця 2

	Антитіла tTG		Імунохімія						Стадія по Маршу	
			CD3		CD25		γ			
	T0	T60	T0	T60	T0	T60	T0	T60	T0	T60
F.I.	1,6	1	39	38	6	5	5,6	8,6	0	0
I.C.	1,9	1,1	3,7	11	11	9	0,9	3,8	0	0
R.R.	0,3	0,3	53	56	3	4	11,5	17,8	1	1
I.I.	0,5	0,3	31	36	21	21	8,4	12,8	0	0

Можна бачити, що всі пацієнти у момент набору випробовуваних (T0) демонстрували нормальні серологічні і гістологічні показники (стадія по Маршу). За період 60 днів (T60) жоден з біохімічних або імуногістохімічних показників після кожного добового прийому 10 г еквівалента глютену не відрізнявся в порівнянні зі своєю початковою величиною. Зокрема, видно, що стадія по Маршу, яка представляє ступінь цілісності і функціональності слизової оболонки кишечника, визначуваної оптичними методами на біологічному зразку, є абсолютно ідентичною її початковій величині. Ні у одного з пацієнтів не розвивалося атрофії кишкових ворсинок під час виконання провокаційних проб. Тільки один з кожних п'яти залучених в дослідження пацієнтів перервав випробування з особистих причин, не пов'язаних з розвитком яких-небудь потенційно можливих патологічних станів. На підставі отриманих результатів, що базуються на найретельніших in vivo клінічних аналізах, можна констатувати, що детоксифіковане пшеничне борошно виявилось переносимим всіма пацієнтами. На закінчення, детоксифіковане пшеничне борошно може застосовуватися для приготування харчових продуктів, що не містять глютену.

20

25

30

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Суміш, яка містить молочнокислі бактерії *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 та *Lactobacillus plantarum* DSM22064.
2. Суміш за п. 1, яка відрізняється тим, що додатково містить грибові протеази.
3. Суміш за п. 2, яка відрізняється тим, що грибові протеази вибрані з групи, що складається з протеаз *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* або їх сумішей.
4. Застосування суміші за будь-яким з попередніх пунктів для повного розкладання глютену в борошні і/або ферментації вказаного борошна.

35

40

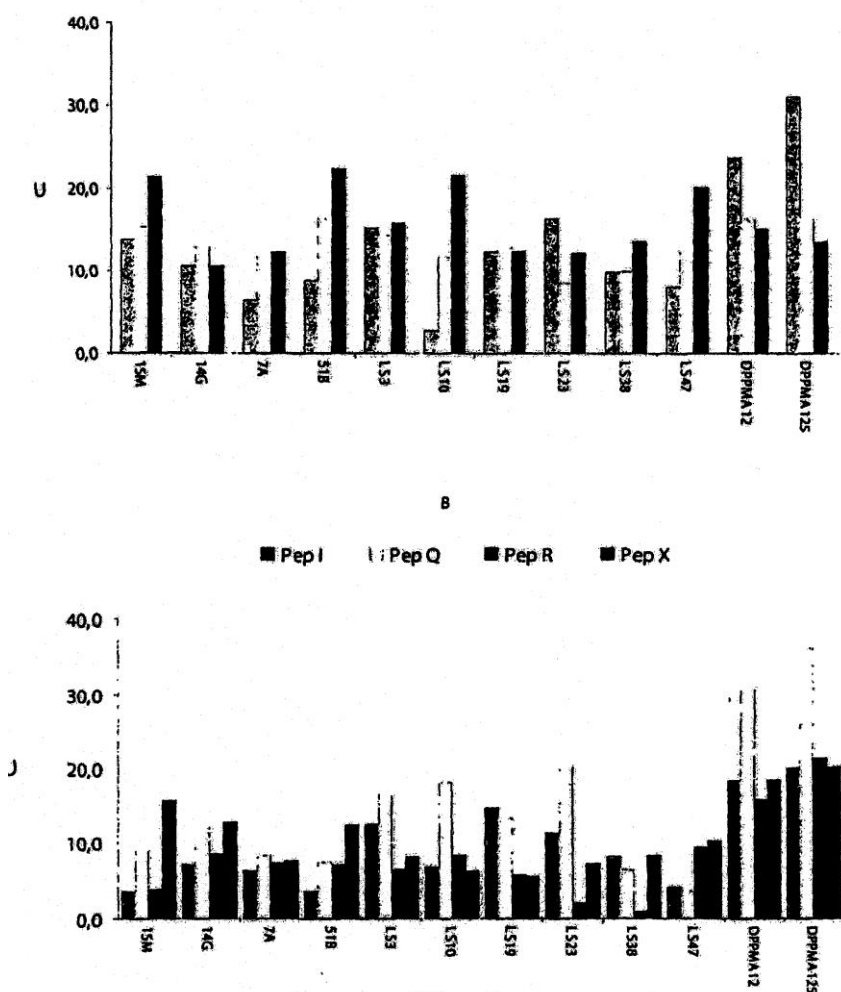
5. Застосування за п. 4, яке **відрізняється** тим, що борошно вибране з групи, яка складається з борошна, отриманого як з м'якої, так і твердої пшениці, з ячменю, жита або вівса.
6. Спосіб приготування рідкого тіста з борошна з повністю розкладеним глютенем, придатного для виготовлення дріжджових продуктів, що не містять глютену, який включає наступні етапи:
- 5 а) розмноження культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 і *Lactobacillus plantarum* DSM22064;
- б) змішування борошна в концентрації 20-50 %, переважно 30 %, і води в концентрації 50-80 %, переважно 70 %, що містить суміш двох штамів бактерій етапу а) з щільністю клітин близько 10^8 КУО/г;
- 10 в) додавання однієї або декількох грибкових протеаз, кожної в концентрації 200-500 ч/млн., переважно 400 ч/млн.;
- г) ферментація протягом 8-20 годин, переважно 12 годин при 30-37 °С.
7. Спосіб за п. 6, який **відрізняється** тим, що додатково включає етап е) сушіння рідкого тіста, отриманого на етапі д).
- 15 8. Спосіб за будь-яким з пп. 6-7, який **відрізняється** тим, що борошно вибирають з групи, яка складається з борошна, отриманого як з м'якої, так і твердої пшениці, з ячменю, жита, вівса або їх суміші, переважно з м'якої і твердої пшениці.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 6-8, який **відрізняється** тим, що грибкові протеолітичні ферменти вибирають з групи, яка складається з *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* або їх сумішей.
- 20 10. Рідке або сухе борошняне тісто, в якому глютен є повністю розкладеним за допомогою способу за будь-яким з пп. 6-9.
11. Суміш, яка містить тісто за п. 10 в комбінації з одним або декількома сортами борошна, що природним чином не містить глютену.
12. Суміш за п. 11, яка **відрізняється** тим, що борошно, яке природним чином не містить глютену, вибране з групи, що складається з борошна, отриманого з природної кукурудзи, білої кукурудзи, рису, лободи-квіноа, тефу або амаранту і гречки.
- 25 13. Суміш за будь-яким з пп. 11-12, яка **відрізняється** тим, що містить різні види борошна в наступних відсотках: нативна кукурудза 5-15 %, переважно 10 %, біла кукурудза 5-15 %, переважно 10 %, борошно з рису, лободи-квіноа, тефу або амаранту 10-30 %, переважно 20 %, і борошно з гречки 1-10 %, переважно 5 %, при цьому вказані відсотки виражені в масових відсотках відносно до загальної маси композиції борошна.
- 30 14. Спосіб приготування дріжджових хлібобулочних виробів за допомогою глютен-детоксифікованого борошна із застосуванням способу за будь-яким з пп. 6-9, який включає наступні етапи:
- 35 а) додавання суміші борошна в кількості 10-40 %, переважно 30 %, що природним чином не містить глютену, хлібопекарських дріжджів в кількості 1-2 %, солі в кількості 0,1-1,0 % і агентів, що структурують, в кількості 0,5-1 % до глютен-детоксифікованого рідкого борошняного тіста за допомогою способу за будь-яким з пп. 6-9 і заміс;
- б) проходження ферментації протягом приблизно 1-3 годин, переважно 1,5 години при 30 °С;
- 40 в) випікання протягом 50 хвилин при 220 °С.
15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що коли глютен-детоксифіковане борошняне тісто сушиться, процентне відношення інгредієнта до води складає приблизно 1,2:0,8.
16. Спосіб за будь-яким з пп. 14-15, який **відрізняється** тим, що борошно, яке природним чином не містить глютену, вибирають з групи, що складається з борошна, отриманого з природної кукурудзи, білої кукурудзи, рису, лободи-квіноа, тефу, амаранту, гречки або їх сумішей.
- 45 17. Спосіб за будь-яким з пп. 14-16, який **відрізняється** тим, що глютен-детоксифіковане борошно вибирають з групи, яка складається з борошна, отриманого як з м'якої, так і твердої пшениці, з ячменю, жита, вівса або їх суміші, переважно з м'якої і твердої пшениці.
18. Хлібобулочний виріб, який отримують за допомогою способу за будь-яким з пп. 14-17.
- 50 19. Спосіб приготування дріжджових хлібобулочних виробів, який включає наступні етапи:
- а) пряме додавання нативної кукурудзи, рисового борошна, яєць, цукру, масла та хлібопекарських дріжджів до глютен-детоксифікованого борошняного тіста відповідно до способу за будь-яким з пп. 6-9 та заміс;
- б) проходження ферментації протягом 1,5 години при 30 °С та
- 55 в) випікання дріжджового тіста протягом 50 хвилин при 250 °С.
20. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що на етапі а) процентний вміст інгредієнтів є наступним: нативна кукурудза 10 %, рисове борошно 10 %, яйце 5 %, цукор 3 %, масло 1 % та хлібопекарські дріжджі 1,5 %.
21. Дріжджові хлібобулочні вироби, які отримують за допомогою способу за будь-яким з пп. 19-20.
- 60

22. Застосування борошняного тіста за п. 10, суміші за пп. 11-13, хлібобулочного дріжджового продукту за п. 18, хлібобулочних дріжджових кондитерських виробів за п. 21 для приготування харчових продуктів, відповідних для покриття живильного дисбалансу, що є наслідком безглютенового харчового раціону.

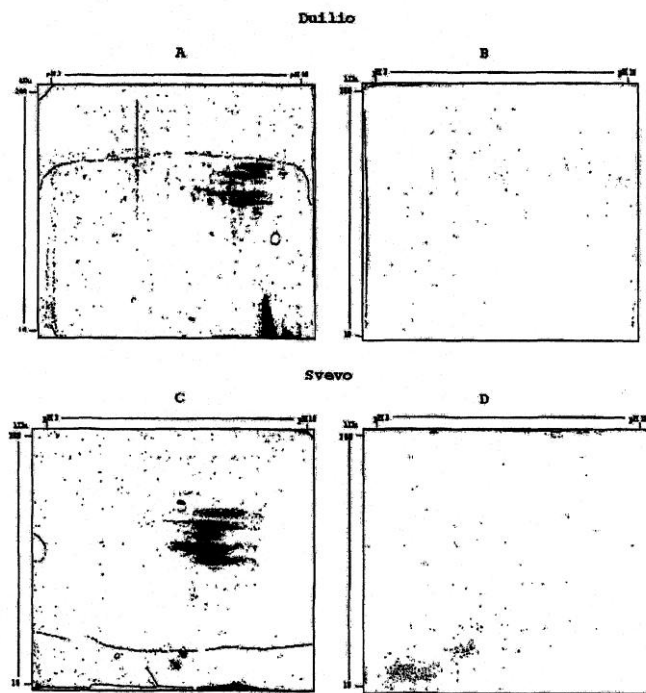
5 23. Застосування штаму молочнокислих бактерій *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM22063 для виготовлення хлібобулочних виробів, що не містять глютену.

24. Застосування штаму молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* DSM22064 для виготовлення хлібобулочних виробів, що не містять глютену.

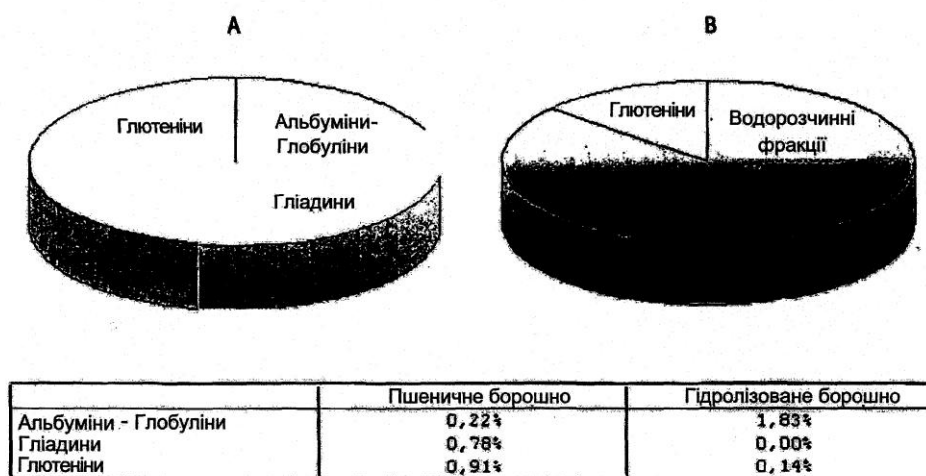
10



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

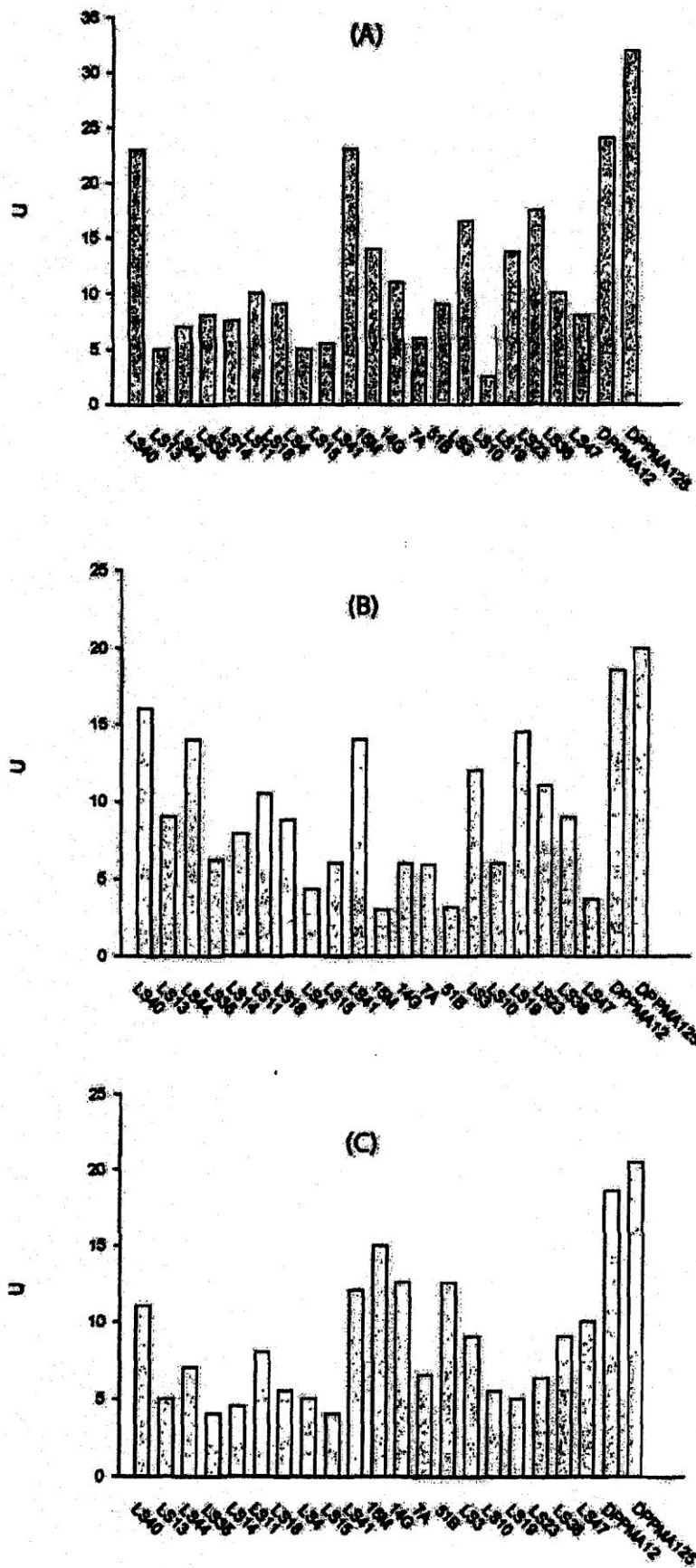
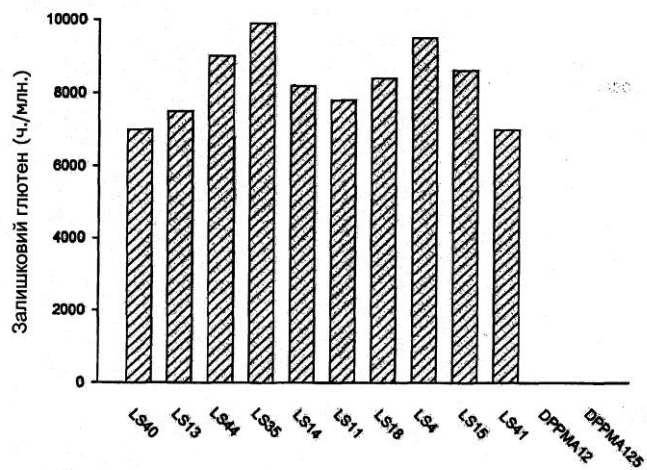
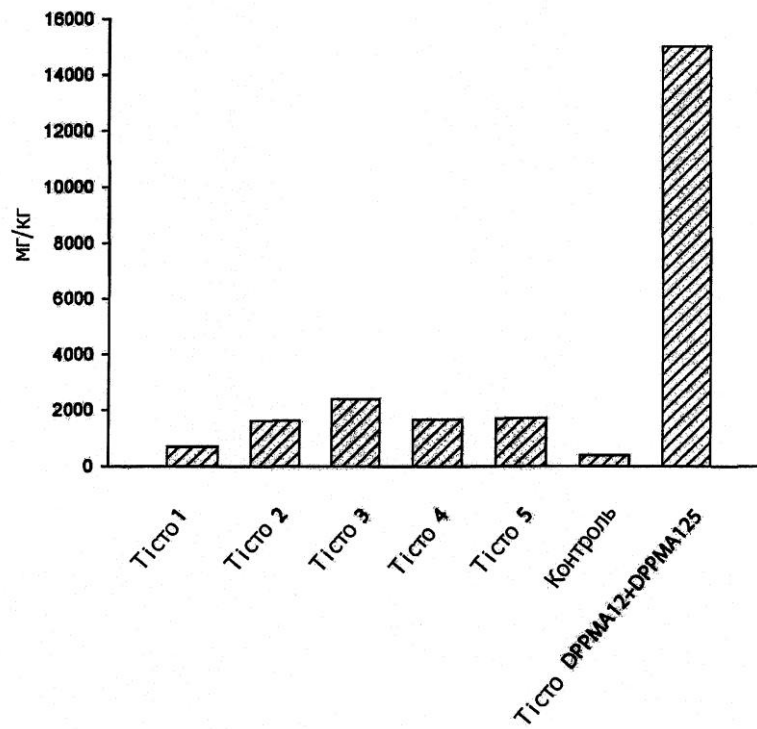


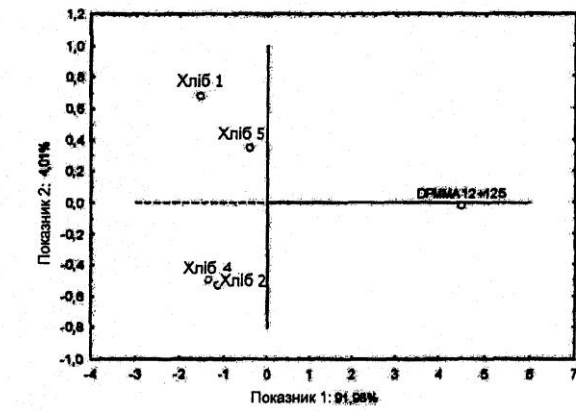
Fig. 4



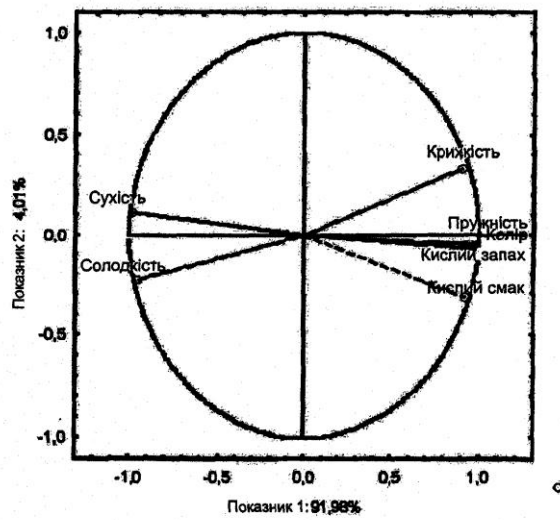
Фіг. 5



Фіг. 6



(В)



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601