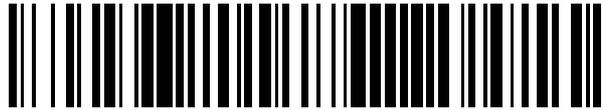


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 107**

51 Int. Cl.:

A21D 8/04 (2006.01)

A21D 2/16 (2006.01)

A21D 2/26 (2006.01)

A23L 1/105 (2006.01)

A23L 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2003 E 03732894 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1608227**

54 Título: **Un método para mejorar las propiedades reológicas de una masa de harina refinada**

30 Prioridad:

24.05.2002 GB 0211975

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

16.12.2015

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:

**OLSEN, TORKIL STEENHOLT y
POVLSEN, INGE, LISE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 554 107 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método para mejorar las propiedades reológicas de una masa de harina refinada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para preparar productos de harina refinada - tales como masas de harina refinada - y productos cocinados u horneados de los mismos.

10 Más en particular, la presente invención se refiere al campo de la producción de alimentos, en particular a la preparación de productos horneados mejorados y otros productos alimenticios farináceos. Específicamente, la invención se refiere al uso de una nueva combinación para mejorar la estabilidad y/o la capacidad de mecanización de la masa y/o mejorando la calidad de los productos horneados y secos fabricados a partir de tales masas.

15 Antecedentes técnicos y técnica anterior

La "fuerza" o la "debilidad" de las masas es un aspecto importante de hacer productos acabados farináceos a partir de masas, incluyendo horneados. La "fuerza" o la "debilidad" de una masa se determina principalmente por su contenido de proteínas y en particular el contenido y la calidad de la proteína gluten es un factor importante en ese respecto. Las harinas refinadas con un contenido proteico bajo se caracterizan normalmente como "débiles". De esta manera, la masa cohesiva, extensible, gomosa que se forma mezclando agua y harina refinada débil normalmente será altamente extensible cuando se someta a estrés, pero no volverá a sus dimensiones originales cuando el estrés se retire.

25 Las harinas refinadas con un alto contenido proteico se caracterizan generalmente como harinas "fuertes" o "duras" y la masa formada mezclando una harina refinada tal y agua será menos extensible que la masa formada a partir de una harina refinada débil y el estrés que se aplica durante la mezcla se restaurará sin rotura en un grado mayor que el caso con una masa formada a partir de una harina refinada débil. La harina refinada fuerte se prefiere generalmente en la mayoría de los contextos de horneado debido a las propiedades reológicas y de manejo superiores de la masa y las calidades de forma y textura superiores de los productos horneados o secos acabados producidos a partir de la masa de harina refinada fuerte.

La calidad de la masa puede ser muy dependiente del tipo o tipos de harina refinada presentes en la masa y/o de la edad de la harina o harinas refinadas.

35 Las masas producidas a partir de harinas refinadas fuertes son generalmente más estables. La estabilidad de una masa es una de las características más importantes de las masas de harina refinada. En las industrias de panadería y molienda se sabe usar "acondicionadores" de la masa para fortalecer la masa para aumentar su estabilidad y su fuerza. Tales acondicionadores son normalmente agentes oxidantes no específicos tales como por ejemplo yodatos, peróxidos, ácido ascórbico, K-bromato o azodicarbonamida y se añaden a la masa con los objetivos de mejorar el rendimiento del horneado de la harina refinada para lograr una masa con estiramiento mejorado y de esta manera teniendo una fuerza y una estabilidad deseables. El mecanismo detrás de este efecto de los agentes oxidantes es que las proteínas de la harina refinada, en particular el gluten contiene grupos tiol que, cuando se oxidan, forman enlaces disulfuro por los cuales la proteína forma una matriz más estable dando como resultado una mejor calidad de la masa y mejoras del volumen y de la estructura de la miga de los productos horneados.

40 Sin embargo, el uso de varios de los agentes oxidantes no específicos actualmente disponibles o se objeta por los consumidores o /bien no está permitido por los cuerpos reguladores. Por lo tanto se ha intentado encontrar alternativas a estas harinas refinadas y aditivos de masa convencionales y la técnica anterior ha sugerido entre otros (i.a.) el uso de oxidoreductasas tales como glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), carbohidrato oxidasa, glicerol oxidasa, piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10) y hexosa oxidasa para este fin.

El documento US 2.783.150 desvela la adición de glucosa oxidasa a la harina refinada para mejorar la fuerza y la textura de la masa y la apariencia del pan horneado.

55 El documento CA 2.012.723 desvela composiciones de mejora de pan que comprenden enzimas celulolíticas tales como xilanasas y glucosa oxidasa, la última enzima añadiéndose para reducir ciertos efectos desventajosos de las enzimas celulolíticas (fuerza y pegajosidad de la masa reducidas) y se desvela que se requiere la adición de glucosa para obtener suficiente actividad glucosa oxidasa.

60 El documento JP-A-92-084848 sugiere el uso de una composición de mejora de pan que comprende glucosa oxidasa y lipasa.

65 Como se desvela en el documento WO 96/39851, el uso de glucosa oxidasa como un aditivo de mejora de la masa tiene la limitación de que esta enzima requiere la presencia de cantidades suficientes de glucosa como un sustrato para ser eficaz en un sistema de masa y generalmente el contenido de glucosa en las harinas refinadas de cereales

es bajo. Por lo tanto la ausencia de glucosa en las masas o el bajo contenido de la misma en las masas será un factor limitante para la eficacia de la glucosa oxidasa como un agente de mejora de la masa.

5 El documento WO 96/39851 desvela un método para mejorar las propiedades reológicas de una masa de harina y la calidad del producto acabado hecho a partir de la masa que comprende añadir a la masa una oxidorreductasa tal como hexosa oxidasa (HOX).

10 La hexosa oxidasa (HOX) (D-hexosa:O₂-oxidorreductasa, EC 1.1.3.5) es una enzima que en presencia de oxígeno es capaz de oxidar D-glucosa y otros varios azúcares reductores incluyendo maltosa, glucosa, lactosa, galactosa, xilosa, arabinosa y celobiosa a sus correspondientes lactonas con posterior hidrólisis a los respectivos ácidos aldobiónicos. En consecuencia, las hexosa oxidasas difieren de la glucosa oxidasa que puede convertir solamente D-glucosa, en que las hexosa oxidasas pueden utilizar un intervalo más amplio de sustratos azúcares.

15 El documento WO 94/04035 desvela un método para mejorar las propiedades de una masa (con y sin grasas) y/o un producto horneado hecho a partir de una masa añadiendo una lipasa de origen microbiano a la masa. El uso de la lipasa microbiana dio como resultado un volumen aumentado y una suavidad mejorada del producto horneado. Adicionalmente se encontró un efecto anti-enranciamiento.

20 El documento EP 1 108 360 A1 desvela un método para preparar una masa de harina refinada. El método comprende añadir a los componentes de la masa una enzima que en condiciones de la masa es capaz de hidrolizar un lípido apolar, un glucolípido y un fosfolípido, o una composición que contiene dicha enzima y mezclar los componentes de la masa para obtener la masa.

25 El documento WO 02/03805 desvela la adición a la masa de una combinación de dos lipasas con diferentes especificidades de sustrato. La combinación produce un efecto sinérgico en la masa o en un producto horneado hecho a partir de la masa. Opcionalmente, puede usarse una enzima adicional junto con la lipasa.

30 El documento WO 99/31990 desvela un proceso para preparar una masa y/o un producto horneado producido a partir de una masa que comprende añadir a la masa una carbohidrato oxidasa que tiene una actividad mayor en un oligosacárido que tiene un grado de polimerización de 2 o mayor como un sustrato que en un monosacárido correspondiente.

Sumario de la invención

35 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una combinación de una enzima oxidante de maltosa "MOX" y un agente emulsionante dan como resultado propiedades particularmente ventajosas en una masa y en productos de masa y/o en productos horneados de los mismos. En particular la estabilidad (por ejemplo estabilidad de choque) y/o las propiedades reológicas (por ejemplo disminución de la pegajosidad) y/o de capacidad de mecanización y/o el volumen resultante tanto de la masa como de los productos horneados (por ejemplo productos horneados con mejor estructura de la miga y/o homogeneidad) se mejora/mejoran. Además, la combinación de la MOX y del agente emulsionante da como resultado una mejora en la calidad del pan, en particular con respecto al volumen específico y/o la homogeneidad de la masa.

45 Los presentes inventores describen el uso de una MOX y de un agente emulsionante para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de la masa.

Los presentes inventores describen el uso de una MOX y un agente emulsionante para mejorar el volumen de un producto horneado producido a partir de una masa.

50 Aspectos detallados

55 En un aspecto la invención proporciona un método para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de una masa de harina refinada y/o la calidad (por ejemplo el volumen) del producto producido a partir de la masa, que comprende añadir a la masa una combinación que comprende una enzima oxidante de maltosa (MOX) y un agente emulsionante en la que el agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica modificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

60 Los factores que influyen a las propiedades reológicas y/o la capacidad de mecanización incluyen la pegajosidad y la extensibilidad.

65 Las enzimas oxidantes de maltosa adecuadas para usar de acuerdo con la presente invención y/o para usar en el método de la presente invención incluyen (pero no se limitan a) una enzima seleccionada del grupo que consiste en: la hexosa oxidasa desvelada en el documento WO96/39851; la carbohidrato oxidasa desvelada en el documento EP 1 041 890; el glucooligosacárido desvelado en Lin S.F. et al Biochim. Biophys. Acta 1991 (11 de dic); 1118(1):41-47 o variantes u homólogos de cualquiera de los mismos. Cada una de estas referencias se incorpora en el presente

documento por referencia. Otra enzima adecuada puede identificarse por detección de la capacidad oxidante de maltosa.

Preferentemente, la MOX es una oxidorreductasa.

Una MOX altamente preferida es una hexosa oxidasa (HOX).

En otro aspecto la invención proporciona un método para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de una masa de harina refinada y/o la calidad (por ejemplo volumen) del producto hecho a partir de la masa, que comprende añadir a la masa una combinación que comprende una MOX y un agente emulsionante en el que la masa de harina comprende al menos un aditivo o ingrediente de masa adicional y en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona un método para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de una masa de harina refinada y/o la calidad (por ejemplo volumen) del producto hecho a partir de la masa, que comprende añadir a la masa una combinación que comprende una MOX y un agente emulsionante en el que el producto se selecciona de un producto de pan, un producto de fideos, un producto de pastel, un producto de pasta y un producto de pasta alimentaria y en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona un método para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de una masa de harina refinada y/o la calidad (por ejemplo volumen) del producto hecho a partir de la masa, que comprende añadir a la masa una combinación que comprende una MOX y un agente emulsionante en el que al menos una enzima adicional se añade a los ingredientes de la masa, los aditivos de la masa o la masa y en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona una composición que mejora una masa que comprende una MOX y un agente emulsionante y en la que el agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona una composición que mejora una masa que comprende una MOX y un agente emulsionante en la que la masa de harina refinada comprende al menos un aditivo o ingrediente de masa adicional y en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona el uso de una composición que mejora una masa que comprende una MOX y un agente emulsionante en la fabricación de un producto hecho a partir de la masa en el que el producto se selecciona del grupo que consiste en un producto de pan, un producto de fideos, un producto de pastel, un producto de pasta y un producto de pasta alimentaria en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona una composición que mejora una masa que comprende una MOX y un agente emulsionante en la que al menos una enzima adicional se añade a los ingredientes de la masa, los aditivos de la masa o la masa en la que el agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona el uso de una composición que mejora una masa que comprende una MOX y un agente emulsionante en la que dicha composición mejora las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de una masa de harina refinada en la que el agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona el uso de una composición que mejora una masa que comprende una MOX y un agente emulsionante en la que dicha composición mejora el volumen de un producto horneado hecho a partir de una masa de harina refinada en la que agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

En otro aspecto la invención proporciona una masa para añadir a una esponja en la que dicha masa comprende una MOX y un agente emulsionante en la que el agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.

5 En otro aspecto la invención proporciona una masa para añadir a una esponja en la que dicha masa comprende una MOX y un agente emulsionante en la que el agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y en la que la masa comprende al menos un aditivo o ingrediente de la masa adicional.

10 En otro aspecto la invención proporciona el uso de una composición que mejora una masa en la que dicha composición que mejora una masa comprende al menos los siguientes componentes: una MOX, un agente emulsionante en el que dicho agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y una enzima adicional.

15 En otro aspecto la invención proporciona una composición que mejora una masa en la que dicha composición que mejora una masa comprende al menos los siguientes componentes: una MOX, un agente emulsionante y una enzima adicional en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y en el que dicha enzima adicional es una xilanasas.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una composición que mejora una masa en panadería en la que dicha composición que mejora una masa comprende al menos los siguientes componentes: una MOX, un agente emulsionante y una enzima adicional en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y en el que dicha enzima adicional es opcionalmente una xilanasas.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para producir una composición que mejora una masa que comprende añadir a uno o dos de los componentes de dicha composición que mejora una masa dos o más de los otros componentes respectivamente en el que dicha composición que mejora una masa comprende al menos los siguientes componentes: una MOX, un agente emulsionante y una enzima adicional en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y en el que dicha enzima adicional es opcionalmente una xilanasas.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona un producto horneado o una masa obtenidos de la composición que mejora una masa en el que dicha composición que mejora una masa comprende al menos los siguientes componentes: una MOX, un agente emulsionante y una enzima adicional en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y en el que dicha enzima adicional es opcionalmente una xilanasas.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un producto horneado o una masa obtenidos del uso de una composición que mejora una masa en el que dicha composición que mejora una masa comprende al menos los siguientes componentes: una MOX, un agente emulsionante y una enzima adicional en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y en el que dicha enzima adicional es opcionalmente una xilanasas.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un producto horneado o una masa obtenidos de un proceso para producir una composición que mejora una masa que comprende añadir a uno o dos de los componentes de dicha composición que mejora una masa dos o más de los otros componentes respectivamente en el que dicha composición que mejora una masa comprende al menos los siguientes componentes: una MOX, un agente emulsionante y una enzima adicional en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente y en el que dicha enzima adicional es opcionalmente una xilanasas.

45 Preparación de la masa

50 De acuerdo con la invención, la masa se prepara mezclando harina refinada, agua, la composición para mejorar la masa y opcionalmente otros ingredientes como aditivos. La composición para mejorar la masa puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la harina refinada, el agua u opcionalmente otros ingredientes o aditivos. La composición para mejorar la masa puede añadirse antes de la harina refinada o del agua o los otros

ingredientes y aditivos opcionales. La composición para mejorar la masa puede añadirse después de la harina refinada o del agua o los otros ingredientes y aditivos opcionales. La masa puede prepararse por cualquier método de preparación de masa convencional común en la industria de la panadería o en cualquier otra industria de fabricación de productos de base de masa de harina refinada.

5 La composición para mejorar la masa puede añadirse como una preparación líquida o en la forma de una composición en polvo seco que comprende la composición como el componente activo solo o bien en una mezcla con uno o más ingredientes o aditivos de la masa.

10 Masa

La masa de la invención comprende generalmente harina de trigo o harina refinada de trigo y/u otros tipos de harina, harina refinada o almidón tales como harina refinada de maíz, almidón de maíz, harina refinada de maíz, harina refinada de arroz, harina refinada de centeno, harina de centeno, harina refinada de avena, harina de avena, harina refinada de soja, harina de sorgo, harina refinada de sorgo, harina de patata, harina refinada de patata o harina de patata.

La masa de la invención puede ser fresca, congelada o congelada parcialmente.

20 La masa de la invención puede ser una masa fermentada o una masa a someterse a fermentación. La masa puede fermentarse de varias formas, tales como añadiendo agentes de fermentación químicos, por ejemplo, bicarbonato sódico o añadiendo una levadura (masa fermentante), pero se prefiere fermentar la masa añadiendo un cultivo de levaduras adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de la cerveza), por ejemplo una cepa disponible en el mercado de *S. cerevisiae*.

25 La masa puede comprender también otros ingredientes de masa convencionales, por ejemplo: proteínas, tales como polvo de leche, gluten y soja; huevos (huevos enteros, yemas de huevo o bien claras de huevo); un oxidante tal como ácido ascórbico, bromato potásico, yodato potásico, azodicarbonamida (ADA) o persulfato amónico; un aminoácido tal como L-cisteína; un azúcar, una sal tal como cloruro sódico, acetato cálcico, sulfato sódico o sulfato cálcico.

La masa puede comprender grasas tal como grasa o manteca granuladas.

35 La masa puede comprender adicionalmente un emulsionante adicional tal como mono- o diglicéridos, ésteres de azúcares de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxietileno o lisolectina.

La invención también proporciona una pre-mezcla que comprende harina refinada con la combinación como se describe anteriormente. La pre-mezcla puede contener otros aditivos de mejora de la masa y/o de mejora de pan, por ejemplo cualquiera de los aditivos, incluyendo las enzimas, mencionadas en el presente documento.

40 Preferentemente la masa de harina refinada comprende una harina refinada de fuerza.

La frase "harina refinada de fuerza" como se usa en el presente documento se refiere a una harina refinada que tiene un contenido proteico tal como gluten mayor que otras harinas refinadas y es adecuado para la producción de, por ejemplo, pan. La frase "harina refinada de fuerza" como se usa en el presente documento es sinónimo de la frase "harina refinada de fuerza".

50 Una harina refinada preferida es harina refinada de trigo. Sin embargo también se contemplan masas que comprenden harina refinada derivada de, por ejemplo, maíz, maíz, avena, cebada, centeno, soja, sorgo y patata.

Preferentemente la masa de harina refinada comprende una harina refinada de trigo de fuerza.

55 Propiedades reológicas

La frase "propiedades reológicas" como se usa en el presente documento se refiere a los fenómenos físicos y químicos descritos en el presente documento que en combinación determinarán el rendimiento de las masas de harina refinada y por lo tanto también la calidad de los productos resultantes.

60 La frase "capacidad de mecanización de una masa de harina refinada" como se usa en el presente documento se refiere a la manipulación mejorada por mecanización de la masa. La masa es menos pegajosa en comparación con la masa sin la adición de la combinación.

65 En una realización adicional, la invención se refiere a la mejora de las características reológicas de la masa incluyendo que el índice de gluten en la masa se aumente al menos el 5 %, con respecto a una masa sin la adición de una combinación, el índice de gluten se determina por medio de un aparato Glutomatic 2200.

La frase "propiedades reológicas" como se usa en el presente documento se refiere a los efectos de los acondicionadores de la masa en la fuerza y la estabilidad de la masa como las características más importantes de las masas de harina refinada. De acuerdo con el Método 36-01A de la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC) el término "estabilidad" puede definirse como "el intervalo de tiempo de la masa durante el que se obtiene una respuesta positiva y aquella propiedad de una masa redondeada por la que resiste el aplastamiento de su propio peso durante el transcurso de un tiempo". De acuerdo con el mismo método, el término "respuesta" se define como "la reacción de la masa a un estímulo, sustancia o conjunto de condiciones conocidos y específicos, normalmente determinada horneándola en comparación con un control".

Como se menciona en el presente documento, es generalmente deseable mejorar el rendimiento de horneado de la harina refinada para lograr una masa con estiramiento mejorado y de esta manera teniendo una fuerza y una estabilidad deseables añadiendo agentes oxidantes que causan la formación de enlaces disulfuro proteicos por los cuales la proteína forma una matriz más estable dando como resultado una mejor calidad de la masa y mejoras del volumen y la estructura de la miga de productos horneados.

El efecto de la combinación de las propiedades reológicas de la masa puede medirse por los métodos convencionales de acuerdo con la Asociación Internacional de Químicos de Cereales (ICC) y la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC) incluyendo el método del amilógrafo (ICC 126), el método del farinógrafo (AACC 54-21) y el método del extensígrafo (AACC 54-10). El método AACC 54-10 define el extensígrafo de la siguiente manera: "el extensígrafo graba una curva de extensión de carga para una pieza de ensayo de masa hasta que se rompe. Las características de las curvas de extensión de carga o extensigramas se usan para evaluar la calidad general de la harina refinada y sus respuestas a los agentes de mejora". En efecto, el método del extensígrafo mide la fuerza relativa de una masa. Una masa fuerte muestra una curva de extensígrafo mayor y, en algunos casos, más larga que la de una masa débil.

En una realización preferida de la invención, la resistencia a la extensión de la masa en términos de la relación entre la resistencia a la extensión (altura de la curva, B) y la extensibilidad (longitud de la curva, C), es decir la relación B/C como se mide por el método 54-10 de la AACC se aumenta al menos un 10 % con respecto a aquella de una masa de otra forma similar que no contiene una combinación. En realizaciones más preferidas, la resistencia a la extensión se aumenta al menos un 20 %, tal como al menos el 50 % y en particular al menos el 100 %.

Se ha encontrado que la adición de la composición de la presente invención a masas de productos de panadería da como resultado productos de panadería tales como productos fermentados por levaduras y productos fermentados químicamente en los que el volumen específico se aumenta con respecto a un producto de panadería de otra forma similar. En este contexto, la expresión "volumen específico" se usa para indicar la relación entre el volumen y el peso del producto. Se ha encontrado que, de acuerdo con el método descrito en el presente documento, el volumen específico puede aumentarse significativamente como al menos el 10 %, preferentemente al menos el 20 %, incluyendo al menos el 30 %, preferentemente al menos el 40 % y más preferentemente al menos el 50 %.

La presente invención es altamente adecuada para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización y/o la calidad (por ejemplo volumen) de los productos acabados (productos hechos a partir de la masa) de tipos convencionales de productos de pan fermentados por levaduras de base de harina refinada de trigo, tales como panes y bollos. La presente invención también es adecuada para mejorar las propiedades reológicas de masas que contienen agentes de fermentación químicos (levadura en polvo) y la calidad (por ejemplo el volumen) de productos hechos a partir de tales masas. Tal producto incluye como ejemplos panes, bizcochos y muffins.

Fideos

En un aspecto interesante, la invención se usa para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de masas destinadas a productos de fideos incluyendo "fideos blancos" y "fideos chinos" y para mejorar las cualidades de la textura de los productos de fideos acabados. Una receta básica típica para la fabricación de fideos comprende los siguientes ingredientes: 100 partes de harina refinada de trigo, 0,5 partes de sal y 33 partes de agua. Además, el glicerol se añade normalmente a la masa de los fideos. Los fideos se preparan típicamente mezclando los ingredientes en un aparato de mezcla apropiado enrollando la masa de los fideos usando una máquina de fideos apropiada para formar las cuerdas de fideos que posteriormente se secan al aire.

La calidad de los fideos acabados se evalúa entre otros (i.a.) por su color, su calidad de cocinado y su textura. Los fideos deben cocinarse tan rápido como se pueda, mantenerse firmes después de cocinarse y preferentemente no deben perder ningún sólido en el agua de cocinado. Al servir los fideos deben tener preferentemente una superficie suave y firme que no muestre pegajosidad y proporcionar un "mordisco" firme y un buen gusto en la boca. Además, es importante que los fideos blancos tengan un color claro.

Ya que la idoneidad de la harina refinada de trigo para proporcionar fideos que tengan las cualidades de textura y al comer deseadas puede variar de acuerdo con el año y el área de crecimiento, es usual añadir mejoradores de los fideos a la masa para compensar la calidad sub-óptima de la harina refinada. Típicamente, tales mejoradores comprenderán sustancias de fibra dietéticas, proteínas vegetales, emulsionantes e hidrocoloides tales como por

ejemplo alginatos, carragenanos, pectinas, gomas vegetales incluyendo goma guar y goma de garrofn y amilasas y glicerol.

5 Es por lo tanto un aspecto importante de la invención que la composición de acuerdo con la invención es útil como un agente de mejora de fideos opcionalmente en combinación con glicerol y otros componentes usados actualmente para mejorar la calidad de los fideos. De esta manera, se contempla que los fideos preparados de acuerdo con el método del presente documento tengan propiedades mejoradas con respecto al color, las cualidades de textura y al comer incluyendo una textura y una consistencia firmes, elásticas y no pegajosas.

10 Producto de pasta alimentaria

15 En una realización útil adicional, la masa que se prepara por el método de acuerdo con la invención es una masa para preparar un producto de pasta alimentaria. Tales productos que incluyen como ejemplos espaguetis y macarrones se preparan típicamente a partir de una masa que comprende ingredientes principales tales como harina refinada, huevos o polvo de huevo y/o agua. Después de la mezcla de los ingredientes, se forma la masa para el tipo deseado de producto de pasta y se seca al aire. Se contempla que la adición de la combinación de masa de pasta, opcionalmente en combinación con su sustrato, tendrá un efecto de mejora significativo en la extensibilidad y la estabilidad de la misma resultando en un producto de pasta acabado que tenga cualidades de textura y al comer mejoradas.

20 Pan

25 En la invención la mejora de las propiedades reológicas de la masa incluye que la resistencia a la extensión de la masa en términos de la relación entre la resistencia a la extensión (altura de la curva, B) y la extensibilidad (longitud de la curva, C), es decir la relación B/C, como se mide por el método 54-10 de la AACC se aumenta al menos un 10 % con respecto a la de una masa de otra manera similar que no comprende la combinación y en la que la mejora de la calidad del producto acabado hecho a partir de la masa es que el diámetro de poro medio de la masa del pan hecho a partir de la masa se reduce al menos un 10 %, con respecto a un pan que se hace a partir de una masa de pan sin adición de la combinación.

30 En una realización adicional, la invención, implica que la mejora de la calidad del producto hecho a partir de la masa consiste en que la homogeneidad del poro del pan hecho a partir de la masa se aumenta al menos un 5 %, con respecto a un pan que se hace a partir de una masa de pan sin adición de la combinación. La homogeneidad de poros del pan se mide convenientemente por medio de un analizador de imágenes compuesto por una videocámara CCD convencional, un digitalizador de vídeo y un ordenador personal con software WinGrain. Usando un analizador tal, los resultados del diámetro de poro en mm y la homogeneidad de poros puede calcularse como una media de medidas de 10 rebanadas de pan. La homogeneidad de poros se expresa en % de poros que son mayores que 0,5 veces la media del diámetro de poro y más pequeños que 2 veces el diámetro medio.

40 Preferentemente, la masa es una masa fermentada por levadura. Sin embargo, se prefiere usar el método de la presente invención para la fabricación de productos de pan fermentados por levadura tales como barras de pan, bollos o tostadas de pan, el uso del método para cualquier otro tipo de masa y de productos basados en masa tales como fideos y productos de pasta y pasteles, la calidad de los que puede mejorarse por la adición de la combinación de acuerdo con la presente invención, también se contempla.

45 Preferentemente el método comprende una etapa adicional en que la masa se hornea para obtener un producto horneado.

50 Preferentemente, cuando la masa es una masa de pan, el método comprende como una etapa adicional que la masa se hornee para obtener un producto horneado. Una propiedad particularmente deseada de los productos de pan horneados es un volumen específico alto como se define en los ejemplos. En consecuencia, la adición de la combinación de la invención da como resultado preferentemente un aumento del volumen específico del producto horneado que es al menos un 10 %, con respecto al producto horneado hecho en condiciones idénticas salvo que no se añade la enzima. Más preferentemente, el aumento del volumen específico es al menos un 20 % tal como al menos un 30 %, por ejemplo al menos del 40 %. De forma alternativa, la masa es una masa seleccionada del grupo que consiste en una masa de pasta, una masa de fideos y una masa de pastel o una pasta.

60 La frase "calidad del producto" como se usa en el presente documento se refiere al volumen vinal y estable y/o el color de la corteza y/o la textura y el sabor.

65 En un aspecto de la presente invención, la frase "producto hecho a partir de masa" como se usa en el presente documento se refiere a un producto de pan tal como en la forma de barras o bollos, pan tipo baguette francesa, pan de pita, tacos y pan crujiente. En una realización altamente preferida, el "producto hecho a partir de masa" es un producto de pan tal como barras, bollos, pan tipo baguette francesa, pan de pita y pan crujiente.

En otro aspecto de la presente invención, la frase “producto hecho a partir de masa” se refiere a pasteles, tortitas, galletas.

En un aspecto adicional de la presente invención la frase “producto hecho a partir de masa” se refiere a pasta.

En otro aspecto de la presente invención, la frase “producto hecho a partir de pasta” se refiere a fideos.

En un aspecto adicional de la presente invención, la frase “producto hecho a partir de masa” se refiere a un producto de pasta alimentaria.

Cantidad de enzima

Preferentemente la o cada enzima se añade en una cantidad de 1-1000 ppm, preferentemente de 25-500 ppm, más preferentemente de 50-300 ppm.

Ensayo de actividad MOX

Las enzimas oxidantes de maltosa adecuadas para usar de acuerdo con la presente invención y/o para usar en el método de la presente invención incluyen (pero no se limitan a) una enzima seleccionada del grupo que consiste en: la hexosa oxidasa desvelada en el documento WO96/39851; la carbohidrato oxidasa desvelada en el documento EP 1 041 890; el glucooligosacárido desvelado en Lin S.F. et al. Biochim. Biophys. Acta 1991 (11 de dic); 1118(1):41-17 o variantes u homólogos o derivados de cualquiera de las mismas. Cada una de estas referencias se incorpora en el presente documento por referencia.

Otra enzima adecuada puede identificarse por detección de la capacidad oxidante de maltosa - tal como usando ensayo o ensayos apropiados.

El ensayo MOX se basa en la medida del peróxido de hidrógeno generado en la oxidación de la maltosa. El peróxido de hidrógeno se oxida con ABTS en presencia de peroxidasa para formar un tinte.

MOX



Peroxidasa



Reactivos:

- 1) tampón fosfato 100 mM, pH 6,3
- 2) maltosa 55 mM (SIGMA, 47288) en tampón fosfato 100 mM, pH 6,3
- 3) ABTS (SIGMA, A 1888), 5,0 mg/ml en agua destilada
- 4) Peroxidasa (SIGMA, P-6782), 0,10 mg/ml en tampón fosfato 100 mM, pH 6,3

Sustrato:

- 4,600 ml de reactivo 2
- 0,200 ml de reactivo 3
- 0,200 ml de reactivo 4

Ensayo:

- 290 µl de sustrato y
- 10 µl de solución enzimática

La reacción se inicia por la adición de solución enzimática. La mezcla se incuba a 25 °C y se miden las cinéticas de la reacción durante 10 minutos en un espectrofotómetro (405 nm). La muestra del blanco contiene todos los componentes salvo la solución enzimática que se reemplaza con agua. A partir de la medición se calcula la pendiente de la curva OD/min. Curva patrón de peróxido de hidrógeno: Puede construirse una curva patrón de peróxido de hidrógeno usando diversas concentraciones de solución de H₂O₂ preparada recientemente (MERCK perhidrol 107298). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de H₂O₂ por min a 25 °C.

Preferentemente, la MOX es una oxidoreductasa.

HOX

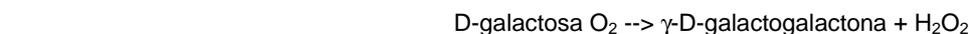
Una MOX altamente preferida es HOX.

- 5 El término "HOX" como se usa en el presente documento se refiere a Hexosa oxidasa (D-hexosa:O₂-oxidoreductasa, EC 1.1.3.5).

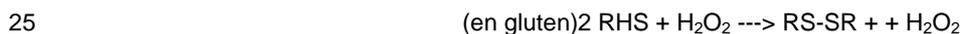
10 La hexosa oxidasa es capaz de oxidar maltosa. La hexosa oxidasa en presencia de oxígeno es capaz de oxidar D-glucosa y otros varios azúcares reductores incluyendo maltosa, lactosa, galactosa, xilosa, arabinosa y celobiosa en sus lactonas correspondientes con posterior hidrólisis a los ácidos aldobiónicos respectivos. En consecuencia, las hexosa oxidasas difieren de la glucosa oxidasa que solamente puede convertir D-glucosa, en que las hexosa oxidasas pueden utilizar un intervalo más amplio de sustratos azúcares. La oxidación catalizada por la enzima puede ilustrarse como sigue:



o



o



donde R: Molécula de proteína HS: Grupos tiol S-S: Enlaces disulfuro

30 La hexosa oxidasa (que puede denominarse en lo sucesivo "HOX") se ha aislado de varias especies de algas rojas de la familia *Gigartinales*, que pertenecen al orden *Gigartinales*, tales como *Irdophycus flaccidum* (Bean y Hassid, 1956, J. Biol. Hem., 218:425-436) y *Chondrus crispus* (Ikawa 1982, Methods Enzymol., 89:145-149). Adicionalmente, se ha mostrado que especies algales en el orden *Cryptomeniales*, incluyendo la especie *Euthora cristata* (Sullivan et al. 1973, Biochemica et Biophysica Acta, 309:11-22) producen HOX.

35 Otras fuentes potenciales de hexosa oxidasa de acuerdo con la presente invención incluyen especies microbianas o especies vegetales terrestres. De esta manera, como un ejemplo de una fuente vegetal tal, Bean et al., Journal of Biological Chemistry (1961) 236: 1235-1240, desvelaron una oxidoreductasa de frutas cítricas que es capaz de oxidar un amplio intervalo de azúcares incluyendo D-glucosa, D-galactosa, celobiosa, lactosa, maltosa, D-2-desoxiglucosa, D-manosa, D-glucosamina y D-xilosa. Otro ejemplo de una enzima que tiene actividad hexosa oxidasa es el sistema enzimático de *Malleomyces mallei* desvelado por Dowling et al., Journal of Bacteriology (1956) 72:555-560.

45 La HOX puede aislarse y/o purificarse a partir de fuentes naturales o puede prepararse por el uso de técnicas de ADN recombinante.

Una enzima o enzimas que tienen actividad HOX y se preparan por técnicas de ADN recombinante se enseñan en el documento WO96/40935. La enzima o enzimas enseñadas en ese documento pueden ser adecuadas para usar de acuerdo con la presente invención. Ese documento se incorpora en el presente documento por referencia.

50 El documento US6251626 desvela una enzima HOX que incluye secuencias, cuya enzima puede ser adecuada para usar de acuerdo con la presente invención.

La enzima HOX para usar de acuerdo con la presente invención puede ser una variante o un derivado de una HOX natural.

55 La enzima HOX, o una variante o un derivado de una HOX natural, adecuada para usar de acuerdo con la presente invención oxida preferentemente maltosa en la masa (es decir oxidación *in situ* de maltosa).

60 Preferentemente, la HOX se añade en una forma sustancialmente pura y/o sustancialmente aislada. Cuando se usan fuentes naturales para la hexosa oxidasa, la enzima se aísla típicamente a partir del material de partida, tal como el material de partida de algas, por extracción usando un medio de extracción acuoso. Como material de partida, pueden usarse algas en su estado fresco se han recolectado del área marina donde crecen y/o puede usarse material de algas que se han secado, por ejemplo secando al aire las frondes del alga a temperatura ambiente o por cualquier método de secado industrial adecuado tal como secar en aire calentado que circula o por secado por congelación. Para facilitar la siguiente etapa de extracción, el material de partida fresco y/o seco puede fragmentarse ventajosamente por ejemplo moliendo o mezclando.

65

Como el medio de extracción acuoso, son adecuadas soluciones tampón, por ejemplo que tengan un pH en el intervalo de 5-8, tales como tampón fosfato sódico 0,1 M, tampón trietanolamina 20 mM o tampón Tris-HCl 20 mM. La hexosa oxidasa se extrae típicamente del material de algas suspendiendo el material de partida en el tampón y manteniendo la suspensión a una temperatura en el intervalo de 0-20 °C tal como a aproximadamente 5 °C durante 1 a 5 días, preferentemente en agitación.

El material de algas suspendido se separa después del medio acuoso por un método de separación apropiado tal como filtración, tamizado o centrifugación y la hexosa oxidasa se recupera posteriormente del filtrado o del sobrenadante. Opcionalmente, el material de algas separado se somete a una o más etapas de extracción.

Ya que muchas algas marinas contienen pigmentos coloreados tales como ficocianinas, puede requerirse someter al filtrado o al sobrenadante a una etapa de purificación adicional por la que estos pigmentos se retiran. Como un ejemplo, los pigmentos pueden retirarse tratando el filtrado o el sobrenadante con un disolvente orgánico en el que los pigmentos sean solubles y posteriormente separando el disolvente que contiene los pigmentos disueltos del medio acuoso. De forma alternativa, los pigmentos pueden retirarse sometiendo al filtrado o al sobrenadante a una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba.

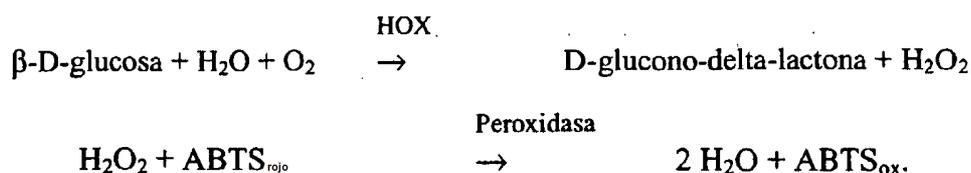
La recuperación de la hexosa oxidasa del medio de extracción acuoso se lleva a cabo por cualquier método convencional adecuado que permita el aislamiento de proteínas de medios acuosos. Tales métodos, ejemplos de los cuales se describen en detalle en el documento WO96/39851 (cuya aplicación se incorpora en el presente documento por referencia), incluyen métodos convencionales para el aislamiento de proteínas tales como cromatografía de intercambio iónico, opcionalmente seguida de una etapa de concentración tal como ultrafiltración. También es posible recuperar la enzima añadiendo sustancias tales como por ejemplo (NH₄)₂SO₄ o polietilenglicol (PEG) que causa que la proteína precipite, seguido de separar el precipitado y opcionalmente someterlo a condiciones que permitan que la proteína se disuelva.

Para ciertas aplicaciones de la hexosa oxidasa es deseable proporcionar la enzima en una forma sustancialmente pura, por ejemplo como una preparación esencialmente sin otras proteínas o contaminantes no proteicos y en consecuencia, la preparación de enzima relativamente bruta que resulta de las etapas de extracción y aislamiento anteriores pueden someterse a etapas de purificación adicionales tales como etapas de cromatografía, filtración en gel o cromatoenfoco adicionales como también se describe a modo de ejemplo en el documento WO96/39851.

También se hace referencia en el presente documento a las siguientes aplicaciones de EE.UU. US SN 60/438.852, US SN 10/001.136 y US SN 60/256.902 y WO02/39828 cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia y que se refieren al uso de HOX en productos horneados.

Ensayo de actividad HOX:

El ensayo de actividad HOX se basa en la medida del peróxido de hidrógeno generado en la oxidación de glucosa. El peróxido de hidrógeno se oxida con ABTS en presencia de peroxidasa para formar un tinte.



Reactivos:

- 1) tampón fosfato 100 mM, pH 6,3;
- 2) D-glucosa 55 mM (SIGMA, G-8270) en tampón fosfato 100 mM, pH 6,3;
- 3) ABTS (SIGMA, A 1888), 5,0 mg/ml en agua destilada;
- 4) peroxidasa (SIGMA, P-6782), 0,10 mg/ml en tampón fosfato 100 mM, pH 6,3

Sustrato:

- 4,600 ml de reactivo 2;
- 0,200 ml de reactivo 3;
- 0,200 ml de reactivo 4

Ensayo:

- 290 µl de sustrato
- 10 µl de solución enzimática

- 5 La reacción se inicia por la adición de solución enzimática. La mezcla se incuba a 25 °C y se miden las cinéticas de la reacción durante 10 minutos en un espectrofotómetro (405 nm). La muestra del blanco contiene todos los componentes salvo la solución enzimática que se reemplaza con agua. A partir de la medición se calcula la pendiente de la curva OD/min. Curva patrón de peróxido de hidrógeno: Puede construirse una curva patrón de peróxido de hidrógeno usando diversas concentraciones de solución de H₂O₂ preparada recientemente (MERCK perhidrol 107298). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de H₂O₂ por min a 25 °C.
- 10 La HOX está disponible en el mercado bajo el nombre comercial GrindamyI™ SUREBAKE 800 disponible de Danisco A/S.
- Agente emulsionante
- 15 El agente emulsionante es una lipasa en el que la lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.
- De esta manera el agente emulsionante es un agente que genera un emulsionante *in situ*, ya que los ejemplos de agentes emulsionantes que pueden generar un emulsionante *in situ* incluyen enzimas.
- 20 Lipasa
- En términos generales el término “lipasa” como se usa en el presente documento se refiere a enzimas que son capaces de hidrolizar enlaces éster carboxílico para liberar carboxilato (EC 3.1.1). La presente invención emplea una lipasa en la que la lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.
- 25 Por algunos aspectos, preferentemente la lipasa es una fosfolipasa (incluyendo una variante o un derivado de la misma).
- 30 En otro aspecto, preferentemente la lipasa es una galactolipasa (incluyendo una variante o un derivado de la misma).
- Por algunos aspectos, preferentemente la lipasa tiene tanto actividad triacilglicerol lipasa como galactolipasa (incluyendo variantes o derivados de las mismas).
- 35 Por algunos aspectos, preferentemente la lipasa tiene tanto actividad triacilglicerol lipasa como fosfolipasa (incluyendo variantes o derivados de las mismas).
- 40 Por algunos aspectos, preferentemente la lipasa tiene tanto actividad fosfolipasa como galactolipasa (incluyendo variantes o derivados de las mismas).
- Por algunos aspectos, preferentemente la lipasa tiene actividad fosfolipasa, galactolipasa y triacilglicerol (incluyendo una variante o un derivado).
- 45 Por algunos aspectos, preferentemente la lipasa tiene actividad fosfolipasa, galactolipasa y triacilglicerol (incluyendo variantes o derivados de las mismas) y la lipasa tiene una preferencia por la hidrólisis de restos de ácidos grasos de cadena larga (C12-C20) sobre los restos de ácidos grasos de cadena corta (C4-C10). Un ejemplo de una lipasa tal es una lipasa que comprende un polipéptido en la que dicho polipéptido comprende una secuencia como se muestra en la ID de SEC nº 2 (o una variante o un derivado o un homólogo de la misma), dicha lipasa puede prepararse por los métodos desvelados en GRAS Notice 000103, copias del cual están disponibles a partir del Departamento de Salud & Servicios Humanos, Food & Drug Administration, Washington DC 20204. Otras lipasas adecuadas se desvelan en WO00/32758.
- 50 Por algunos aspectos, puede usarse preferentemente una combinación de más de una lipasa, tal como las combinaciones de las lipasas desveladas en el documento WO02/03805.
- 55 Preferentemente la lipasa se añade en una forma sustancialmente pura y/o sustancialmente aislada.
- 60 Las lipasas que son útiles en la presente invención pueden derivar de una especie bacteriana, de una especie fúngica, de una especie de levadura, de una célula animal y de una célula vegetal. Mientras que la enzima puede proporcionarse cultivando cultivos de tales organismos fuente que producen lipasa de origen natural, puede ser más conveniente y barato producirla por medio de células genéticamente modificadas tal como se describe en el documento WO 9800136. El término “derivado” puede implicar que un gen que codifica para la lipasa se aisle de un organismo fuente y se inserte en una célula hospedadora capaz de expresar el gen.
- 65

Las lipasas adecuadas para usar de acuerdo con la presente invención y/o para usar en el método de la presente invención incluyen (pero no se limitan a) una o más lipasas seleccionadas de las lipasas desveladas en los documentos EP0130064, WO 98/26057, WO00/32758, WO 02/03805 y LipopanH, también denominada Lecitasa UltraTM y HL1232 (LipopanH se desvela en GRAS Notice 000103, copias de la cual están disponibles a partir del Departamento de Salud & Servicios Humanos, Food & Drug Administration, Washington DC 20204). Cada una de estas referencias se incorpora en el presente documento por referencia.

De forma adecuada, por algunos aspectos de la presente invención la lipasa puede ser LipopanF (suministrada por Novozymes) o una variante, un derivado o un homólogo de la misma.

De forma alternativa, la lipasa o lipasas para usar de acuerdo con la presente invención y/o para usar en el método de la presente invención puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como ID de SEC nº 1 o una variante, un derivado o un homólogo de la misma y/o la secuencia de aminoácidos mostrada como ID de SEC nº 2 o una variante, un derivado o un homólogo de la misma.

Un ejemplo de una secuencia de aminoácido mostrada como ID de SEC nº 2 es la secuencia de aminoácido mostrada como ID de SEC nº 2a o una variante, un derivado o un homólogo de la misma.

La secuencia de aminoácidos mostrada como ID de SEC nº 2a puede, por ejemplo, truncarse en varios puntos en la secuencia de aminoácidos. Cada una de estas secuencias truncadas también se llama ID de SEC nº 2. Las posiciones de tales truncamientos adecuados pueden ser como se muestran en la Figura 5 y como se describe a continuación. En la Figura 5, hay dos variaciones posibles en el N terminal y cuatro en el C-terminal de la ID de SEC nº 2.

Aditivos o ingredientes de la masa adicionales

Típicamente, los aditivos o ingredientes (componentes) de la masa adicionales incluyen aditivos o ingredientes de la masa usados convencionalmente tales como sal, agentes edulcorantes tales como azúcares, jarabes o agentes edulcorantes artificiales, sustancias lipídicas que incluyen materia grasa, margarina, mantequilla o aceite animal o vegetal, glicerol y uno o más aditivos de masa tales como agentes emulsionantes, enzimas degradantes de almidón, enzimas degradantes de celulosa o hemicelulosa, proteasas, agentes oxidantes no específicos tales como aquellos anteriormente mencionados, agentes saborizantes, cultivos de bacterias del ácido láctico, vitaminas, minerales, hidrocoloides tales como alginatos, carragenanos, pectinas, gomas vegetales que incluyen por ejemplo goma guar y goma de garrofín y sustancias de fibra dietéticas.

El aditivo o ingrediente de masa adicional puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la harina refinada, el agua u otros ingredientes o aditivos opcionales o la composición de mejora de la masa. El aditivo o el ingrediente de la masa adicional puede añadirse antes de la harina refinada, el agua, los otros ingredientes o aditivos opcionales o la composición de mejora de la masa. El aditivo o el ingrediente de la masa adicional puede añadirse después de la harina refinada, el agua, los otros ingredientes o aditivos opcionales o la composición de mejora de la masa.

El aditivo o el ingrediente de la masa adicional puede ser convenientemente una preparación líquida. Sin embargo, el aditivo o el ingrediente de la masa adicional puede estar convenientemente en la forma de una composición seca.

Preferentemente el aditivo o el ingrediente de la masa adicional se selecciona del grupo que consiste en un aceite vegetal, una grasa vegetal, una grasa animal, materia grasa, glicerol, margarina, mantequilla, nata y grasa láctea.

Preferentemente el aditivo o el ingrediente de la masa adicional es al menos el 1 % del peso del componente de harina refinada de la masa. Más preferentemente, el aditivo o el ingrediente de la masa adicional es al menos el 2 %, preferentemente al menos el 3 %, preferentemente al menos el 4 %, preferentemente al menos el 5 %, preferentemente al menos el 6 %.

Si el aditivo es una grasa, entonces típicamente la grasa puede estar presente en una cantidad del 1 al 5 %, típicamente del 1 al 3 %, más típicamente aproximadamente el 2 %.

Enzima adicional

Las enzimas adicionales que pueden usarse pueden seleccionarse del grupo que consiste en una xilanasa, una celulasa, una hemicelulasa, una enzima degradante de almidón, una proteasa, una lipoxigenasa, una oxidoreductasa, una lipasa y una enzima oxidante tal como una cualquiera o más de glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), carbohidrato oxidasa, glicerol oxidasa, piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10) y hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5).

Entre las enzimas degradantes de almidón, las amilasas son particularmente útiles como aditivos de mejora de la masa. La α -amilasa rompe el almidón en dextrinas que se rompen adicionalmente por la β -amilasa en maltosa. Otras enzimas degradantes de almidón útiles que pueden añadirse a una composición de masa incluyen

glucoamilasas y pululanastas.

Preferentemente, la enzima adicional de la presente invención es al menos una xilanasas y/o al menos una amilasa.

5 El término "xilanasas" como se usa en el presente documento se refiere a xilanasas (EC 3.2.1.32) que hidrolizan enlaces xilosídicos.

10 El término "amilasa" como se usa en el presente documento se refiere a amilasas tales como las α -amilasas (EC 3.2.1.1), que hidrolizan enlaces 1,4- α -D-glucosídicos en los polisacáridos que contienen tres o más unidades de glucosa 1,4- α -enlazadas, las β -amilasas (EC 3.2.1.2), que hidrolizan enlaces 1,4- α -D-glucosídicos en los polisacáridos para retirar unidades de maltosa sucesivas de los extremos no reductores de las cadenas y la γ -amilasa (EC 3.2.1.3) que hidroliza los restos de α -D-glucosa unidos 1,4 terminales sucesivamente a partir de los extremos no reductores de las cadenas con la liberación de β -D-glucosa.

15 La enzima adicional puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la harina refinada, el agua o los otros ingredientes o aditivos opcionales o la composición que mejora la masa. La enzima adicional puede añadirse antes de la harina refinada, el agua y los otros ingredientes o aditivos opcionales o la composición que mejora la masa. La enzima adicional puede añadirse después de la harina refinada, el agua y los otros ingredientes o aditivos opcionales o la composición que mejora la masa.

20 La enzima adicional puede ser convenientemente una preparación líquida. Sin embargo, la composición puede estar convenientemente en la forma de una composición seca.

25 En algunos aspectos de la presente invención puede encontrarse que algunas enzimas de la composición de mejora de la masa de la invención son capaces de interactuar entre sí en las condiciones de la masa hasta un grado donde el efecto de la mejora de las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de una masa de harina refinada y/o la calidad del producto hecho a partir de la masa por las enzimas no es solamente aditiva sino que el efecto es sinérgico.

30 Con respecto a la mejora del producto hecho a partir de la masa (producto acabado), puede encontrarse que la combinación da como resultado un efecto sinérgico sustancial con respecto a la homogeneidad de la miga como se define en el presente documento. También, con respecto al volumen específico del producto horneado puede encontrarse un efecto sinérgico.

35 Secuencia de nucleótidos

La enzima no necesita ser una enzima nativa. Con respecto a esto, la frase "enzima nativa" significa una enzima entera que está en su medio nativo y cuando se ha expresado por su secuencia de nucleótidos nativa.

40 La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede prepararse usando técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante) Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos podría sintetizarse, por completo o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers MH et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

45 Secuencias de aminoácidos

La enzima puede prepararse/aislarse a partir de una fuente adecuada o puede fabricarse sintéticamente o puede prepararse usando técnicas de ADN recombinante.

50 Variantes/homólogos/derivados

55 La presente invención también abarca el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácido de una enzima de la presente invención o de cualquier secuencia de nucleótido que codifica una enzima tal. En el presente documento, el término "homólogo" significa una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencias de nucleótidos objeto. En el presente documento, el término "homología" puede igualarse a "identidad".

60 En el presente contexto, se toma que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 75, un 85 o un 90 % idéntica, preferentemente al menos un 95 o un 98 % idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, la homóloga comprenderá los mismos sitios activos etc. que la secuencia de aminoácidos objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

65 Las comparaciones de homología pueden realizarse a ojo o más normalmente, con la ayuda de programas de

comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de ordenador pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

5 La invención se describirá ahora a modo de ilustración en los siguientes ejemplos no limitantes y con referencia a las siguientes figuras

La Figura 1 que es una imagen fotográfica de un pan;

10 La Figura 2 que es una imagen fotográfica de un pan; y

La Figura 3 que es una imagen fotográfica de un pan.

La Figura 4 muestra la ID de SEC nº 1.

15 La Figura 5 muestra la ID de SEC nº 2a y muestra a modo de flechas algunas de las posiciones en las que la secuencia de aminoácidos puede estar truncada.

Ejemplos

20 Definiciones

Todos los productos PANODAN™ contienen DATEM (éster de ácido di-acetiltartárico de monoglicéridos) y se obtienen de Danisco A/S.

25 PANODAN™ 521: DATEM que contiene xilanas bacteriana y amilasa fúngica.

TS-E 662™ (obtenido de Danisco A/S) es un producto que contiene hexosa oxidasa (HOX) (EC 1.1.1.5) de *Chondrus crispus* expresada en *Hansenula polymorpha*.

30 SUREBake 800 (obtenido de Danisco A/S) es un producto que contiene hexosa oxidasa (HOX) (EC 1.1.1.5). SUREBake 800 también puede denominarse GRINDAMYL SUREBake 800.

35 TS-E 680™ (obtenido de Danisco A/S) es un producto que contiene xilanas fúngica (EC 3.2.1.8) de *Aspergillus niger*.

TS-E 861™ (obtenido de Danisco A/S) es un producto que contiene xilanas fúngica (EC 3.2.1.8) de *Aspergillus niger*, lipasa (EC 3.1.1.3) de *Thermomyces lanuginosa* expresada en *Aspergillus oryzae* y hexosa oxidasa (EC 1.1.1.5) de *Chondrus crispus* expresada en *Hansenula polymorpha*.

40 GRINDAMYL™ H 640 (obtenido de Danisco A/S): contiene xilanas bacteriana.

Grindamyl™ H 121 (obtenido de Danisco A/S) es una xilanas fúngica (EC 3.2.1.8) de *Aspergillus niger*.

45 Grindamyl™ EXEL 16 (obtenido de Danisco A/S) es una lipasa (EC 3.1.1.3) de *Thermomyces lanuginosa* expresada en *Aspergillus oryzae*.

Grindamyl™ EXEL 66 (obtenido de Danisco A/S) es una mezcla de lipasa (EC 3.1.1.3) de *Thermomyces lanuginosa* expresada en *Aspergillus oryzae* y una xilanas fúngica (EC 3.2.1.8) de *Aspergillus niger*.

50 Lipopan F™ (Lipopan F BG) (obtenido de Novozymes) es de acuerdo con su productor (Novozymes) una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente. De acuerdo con su productor, Lipopan F tiene una actividad inherente frente a los fosfolípidos, glucolípidos y triglicéridos.

55 Recetas/Procedimientos

"Tweedy" de alto volumen

Receta

60

Nombre del producto	%	Gramo	ppm
Harina refinada Ijsvogel™ (obtenible de Meneba, NL)		3000	
Agua	58		
Sal		60	

ES 2 554 107 T3

Nombre del producto	%	Gramo	ppm
Levadura comprimida		180	
Ácido ascórbico			30

Procedimiento:

- 5 • Temperatura de la masa: 29 °C (temperatura de la masa - temperatura de la harina refinada + 4 °C = temperatura del agua)
- Mezcla: 55 WH sin vacío
- Reposo: 5 min a temperatura ambiente
- Escala: 500 g (pan), 1350 g (bollos)
- Reposo: 5 min a temperatura ambiente
- 10 • Moldeado: Puma I 13 II 18 (pan), Fortuna 3/17/7 (bollos), Glimek (máquina de moldeado) 1:4, 2:3, 3:12, 4:14
- Hinchado: 70 min a 43 °C, 70 % HR (pan), 50 min a 34 °C, 85 % de HR (bollos)
- Horneado: BAGO, 35 min + 5 min con el vapor abierto a 220 °C, 12 segundos de vapor (pan), 17 min a 220 °C, 17 segundos de vapor (bollos)

15 Batard turco

Receta

Nombre del producto	%	Gramo	ppm
Harina refinada Ijsvogel™ (obtenible de Meneba, NL)		2000	
Agua	57,00		
Levadura comprimida		80	
Sal		30	
Ácido ascórbico			70

20 *Procedimiento:*

- Temperatura de la harina refinada: 15-17 °C (para pruebas - almacenar el día antes de usar a 15 °C)
- Mezcla: 35 min. Después de 25 min añadir sal
- Después de 30 min añadir levadura
- 25 • Temperatura de la masa: 23-25 °C
- Reposo: 30 min. Reposo general en una mesa (mesa = 22 °C & 80 % de HR)
- Escalar piezas de 300 g
- Redondear: A mano
- Reposo: 30 min en una mesa (mesa = 22 °C & 80 % de HR)... iniciar el reloj cuando empiece la escala
- 30 • Moldeado = Glimek: 1:5, 2:4, 3:15, 4:10... 10 en posición interior.
- Hinchado: 60 min & 90 min para esta prueba a 30 °C & 85 % de HR
- Ensayo de choque
- Cocinar: 20 min en Bago1 & 25 min en Bago2 ... los últimos 5 min es con la compuerta abierta para ambos hornos.
- 35 • Bago1: 250 °C de temperatura inicial 5 segundos de vapor con la compuerta abierta. Bajar la temperatura del horno a 230 °C de una vez. Cerrar la compuerta después de 1½ min.
- Bago2: 275 °C de temperatura inicial 8 segundos de vapor con la compuerta abierta. Bajar la temperatura del horno a 260 °C de una vez. Cerrar la compuerta después de 1½ min.

40 Bollos crujientes

Receta:

Nombre del producto	%	Gramo	ppm
Harina refinada de plata danesa		2000	
Agua	58 / 60		
Levadura comprimida		120	
Sal		32	
Azúcar		32	

ES 2 554 107 T3

Nombre del producto	%	Gramo	ppm
Ácido ascórbico			40

Procedimiento:

- Mezcla: Diosna 2 + 5 min (dependiendo de la harina refinada)
- Temperatura de la masa: 26 °C
- Escala: 1350 g
- Reposo: 10 min a 30 °C en una cabina de calentamiento
- Moldeado: Fortuna 3/17/7 (bollos)
- Hinchado: 45 min alternativamente 90 min a 34 °C, 85 % de HR.
- Horneado: 18 min a 220 °C, 8 segundos de vapor (horno Bago), 7 segundos de vapor (horno Wachtel)
- (MIWE programa 28) (0,35 litros de vapor, 15 min a 2000 °C, ½ min a 2200 °C)

Tostada de EE.UU.

15 Aquí se prepara una esponja como una pre-mezcla, a todo lo que se le añade después la masa.

Cantidad de harina refinada total: 1.800,000 g.

Receta

		Gr		%
Esponja de EE.UU.:	Harina	900,000	g	50,000 %
	Agua	900,000	g	50,000 %
	Levadura seca	23,400	g	1,300 %
	Alimento para levadura	5,400	g	0,300 %
	Complejo enzimático	0,054	g	0,003 %
	ADA	0,036	g	0,002 %
		Gr		%
Masa de EE.UU.:	Harina	900,000	g	50,000 %
	Agua	234,000	g	13,000 %
	Levadura seca	25,200	g	1,400 %
	Azúcar	153,000	g	8,500 %
	Sal	43,200	g	2,400 %
	Manteca (grasa)	36,000	g	2,000 %
	Sod.Prop.	8,100	g	0,450 %
	Dimodan SDM-T (P100B)	9,000	g	0,500 %
	Ácido ascórbico	0,072	g	0,004 %
	'----->			

	Datem 22-CA-60	4,500	g	0,2500 %
	Grindamyl S685	300	PPM	
25	Grindamyl H640	20	PPM	
	TS-E 662	100	PPM	

30 Ha de tenerse cuidado con la cantidad de agua añadida de la solución de ácido ascórbico y otras soluciones basadas en agua, por ejemplo en la preparación de soluciones diluidas.

La cantidad de agua añadida extra debería extraerse de la cantidad de agua del lado de la masa de la receta.

35 El complejo enzimático es una mezcla de alfa amilasa y amilogucosidasa.
DIMODAN SDM-T (P100/B) (obtenido de Danisco A/S) es un monoglicérido destilado.

ES 2 554 107 T3

Procedimiento:

Para la esponja:

5 Temperatura del agua: 25 °C

Mezclador Hobart

10 Etapa 1, 1 min.
Etapa 2, 1 min.
Etapa 3, 1 min.

Fermentación: 2 h & 15 min a 40 °C & 80 % de HR (humedad relativa)
45 min en el congelador.

15 Para la masa:

20 Mezclar todos los ingredientes juntos
- Mezclador Diosna: Velocidad 1, 120 segundos & Velocidad 2, 450 segundos (o 28 °C de temperatura de la masa)

En una mesa - reposar 5 min.
Pesar los panes a 450 g por pan - reposar 5 min.

25 Ajustes de Glimek (máquina de moldeado): 1, 2, 14, 11 - & 9 cm - leer en la posición externa

Fermentación:

30 1 h & 10 min a 45 °C & 90 % de HR

Horneado:

35 Temperatura de inicio = 250 °C en 25 min.
Insertar los panes y ajustar la temperatura de horneado a 200 °C de una vez.

Pruebas de horneado

40 En cada prueba se han evaluado las características de la masa, la pegajosidad y la puntuación global del pan. La característica de la masa es un total de tres parámetros diferentes: extensibilidad de la masa evaluada justo después de mezclar y de nuevo después de reposar y la pegajosidad después de reposar. Cada parámetro se ha evaluado por los panaderos en una escala de 1 - 10, donde 10 son los mejores. La puntuación en los ejemplos es un tal de estas diferentes puntuaciones.

45 La evaluación de la pegajosidad se ha evaluado subjetivamente por los panaderos justo después de la mezcla en una escala del 1 al 10, donde 10 es el mejor, que significa no pegajoso.

La puntuación global del pan es un total de una evaluación hecha sobre la corteza del pan, la miga, el sellado y la energía global del pan. De nuevo cada parámetro se evalúa en una escala de 1 - 10, donde 10 es el mejor.

50 EJEMPLO 1: Alternativas de ensayo en pan "Tweedy" (procedimiento de RU)

Los panes se dejaron reposar durante 70 min cada uno y después de un hinchado completo, cada pan se trató por choque para evaluar la resistencia al choque y por lo tanto la estabilidad de la masa.

55 En las pruebas de horneado, tanto las soluciones de enzima pura como las combinaciones de DATEM y enzimas se ensayaron como una alternativa a Lipopan F.

Pruebas de horneado 4969-29

Ensayo	Volumen específico, ccm/g	Volumen chocado, ccm/g	Características de la masa	Pegajosidad de la masa	Puntuación global del pan
PANODAN GB al 0,4 %	5,6	4,64	15	4	29

Ensayo	Volumen específico, ccm/g	Volumen chocado, ccm/g	Características de la masa	Pegajosidad de la masa	Puntuación global del pan
PANODAN GB al 0,2 %, GRINDAMYL H121 100 ppm, TS-E 662 100 ppm	5,75	4,92	14	4	30
TS-E 662 100 ppm, GRINDAMYL H121 100 ppm, GRINDAMYL EXEL 16 100 ppm	5,57	4,47	14	4	20
Lipopan F 40 ppm	5,7	4,6	13	4	29
PANODAN GB al 0,2 %, Lipopan F 20 ppm	5,88	4,6	14	4	27
Lipopan F 20 ppm, TS-E 662 100 ppm, GRINDAMYL H121 100 ppm	5,65	4,78	14	4	29
Lipopan F 40 ppm, TS-E 662 100 ppm, GRINDAMYL H121 100 ppm	5,79	4,82	13	4	29

De los resultados puede concluirse que PANODAN GB da como resultado una mejor corteza del producto y un producto.

- 5 La combinación de PANODAN GB junto con xilanasas y hexosasa oxidasa produce un efecto beneficioso.

10 Cuando se usa DATEM y/u HOX junto con GRINDAMYL EXEL 66 el volumen aumenta significativamente y la corteza se mejora considerablemente. El ensayo con PANODAN GB al 0,1 % GRINDAMYL EXEL 66 100 ppm y TS-E 662 (HOX) 100 ppm dio un resultado significativamente bueno al mismo nivel que PANODAN GB al 0,4 %. El uso de DATEM da claramente un efecto significativamente positivo en la corteza si se compara con soluciones de enzimas puras.

EJEMPLO 2: Alternativas de ensayo en batard turco

- 15 Pruebas de horneado 7258-2

Ensayo	Volumen específico, ccm/g	Características de la masa*	Pegajosidad de la masa**	Puntuación global del pan***
Lipopan F 15 ppm, TS-E 680 60 ppm	5,01	14	4	33
Lipopan F 40 ppm	3,78	15	5	32
TS-E 861* 100 ppm	5,03	16	5	44

*Una combinación de xilanasas fúngicas, lipasa degradante de 1,3-triglicéridos y hexosasa oxidasa.

Tanto del volumen específico en la tabla como de las imágenes mostradas en las Figuras 1-3 puede concluirse que el TS-E 861 actúa mejor.

- 20 EJEMPLO 3: Alternativas de ensayo en Bollitos crujientes:

Los bollos se fermentaron a dos tiempos de fermentación distintos - 45 y 90 min para estresar el sistema y por lo tanto dar una mejor imagen del efecto fortalecedor de la masa de los productos. En general puede decirse que 90 minutos de fermentación para un bollo crujiente pequeño es bastante largo.

- 25 Ensayo de horneado: 4969-28

Ensayo	Volumen específico 45 min, ccm/g	Volumen específico 90 min, ccm/g	Características de la masa*	Pegajosidad de la masa**	Puntuación global del pan***
PANODAN A2020 al 0,3 %	7,15	8,48	14	5	25

ES 2 554 107 T3

Ensayo	Volumen específico 45 min, ccm/g	Volumen específico 90 min, ccm/g	Características de la masa*	Pegajosidad de la masa**	Puntuación global del pan***
Lipopan F 30 ppm	6,83	8,1	14	4	26
TS-E 662 100 ppm, GRINDAMYL H 121 100 ppm, GRINDAMYL EXEL 16 100 ppm	6,98	8,98	14	5	27

De los resultados puede verse que el uso de la combinación de xilanas, lipasa degradante de 1,3-triglicérido y hexosa oxidasa produce resultados beneficiosos.

5 A tiempos de fermentación cortos (45 min) a ciertas concentraciones PANODAN A2020 y Lipopan F dieron resultados de volumen comparables. Sin embargo, PANODAN A2020 al 0,3 % mostró mejores resultados con respecto a lo crujiente de la corteza y una mejor estabilidad de la masa en general. Los presentes inventores encontraron que Lipopan F normalmente daba una corteza ligeramente más "húmeda".

10 Usar HOX junto con GRINDAMYL EXEL 66 y PANODAN 660 da como resultado un aumento en la estabilidad de la masa.

A tiempos de fermentación prolongados (90 min) todos los bollos se vuelven relativamente inestables. A algunas concentraciones PANODAN A2020 da, sin embargo, el mejor resultado.

15 EJEMPLO 4: Alternativas de ensayo en la tostada de EE.UU.

El ensayo de Lipopan F en una esponja y una masa de EE.UU. usando harina refinada de Méjico - tipo trigo duro. Los panes se han hinchado todos completamente y después de eso cada pan se ha tratado por choque para evaluar la resistencia al choque y por lo tanto la estabilidad de la masa.

Pruebas de horneado 7230-1

Ensayo	Volumen específico, ccm/g	Volumen chocado, ccm/g
PANODAN 521 al 0,5 %	6,88	5,47
Lipopan F 10 ppm	6,16	5,36
Lipopan F 20 ppm	6,44	5,30
Lipopan F 40 ppm	6,28	5,52
PANODAN 521 al 0,25 %, GRINDAMYL H 640 200 ppm, TS-E 662 100 ppm	7,15	5,74

25 A partir de estos ensayos está claro que el uso de HOX da como resultado una estabilidad de la masa muchísimo mejor y en consecuencia un aumento de volumen.

EJEMPLO 5: Alternativas de ensayo en una masa

30 Para evaluar la influencia de PANODAN® A2020 (un DATEM) así como GRINDAMYL™ SUREBake 800 (una hexosa oxidasa) y combinaciones de los mismos en la estabilidad de la masa, se llevaron a cabo pruebas en el Farinógrafo usando una calidad de harina refinada media convencional.

La siguiente receta/procedimiento se usó en el ensayo:

35 300 g de harina refinada
6 g de sal
20 ppm de ácido ascórbico
Agua de acuerdo con 500 BU (58,0 %)

40 • Mezclar en seco durante 4 min.

En las pruebas de horneado, las combinaciones de DATEM y enzimas se ensayaron y se compararon con el control (es decir, sin ingredientes adicionales).

45 Se obtuvieron los siguientes resultados:

Ensayo	Tiempo de llegada (min)	Desarrollo de la masa (min)	Estabilidad de la masa (min)	Reblandecimiento (BU)
- (Control)	1	2,5	15,6	50

ES 2 554 107 T3

Ensayo	Tiempo de llegada (min)	Desarrollo de la masa (min)	Estabilidad de la masa (min)	Reblandecimiento (BU)
PANODAN® A2020 al 0,4 %	1	2,2	17,7	20
SUREBake800 300 ppm	1	2,9	22,2	20
SUREBake800 150 ppm	1	2,3	22,4	20
PANODAN® A2020 al 0,4 %, SUREBake800 300 ppm	1,5	2,4	33,7	20
PANODAN® A2020 al 0,4 %, SUREBake800 150 ppm	1	2,3	25,0	20

A partir de los resultados puede concluirse que el uso de PANODAN® A2020 solo y GRINDAMYL™ SUREBake 800 solo dan como resultado una estabilidad de la masa aumentada del sistema de la masa y un efecto de reblandecimiento reducido, lo que significa que el sistema de la masa se estabiliza significativamente en comparación con el sistema control. La adición de PANODAN® A2020 y GRINDAMYL™ SUREBake 800 en combinación da como resultado un mayor aumento de la estabilidad de la masa, en comparación con cuando los ingredientes se usaron solos.

EJEMPLO 6: Alternativas de ensayo en los bollos crujientes

Para detectar el efecto de DATEM o la fosfolipasa, la hexosa oxidasa y combinaciones de las mismas en la estabilidad de la masa y del volumen final del pan, se llevaron a cabo pruebas usando una receta de bollo crujiente. En la prueba, el tiempo de fermentación se varió para estresar al sistema.

La siguiente receta/procedimiento se usó para esta prueba de horneado:

Mezcla: Diosna 2 + 5 min (dependiendo de la harina refinada)

Temperatura de la masa: 26 °C

Escala: 1350 g

Reposo: 10 min a 30 °C en una cabina de calentamiento

Moldeado: Fortuna 3/17/7

Hinchado: 45 min, 70 min y 90 min a 34 °C, 85 % de HR.

Horneado: 18 min a 220 °C, 8 segundos de vapor (horno Bago), 7 segundos de vapor (horno Wachtel) (programa 28 MIWE) (0,35 litros de vapor, 15 min a 200 °C, ½ min a 220 °C).

Todas estas pruebas se optimizaron con 100 ppm de GRINDAMYL™ A1000 y 20 ppm de ácido ascórbico.

Ensayo	Volumen específico g/ccm 45 min	Volumen específico g/ccm 70 min	Volumen específico g/ccm 90 min	Propiedades de manejo de la masa después de mezclar
- (Control)	6,27	7,9	8,81	5
PANODAN® A2020 al 0,3 %	7,33	9,14	9,7	6
SUREBake800 150 ppm	6,36	7,79	9,02	6
SUREBake800 300 ppm	6,39	7,91	8,99	7
PANODAN® A2020 al 0,3 %, SUREBake800 150 ppm	7,86	9,3	10,65	6
PANODAN® A2020 al 0,3 %, SUREBake800 300 ppm	7,79	9,16	10,24	7
Lipopan F 30 ppm	7,29	9,07	-	-
Lipopan F 30 ppm, SUREBake800 150 ppm	7,42	9,19	-	-
Lipopan F 20 ppm	5,19	6,79	-	-
Lipopan F 20 ppm, SUREBake800 100 ppm	5,33	7,32	-	-

Las características del manejo de la masa se evaluaron por panaderos en una escala del 1 al 10, donde 10 es lo mejor.

5 Los resultados muestran que a una dosis eficaz el uso de DATEM solo y de las fosfolipasas solas tiene un efecto mayor en el rendimiento del horneado del sistema con respecto al volumen específico cuando se compara con el efecto de la hexosa oxidasa cuando se usa sola. Sin embargo, usando combinaciones de DATEM o fosfolipasa y hexosa oxidasa da como resultado una influencia incluso mayor del volumen específico.

10 Con respecto a las propiedades de manejo de la masa, se observó que tanto DATEM como hexosa oxidasa tienen una influencia positiva en la reducción de la pegajosidad de la masa.

EJEMPLO 7: Alternativas de ensayo en el pan de tostada "Tweedy" - tratado por choque

15 En esta prueba de horneado, DATEM y hexosa oxidasa y combinaciones de las mismas se ensayaron con respecto al efecto en la estabilidad al choque de un sistema de masa de trigo.

La siguiente receta y el procedimiento se usaron para el ensayo:

20 Receta del pan de tostada "Tweedy"

	Harina	3000 g
	Agua	1890 g
	Levadura comprimida	120 g
	Sal	60 g
25	Grasa	15 g
	Ácido ascórbico	20 ppm

30 La harina refinada usada fue harina refinada Ijsvogel™ (obtenible de Meneba, NL)

	Temperatura de la masa:	29 °C (temperatura de la masa - temperatura de la harina refinada + 4 °C = temperatura del agua)
	Mezcla:	55 WH. Vacío 532 KPa (40 cm Hg) (dependiendo de la harina refinada)
	Reposo:	5 min a temperatura ambiente
35	Escala:	900 g
	Reposo:	5 min a temperatura ambiente
	Moldeado:	Glimek: 1:4, 2:3, 3:16, 4:15
	Hinchado:	70 min a 43 °C, 70 % de HR.
40	Horneado:	35 min + 5 min con el vapor abierto a 220 °C en un horno BAGO.

Las pruebas de horneado se optimizaron con 100 ppm de GRINDAMYL™ A1000 y 20 ppm de ácido ascórbico.

45 Las características del manejo de la masa se evaluaron por panaderos en una escala del 1 al 10, donde 10 es lo mejor.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Ensayo	Volumen específico	Volumen del pan tratado por choque	Propiedades de manejo de la masa
- (Control)	4,75	4,22	5
PANODAN® A2020 al 0,3 %	4,97	4,65	6
SUREBake800 300 ppm	4,88	4,35	7
PANODAN® A2020 al 0,3 %, SUREBake800 300 ppm	5,28	4,99	7

50 Los resultados mostraron que el uso de DATEM solo mejora el volumen y las propiedades de manejo de la masa, mientras que el uso de hexosa oxidasa sola tiene un mayor efecto de mejora de las propiedades de la masa. Sin embargo, usar combinaciones de DATEM y hexosa oxidasa da como resultado incluso una mayor influencia de mejora del volumen específico y de las propiedades de manejo de la masa.

55 Conclusión

Basándose en la reología de la masa y en las pruebas de horneado diferentes puede concluirse que el uso tanto de DATEM como de hexosa oxidasa solos da como resultado una estabilidad de la masa y de choque aumentada que puede mejorar incluso más por el uso de combinaciones de los dos productos. Se ven los mismos

resultados/tendencias cuando se usa una fosfolipasa como Lipopan F en lugar de PANODAN® A 2020.

LISTADOS DE SECUENCIAS

5 ID de SEC nº 1:

MRSSLVLFVSAWTALASPIRREVSQDLFNQFNLFAQYSAAAYCGKNNDAPAGTNI TCTGNACPEVEKAD
 ATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIGNLNF DLKEINDI CSGCRGHDGFTSSWR
 SVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQ
 TGGTLYRITHTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWI KSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNI PD I PAH
 LWYFQATDACNAGGFSWRRYRSAESVDKRATMTDAELEK KLN SYVQMDKEYVKNNQARS

ID de SEC nº 2:

10 La ID de SEC nº 2 incluye una o más de las siguientes secuencias:

ID de SEC nº 2a:

MRSSLVLFVSAWTALASPIRREVSQDLFNQFNLFAQYSAAAYCGKNNDAPAGTNI TCTGNACPEVEKAD
 ATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIANLNFWLKKINDI CSGCRGHDGFTSSWR
 SVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQ
 TGGTLYRITHTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWI KSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNI PD I PAH
 LWYFQATDACNAGGFSWRRYRSAESVDKRATMTDAELEK KLN SYVQMDKEYVKNNQARS

15 ID de SEC nº 2b etc.:

Una o más de los siguientes truncamientos (para referencia adicional véase la Figura 5)

Truncamiento de la secuencia N-terminal antes de "↓SPIRR..."

Truncamiento de la secuencia N-terminal antes de "↓EVSQDLFNQFN..."

20 Truncamiento de la secuencia C-terminal después de "...AHLWYFQATDACNAGGF↓"

Truncamiento de la secuencia C-terminal después de "...AHLWYFQATDACNAGGFS↓"

Truncamiento de la secuencia C-terminal después de "...AHLWYFQATDACNAGGFSW↓"

Truncamiento de la secuencia C-terminal después de "...AHLWYFQATDACNAGGFSWR↓"

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para mejorar las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de una masa de harina refinada y/o la calidad del producto producido a partir de la masa, que comprende añadir a la masa una combinación que comprende una oxidorreductasa oxidante de maltosa y un agente emulsionante, en el que el agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha oxidorreductasa oxidante de maltosa es una hexosa oxidorreductasa.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la hexosa oxidorreductasa se aísla de algas rojas.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que dichas algas rojas son *Iridophycus flaccidum*, *Chondrus crispus* o *Euthora cristata*.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la masa de harina refinada comprende harina refinada, agua y al menos un aditivo o ingrediente adicional de la masa.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el al menos un aditivo o ingrediente adicional de la masa se selecciona del grupo que consiste en un aceite vegetal, una grasa vegetal, una grasa animal, manteca, nata, glicerol y grasa láctea.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que dicho al menos un aditivo o ingrediente adicional de la masa está presente en una cantidad del 1 al 5 % en peso de un componente de harina refinada de la masa.
- 35 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que la masa de harina refinada comprende una harina refinada de fuerza.
- 40 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el producto es un producto de pan.
- 45 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que al menos una enzima adicional se añade a los ingredientes de la masa, a los aditivos de la masa o a la masa.
- 50 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la al menos una enzima adicional se selecciona del grupo que consiste en una xilanasa, una celulasa, una hemicelulasa, una enzima degradante de almidón, una proteasa, una lipoxigenasa, una oxidorreductasa y una lipasa.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11 en el que la al menos una enzima adicional es al menos una xilanasa y/o al menos una amilasa.
- 60 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en el que dicha masa de harina refinada comprende un emulsionante adicional.
- 65 14. Una composición de mejora de la masa que comprende una oxidorreductasa oxidante de maltosa y un agente emulsionante en la que el agente emulsionante es una lipasa y en la que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.
15. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 14 en la que dicha oxidorreductasa oxidante de maltosa es una hexosa oxidorreductasa.
16. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 15 en la que la oxidorreductasa oxidante de maltosa se aísla de algas rojas.
17. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 16 en la que dichas algas rojas son *Iridophycus flaccidum*, *Chondrus crispus* o *Euthora cristata*.
18. La composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 en la que la composición de mejora de la masa comprende al menos un aditivo o ingrediente adicional de la masa.
19. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 18 en la que el al menos un aditivo o ingrediente de la masa adicional se selecciona del grupo que consiste en un aceite vegetal, una grasa vegetal, una grasa animal, manteca, nata, glicerol y grasa láctea.

20. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 19 en la que dicho al menos un aditivo o ingrediente adicional de la masa está presente en una cantidad del 1 al 5 % en peso de un componente de harina refinada de la masa.
- 5 21. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 18 en la que el al menos un aditivo o ingrediente adicional de la masa es una harina refinada de trigo de fuerza,
22. La composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21 en la que al menos una enzima adicional se añade a los ingredientes de la masa, a los aditivos de la masa o a la masa.
- 10 23. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 22 en la que la al menos una enzima adicional se selecciona del grupo que consiste en una xilanasas, una celulasa, una hemicelulasa, una enzima degradante de almidón, una proteasa, una lipoxigenasa, una oxidorreductasa y una lipasa.
- 15 24. La composición de mejora de la masa de acuerdo con la reivindicación 21 en la que el al menos un aditivo o ingrediente adicional de la masa es al menos una xilanasas y/o al menos una amilasa.
- 20 25. Uso de la composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 en panadería.
26. Uso de la composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24 en el que dicha composición mejora las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de la masa de harina refinada.
- 25 27. Uso de la composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24 en el que dicha composición mejora el volumen de un producto horneado hecho a partir de una masa de harina refinada.
- 30 28. Uso de la composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24 en la fabricación de un producto hecho a partir de la masa en el que el producto es un producto de pan.
- 35 29. Uso de una combinación que comprende una oxidorreductasa oxidante de maltosa y un agente emulsionante en la fabricación de una masa en el que dicha combinación mejora las propiedades reológicas y/o de capacidad de mecanización de la masa y/o la calidad de un producto producido a partir de la masa en el que dicho agente emulsionante es una lipasa y en el que dicha lipasa es una enzima lipolítica purificada de *Fusarium oxysporum* producida por fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente.
- 40 30. Un proceso para producir la composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 que comprende añadir a uno o dos de los componentes de dicha composición de mejora de la masa dos o uno de los otros componentes, respectivamente.
31. Un producto horneado o una masa obtenidos de la composición de mejora de la masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24.

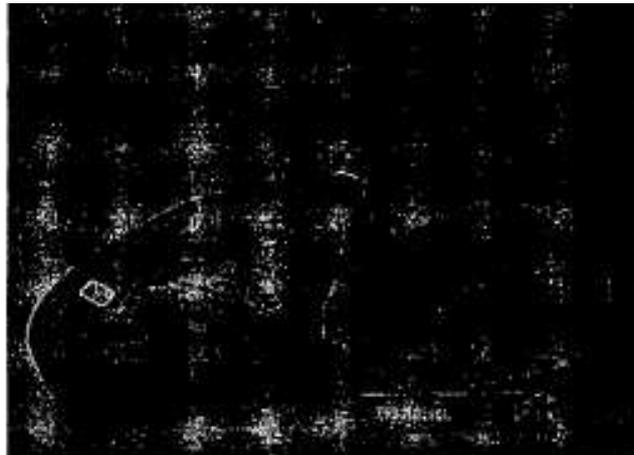


Figura 1: 7,5 ppm de Lipopan F y 60 ppm de TS-E 680



5
Figura 2: 40 ppm de Lipopan F



Figura 3: 100 ppm de TS-E 861

Figura 4

ID de SEC nº 1

MRSSLVLFVSAWTALASPIRREVSQDLFNQFNLFQAQYSAAAYCGKNNAPAGTNI TCTGNACPEVEKAD
ATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLI VLSFRGSRSIENWIGNLNFDLKEINDICSGCRGHDGFTSSWR
SVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQ
TGGTLYRITHTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWI KSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNI PDI PAH
LWYFQATDACNAGGF SWRRYRSAESVDKRATMTDAELEKKLNSYVQMDKEYVKNNQARS

Figura 5

ID de SEC nº 2a

MRSSLVLFVSAWTALA'SPIRR'EVSQDLFNQFNLFQAQYSAAAYCGKNNAPAGTNI TCTGNACPEVEKAD
ATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLI VLSFRGSRSIENWIANLNFWLKKINDICSGCRGHDGFTSSWR
SVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQ
TGGTLYRITHTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWI KSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNI PDI PAH
LWYFQATDACNAGGF'S'W'R'RYRSAESVDKRATMTDAELEKKLNSYVQMDKEYVKNNQARS