(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 631 913**

(51) Int. CI.:

A21D 13/00 (2007.01)
A21D 8/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2009 PCT/EP2009/055819**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO09138447**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 09745779 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2293674**

(54) Título: **Método y composición para mejorar la facilidad de masticación de los productos de panadería**

(30) Prioridad:

16.05.2008 EP 08156398

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.09.2017

(73) Titular/es:

PURATOS N.V. (100.0%)
Industrialaan 25
1702 Groot-Bijgaarden, BE

(72) Inventor/es:

VAN WINCKEL, BRUNO y
VERTE, FABIENNE

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Método y composición para mejorar la facilidad de masticación de los productos de panadería

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la mejora de los parámetros de facilidad de masticación y textura de los productos de panadería.

Antecedentes de la invención

Los consumidores prefieren comprar pan fresco y desean que se mantenga fresco durante mucho tiempo. Los consumidores también prefieren comprar panes con el nivel más bajo posible de aditivos (etiquetados).

Los aditivos de mejora del pan y/o de la masa se añaden a la masa en el proceso de fabricación del pan con el fin de mejorar la textura, el volumen, el sabor y la frescura del pan, así como de mejorar la maquinabilidad y la estabilidad de la masa.

Estado de la técnica

Los emulsionantes sirven para mejorar la extensibilidad de la masa y también pueden ser de algún valor para la consistencia del pan resultante.

La patente EP0776604 describe el uso de monoglicéridos insaturados para producir panecillos de pan crujientes aptos para el microondas que son fáciles de masticar. Sin embargo, en dicho documento, no se cuantifica la facilidad de masticación.

Una de las desventajas de dichos productos es que, en Europa, la adición de emulsionantes y de otros aditivos tales como monoglicéridos requiere un etiquetado específico de los productos de panadería con un número E. Al contrario que los monoglicéridos y/o los emulsionantes, la adición de proteasa en el pan no requiere dicho etiquetado específico.

Las proteasas pueden añadirse a una baja cantidad en comparación con los aditivos, preservando el sabor y otras propiedades organolépticas del pan.

Las proteasas tienen una larga historia de uso en el sector de la panadería. En panadería, se utilizan principalmente para reducir los requisitos mecánicos de manejo de la masa del gluten inusualmente fuerte o duro. Reducen la consistencia de la masa, disminuyendo el valor del harinógrafo. Reducen la viscosidad y aumentan la extensibilidad de la masa. En el producto final mejoran el volumen del pan y el color del pan. Además, se puede mejorar el sabor mediante la producción de determinados péptidos. Las proteasas suavizan el gluten enzimáticamente y no mecánicamente. Tras el horneado, se cree que las proteasas se inactivan.

Las proteasas que más se utilizan en panadería proceden de *Aspergillus oryzae* y de *Bacillus subtilis*. Las proteasas bacterianas neutras son mucho más activas sobre el gluten que las proteasas alcalinas. La papaína, la bromelaína y la ficina son tiol(cisteína)-proteasas extraídas de la papaya, de la piña y de los higos. En especial, la papaína es muy reactiva a las proteínas del gluten. Las proteasas bacterianas y la papaína, en especial, las proteasas neutras, se utilizan en galletas, colines y galletitas saladas, en los que se desea un ablandamiento de la masa. Sin embargo, en la fabricación del pan, se prefiere una hidrólisis más moderada de las proteasas fúngicas. La patente EP-B-1496748 (correspondiente a las solicitudes de patente EP 1 790 230 y EP 1 350 432) desvela el uso de proteasas termoestables intermedias o termoestables para la prevención o el retraso del endurecimiento durante el proceso de horneado de los productos de panadería. Este efecto es especialmente notable en combinación con otras enzimas antienducrecimiento (como las amilasas termoestables de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus stearothermophilus*, y las amilasas maltogénicas termoestables). El documento WO 2005/077194 desvela productos de masa laminada tales como croissants y el uso de una proteasa aplicada en su superficie externa para mejorar su carácter crujiente tras el horneado. El documento WO 2005/077192 desvela un método de preparación de una masa de pan o un pan horneado parcialmente, excluyendo los productos horneados de masa laminada, que comprende la etapa de aplicar una proteasa en su superficie exterior para mejorar su carácter crujiente durante más tiempo tras el horneado. Sai Manohar y P. haridas Rao (1997) *Adv. Food Sci,* Vol. 19, 15-21 desvela los efectos de la α-amilasa y la proteasa en varias características de los bizcochos.

Las proteasas también adolecen de algunas desventajas cuando se utilizan en el horneado. La acción de las proteasas no se limita en el tiempo, pues puede continuar tras la mezcla. Esto puede aumentar el riesgo de debilitamiento de la masa y aumentar la pegajosidad de la masa. A veces, su acción se ve incluso potenciada por la caída del pH durante la fermentación.

El uso de proteasas en el horneado requiere el control estricto de las condiciones de fermentación a granel y de fermentación de la masa. Las proteasas se inactivan durante el horneado (Kruger, J. E. (1987) “Enzymes and their role in cereal technology” AACC 290-304). En especial, las proteasas neutras de *Bacillus* y la papaína deben dosificarse muy cuidadosamente, debido a que las sobredosis ablandan la masa en exceso. Esto puede hacer que la masa se deshaga antes del horneado o reducir el volumen del pan y producir una estructura más abierta de la miga. En Europa, donde las harinas son más débiles que en Estados Unidos o en Canadá, el riesgo de sobredosis de la proteasa se encuentra especialmente presente.

Además, las proteasas también aumentan la pegajosidad de la masa, porque la acción hidrolítica provoca la liberación del agua del gluten (Schwimmer, S. (1981) “Source book of food enzymology” - AVI Publishing, 583-584). Ello implica que, en la práctica, las proteasas no se usen mucho en panadería en Europa.

Las proteasas fúngicas son sensibles a las altas temperaturas. Algunas proteasas bacterianas neutras y alcalinas son resistentes a tratamientos térmicos superiores. Las proteasas termoestables neutras de *Bacillus*, que pueden ser tolerantes a los agentes oxidantes, se prefieren en las formulaciones de detergente. Además, las proteasas termoestables alcalinas de *Bacillus* se utilizaron en formulaciones de lavado y de detergentes. Las proteasas termoestables alcalinas de *Bacillus* también se utilizan en las formulaciones de lavado y de detergentes.

La papaína es muy estable al calor y requiere un calentamiento prolongado a una temperatura entre 90 ºC y 100 ºC para desactivarse. La bromelaína es menos estable y se desactiva a aproximadamente 70 ºC. Otras proteasas estables al calor son producidas por *Bacillus licheniformis* NS70 (“Chemical Abstracts”, 127, 4144 CA), *Bacillus licheniformis* MIR 29 (“Chemical Abstracts”, 116, 146805 CA), *Bacillus stearothermophilus* (“Chemical Abstracts”, 124, 224587 CA), *Nocardiopsis* (“Chemical Abstracts”, 114, 162444 CA) y *Thermobacteroides* (“Chemical Abstracts”, 116, 146805 CA). No se trata de una lista exhaustiva, sino que ilustra la importancia de las proteasas termoestables y su aplicación, principalmente en detergentes.

Objetivos de la invención

La presente invención proporciona un uso para mejorar las propiedades de facilidad de masticación de un producto de panadería sin las desventajas de las proteasas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las proteasas que tienen una temperatura óptima próxima a la temperatura ambiente debilitan el gluten durante el amasado y la fermentación de la masa y/o producen cambios en las propiedades de la reología de la masa.

Sumario de la invención

La invención se refiere al uso de al menos una serina o una metaloproteasa termoestable intermedia o termoestable para mejorar la facilidad de masticación de un producto de panadería, en el que se miden los parámetros de textura que consisten en la fuerza (g) y el trabajo total (g.s) necesarios para romper una muestra idéntica de producto de panadería, en el que tanto la fuerza (g) como el trabajo total (g.s) se mejoran en al menos un 10 % con respecto a una muestra idéntica, pero que no contiene al menos una serina o una metaloproteasa termoestable intermedia o termoestable, y en el que la proporción entre la actividad de la proteasa a la temperatura óptima y la actividad de la proteasa a 25 ºC es superior a 10.

De acuerdo con la invención, los parámetros de textura que consisten en la fuerza (g) y el trabajo total (g.s) necesarios para romper una muestra idéntica de producto de panadería se miden, por ejemplo, con un dispositivo analizador de la textura, utilizado para romper dicho producto de panadería.

De forma ventajosa, ambos parámetros de textura se miden simultáneamente mediante un analizador de la textura como se usa clásicamente para medir la textura del pan, tal como, por ejemplo, un analizador TA-XT2™.

En el método de la invención, la facilidad de masticación por muestra de producto de panadería también puede ser estimada por un panel de catadores.

Ventajosamente, en el uso de acuerdo con la invención, la proteasa termoestable intermedia y/o termoestable tiene una temperatura de actividad óptima superior a 60 ºC, preferentemente superior a 70 ºC, más preferentemente superior a 80 ºC.

En el uso de acuerdo con la invención, la proporción entre la actividad de la proteasa a la temperatura óptima y la actividad de la proteasa a 25 ºC es superior a 10, preferentemente superior a 15.

Ventajosamente, las proteasas de acuerdo con la invención no muestran ningún efecto adverso en la reología de la masa, en la estructura de la miga ni en el volumen del producto de panadería resultante.

En el uso de acuerdo con la invención, las proteasas se obtienen preferentemente mediante la extracción de organismos eucariotas o procariotas naturales, mediante síntesis o mediante ingeniería genética.

Preferentemente, la proteasa es una proteasa neutra o alcalina.

La proteasa puede ser una proteasa de *Thermus aquaticus* (Taq), preferentemente aislada de *Thermus aquaticus* LMG8924, preferentemente aqualisina I, termitasa, aislada de *Thermoactinomyces vulgaris*, termolisina, aislada de *Bacillus thermoproteolyticus,* o subtilisina, aislada de *Bacillus licheniformis*.

La invención puede aplicarse a productos de panadería blandos tales como pan, panecillos blandos, donuts, bollos, bollos aptos para microondas, repostería danesa, panecillos para hamburguesa, pan de pizza y de pita, y pasteles.

Las proteasas se añaden preferentemente a la harina en de 5.000 a 7.500 unidades/100 kg de harina de Termitasa, de 0,35 a 0,7 unidades/100 kg de harina de Termolisina, de 0,35 a 0,7 unidades/100 kg de harina de Subtilisina o de 230 a 10.400 unidades/100 kg de harina de proteasa Taq, preferentemente de 350 a 700 unidades/100 kg de harina de proteasa Taq.

La invención se puede aplicar a productos crujientes tales como baguettes y panecillos.

La proteasa Taq se añade preferentemente a la harina de productos crujientes en de 1.300 a 10.400 unidades/100 kg de harina de proteasa Taq.

Ventajosamente, las proteasas para su uso en el presente documento se añaden al producto de panadería antes de formarse la masa; preferentemente, las proteasas se añaden a la harina; más preferentemente, las proteasas se añaden a una mezcla que comprende vehículos apropiados normalmente utilizados en aplicaciones de panadería y/o principios activos y/o aditivos de horneado utilizados convencionalmente.

A la proteasa de la invención, se pueden añadir uno o más ingredientes para hornear tales como oxidantes (vitamina C o azodicarbonamida), emulsionantes (mono- o di-glicéridos, ésteres de diacetil-tartrato de monoglicéridos, estearoil-lactilatos de sodio, ésteres de azúcares de ácidos grasos, lecitina; azúcar y/o sal, grasa y/o aceite.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 ilustra el analizador de la textura TA-XT2™ (Stable Micro Systems UK). La Fig. 1a es un gráfico típico que muestra la fuerza aplicada por el analizador sobre una muestra de producto de panadería en función del tiempo; la Fig. 1b muestra el dispositivo y su acción al romperse un pan.
La Fig. 2 muestra la actividad relativa de varias proteasas en función de la temperatura. Fig. 2a: proteasa Taq, Fig. 2b, Subtilisina, Fig. 2c, Termitasa.

Descripción detallada de la invención

Los productos blandos desvelados en el presente documento presentan una corteza blanda, incluyendo, entre otros, todos los productos de panadería envasados y productos dulces (envasados o sin envasar). Su vida útil puede variar de 2 días a varios meses. Su contenido de grasa y azúcar varía del 0 % a más del 30 % cada uno. Son ejemplos no limitantes de productos blandos el pan, los panecillos blandos, los donuts, los bollos, los bollos aptos para microondas, la repostería danesa, los panecillos para hamburguesa, el pan de pizza y de pita, y los pasteles.

Los productos crujientes tienen una corteza crujiente. Su contenido de grasa como de azúcar es inferior al 2 %. Normalmente, están sin envasar o envueltos con envases de papel. Su vida útil es de aproximadamente 2 días como máximo. Son ejemplos no limitantes de productos crujientes las baguettes y los panecillos.

Las elecciones de los consumidores vienen dictadas por las propiedades organolépticas, que engloban características tales como la textura en boca y dureza.

La textura en boca puede influir en la percepción de la frescura por parte de los consumidores y está muy relacionada con parámetros como la humedad, la fusión y la facilidad de masticación.

La sensación de humedad está estrechamente correlacionada con la frescura y el endurecimiento de la miga. Sin embargo, la humedad excesiva produce pegajosidad.

La fusión refleja el tiempo y la facilidad para tragar un bolo de pan. La fusión se mejora con una humedad inicial suficiente, seguida de una facilidad de masticación y de la ausencia de formación de bolas al masticar.

La facilidad de masticación, que también se emplea a veces como antónimo de correosidad y/o dureza, se usa para designar la fuerza y el trabajo total necesarios para romper una muestra de producto de panadería y/o el número de veces que hay que masticar para triturar una muestra similar hasta obtenerse una consistencia que facilite su deglución. La facilidad de masticación puede ser fácilmente medida por paneles de catadores, y se puede cuantificar razonablemente usando una escala arbitraria de facilidad de masticación. Dichas técnicas son bien conocidas en la industria alimentaria y se denominan, en general, ensayo organoléptico.

Para familiarizar a los panelistas con la selección de los productos que se ensayarán, se organiza una sesión de capacitación inicial. En esta sesión, se presentan las normas de referencia para enseñar a los panelistas a reconocer las diferencias entre los atributos del producto que se van a medir.

La facilidad de masticación estimada por los peneles de catadores se puede comparar con los valores medidos por un analizador de la textura.

Un analizador de textura preferido es TA-XT2™ (Stable Micro Systems UK, Fig. 1).

Las proteasas termoestables intermedias y/o termoestables tienen una baja actividad a una temperatura de 25 ºC a 40 ºC y una temperatura óptima de 60 a 80 ºC o superior (véase la Fig. 2). La enzima puede necesitar o no necesitar activarse durante el proceso de horneado y, preferentemente, perder su actividad al final del proceso de horneado.

Las proteasas termoestables intermedias y/o termoestables pueden ser producidas por microorganismos ya sea procariotas (bacterias, arqueas) y eucariotas (hongos) o extraerse de las plantas.

Las proteasas de acuerdo con la invención son aquellas que, a un pH en el que la enzima es estable, tienen un óptimo de temperatura que es superior a 60 ºC, preferentemente superior a 70 ºC e incluso más preferentemente superior a 80 ºC.

La proporción entre su actividad a la temperatura óptima y a 25 ºC es al menos superior a 10.

Muestran una ausencia de efectos adversos en la reología de la masa (tal como el debilitamiento de la estructura de la masa), en la estructura de la miga (tal como el aspecto de una estructura de miga abierta) y en el volumen (tal como una disminución del volumen) del pan resultante.

La elección de la proteasa es muy importante. La proteasa no debe ejercer ningún efecto adverso tal como el debilitamiento de la masa durante la mezcla de los ingredientes de la masa y la subsiguiente fermentación de la masa. De hecho, en este caso la dosis permitida de proteasas inadecuadas sería demasiado baja para tener un efecto pronunciado sobre la textura en boca.

La/s proteasa/s se pueden añadir en una composición que contenga otras enzimas como amilasa y/o xilanasa y/o lipasa y/o glucosa oxidasa y/o lipoxigenasa y/o peroxidasa y/o carbohidrato oxidasa.

La composición de mejora de la masa y/o mejora del pan puede contener una combinación de aditivos de horneado utilizados convencionalmente como: gluten y/o oxidantes como la vitamina C o la azodicarbonamida y/o emulsionantes como mono- o di-glicéridos, ésteres de diacetil-tartrato de monoglicéridos, estearoil-lactilatos de sodio, ésteres de azúcar de ácidos grasos, lecitina y/o azúcar y/o sal y/o grasa y/o aceite.

Estas mezclas de principios activos que incluyen la proteasa de acuerdo con la invención y/u otras enzimas distintas de la proteasa de acuerdo con la invención y/o aditivos de horneado pueden diluirse mediante vehículos apropiados normalmente utilizados en aplicaciones de panadería como harina de trigo, harina de centeno, almidón, agua o aceite, para obtenerse un nivel de dosificación apropiado para mezclarse en masas para las propiedades de horneado.

Las mezclas pueden estar en forma de polvo, granulada, aglomerada o líquida.

Por lo general, la proteasa se añade al producto de panadería antes de formar la masa. Preferentemente, la proteasa se añade a la harina. Más preferentemente, la proteasa se añade a una mezcla que comprende vehículos apropiados normalmente utilizados en aplicaciones de panadería y/o principios activos y/o aditivos de horneado utilizados convencionalmente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Visión de conjunto de las proteasas termoestables o intermedias utilizadas y de su origen

Las proteasas se pueden obtener de una especie productora (eucariota o procariota) utilizando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, el preparado de proteasa puede obtenerse por fermentación de un microorganismo y el posterior aislamiento del preparado que contiene proteasa del caldo resultante mediante métodos conocidos en la técnica tales como centrifugación, ultrafiltración o cromatografía. Las proteasas también se pueden obtener clonando la secuencia de ADN que codifica una proteasa adecuada en un organismo hospedador, expresando la proteasa intra- o extracelularmente y recogiendo la enzima producida.

Las proteasas también pueden obtenerse mediante la evolución dirigida o la transposición de genes de proteasas o enzimas termoestables o no termoestables y la posterior expresión como se ha mencionado anteriormente. Siempre que tengan una actividad de escisión de enlace/s peptídico/s, se considera que son proteasas en el alcance de la

presente invención. A continuación, se mencionan ejemplos no limitantes de proteasas para su uso en los siguientes ejemplos, y su origen preferido.

Proteasa	Especie	Origen	T opt
Proteasa Taq	*Thermus aquaticus*	Fermentación según lo descrito anteriormente	80 ºC
Termitasa	*Thermoactinomyces vulgaris*	Fermentación según lo descrito en el documento EP1496748	70 ºC
Termolisina	*Bacillus thermoproteolyticus*	Sigma-Aldrich	70 ºC
Subtilisina	*Bacillus licheniformis*	Sigma-Aldrich	65 ºC
Papaína(*)	Papaya	Sigma-Aldrich	70 ºC
(*) No de acuerdo con la presente invención			

Ejemplo 2: Efecto de la proteasa de Thermus aquaticus (Taq), Termitasa, Termolisina, Papaína y Subtilisina en el tiempo de fermentación, la humedad del pan y el volumen específico del pan

La adición de cualquiera de las enzimas a la masa a la dosis especificada en los siguientes ejemplos no cambia el tiempo de fermentación, la humedad del pan ni el volumen específico del pan. El contenido de humedad inicial varía ligeramente, pero todos los bollos perdieron aproximadamente la misma cantidad de humedad durante los seis días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Ejemplo 3: Aislamiento de proteasa Taq

Una de las proteasas preferidas utilizadas se obtiene cultivando la cepa de *Thermus aquaticus* LMG 8924 en el siguiente medio (en agua destilada): 1 g/l de triptona; 1 g/l de extracto de levadura y 100 ml/l de solución salina. El pH se ajusta a 8,2 con NaOH 1 M antes de la esterilización a 121 ºC durante 15 minutos. La solución salina tiene la siguiente composición (en agua destilada): 1 g/l de ácido nitriloacético; 0,6 g/l de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$; 1 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 80 mg/l de NaCl, 1,03 g/l de KNO_3; 6,89 g/l de $NaNO_3$; 2,8 g/l de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 10 ml/l de solución de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (47 mg/100 ml de dH_2O); 10 ml/l de solución de oligoelementos. La solución de oligoelementos tiene la siguiente composición (en agua destilada): 0,5 g/l de H_2SO_4; 1,7 g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,5 g/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g/l de H_3BO_3; 25 mg/l de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 25 mg/l de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 46 mg/l de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. La incubación se realiza a 60 ºC con aireación (pO_2 al 60 %, 4 vvm) durante 24 horas después de lo que se recoge el medio para una concentración adicional.

Thermus aquaticus LMG 8924 produjo al menos dos proteasas extracelulares. Una de las proteasas extracelulares es la acualisina I, y es una proteasa alcalina que se secreta linealmente desde la fase estacionaria inicial hasta que las células dejan de crecer. La temperatura óptima de la actividad proteolítica está entre 70 y 80 ºC. Otra proteasa extracelular es la aqualisina, y es una proteasa neutra, cuya producción aparece a partir del día 4 y su concentración aumenta linealmente durante 5 días. En esa etapa, la actividad máxima se obtiene a 95 ºC (la temperatura más alta ensayada).

Para preparar muestras de acualisina I (de acuerdo con la presente invención, denominada "proteasa Taq") para los ensayos de horneado, el extracto de fermentación se usa después de 1 día de fermentación, es decir, cuando no se ha producido nada de o poca acualisina II. A continuación, se concentra el sobrenadante de la fermentación mediante ultrafiltración en membrana (límite molecular de 10.000 Da). La proteasa Taq es esencialmente acualisina I, y puede comprender cantidades bajas de acualisina II. La solución de proteasa Taq en bruto se almacena congelada hasta que se usa en los ensayos de horneado.

La solución de proteasa Taq muestra una actividad máxima a una temperatura de 80 ºC. Casi no hay pérdida de actividad enzimática mientras se calienta la solución durante una hora a 80 ºC. El calentamiento de la enzima a 90 ºC durante 10 min reduce la actividad en un 60 %.

Se mide la actividad de la proteasa en la caseína reticulada con azurina (AZCL-caseína). Se prepara tiñendo y reticulando la caseína para producir un material que se hidrata en agua, pero que no es hidrosoluble. La hidrólisis por proteasas produce fragmentos teñidos hidrosolubles, y la velocidad de liberación de estos (aumento de la absorbancia a 590 nm) puede ser directamente proporcional a la actividad enzimática (Comprimidos Protazyme AK, Megazyme, Irlanda). Se incuba un comprimido protazyme AK en $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 100 mM; pH 7,0 a 60 ºC durante 5 min. Se añade una alícuota de enzima (1,0 ml) y se deja que la reacción continúe durante exactamente 10 min. Se termina la reacción mediante la adición de fosfato trisódico (10 ml, 2 % p/v, pH 12,3). Se deja reposar el tubo durante aprox. 2 min a temperatura ambiente y se filtra su contenido. Se mide la absorbancia del filtrado a 590 nm contra un blanco de sustrato. La actividad se expresa como:

$$mU/ml = (34{,}2 * (Abs_{590} \text{ de la enzima} - Abs_{590} \text{ del blanco}) + 0{,}6) / \text{dilución}$$

La actividad enzimática también se puede medir con otros ensayos para determinar la actividad de la proteasa conocidos por los expertos en la materia. Entre ellos, está el método colorimétrico en el que se usa caseína como sustrato, seguida de la detección de los aminoácidos liberados con el reactivo de fenol de Folin y Ciocalteu.

Ejemplo 4: Ensayos de bollos blandos

El ensayo de horneado convencional para bollos blandos se realiza de la siguiente manera. La receta básica es (en gramos):

Harina de trigo (Duo)	2.000
Agua	940
Levadura fresca (Bruggeman, Bélgica)	160
Cloruro sódico	34
Aceite de palma parcialmente hidrogenado	65
Azúcar (sacarosa)	160
Ácido ascórbico	0,08

Se mezclan los ingredientes durante 2 min a baja velocidad y durante 7 min a alta velocidad en un mezclador de espiral de tipo Diosna (SP24). La temperatura final de la masa es de 27 ºC. Se redondean 1.200 g de masa y se fermentan durante 20 minutos a una temperatura de panadería (25 ºC) y humedad (50-55 %). Se preparan trozos de 40 g de masa utilizando el moldeador Rotamat. Se fermentan estas piezas de masa a 35 ºC durante 60 minutos a 95 % de humedad relativa en una caja de fermentación Koma. Se hornean los bollos a 215 ºC durante 9 minutos en un horno WP sin vapor. Es evidente para un experto en la materia que se pueden obtener los mismos resultados finales utilizando equipos de otros proveedores.

El panel de expertos marca los productos de acuerdo con una referencia en una escala lineal de 0 a 5 puntos, siendo el 0 el extremo inferior (correoso) y 5 el extremo superior (se deshace fácilmente). Se descartan las evaluaciones de los panelistas que son significativamente diferentes de las de los otros panelistas.

Además, un analizador de textura TA-XT2™ dotado de un dispositivo de tracción para pizzas utilizado a una velocidad de 20 mm/s permite medir los siguientes parámetros: la fuerza (fuerza máxima necesaria para romper el bollo expresada en gramos (g)) y el trabajo total (el trabajo total necesario para romper el bollo expresado en g.s y representado por la superficie bajo la curva del gráfico generado por el aparato, véase la Fig. 1). Como los factores tales como el lote de harina, la temperatura ambiente y la humedad, así como el tiempo entre el horneado y el ensayo pueden afectar a dichos parámetros, las medidas se comparan con una referencia utilizando los mismos ingredientes, y se hornean y se ensayan en paralelo. Se han obtenido comparaciones similares a las referencias utilizando varios lotes de harina, a temperatura y humedad diferentes, y de uno a varios días después del horneado, por tanto, las siguientes características mencionadas no son limitantes de la invención.

Para ser eficaz en la textura en boca y, en especial, en la facilidad de masticación, los aditivos deben al menos reducir la fuerza máxima en un 10 % y el trabajo total en un 10 %. Dicha diferencia es percibida repetidamente por un grupo de catadores.

Ejemplo 5: Validación de las mediciones de la facilidad de masticación de acuerdo con el grupo de catadores y relación con los parámetros de textura: efectos de los monoglicéridos en la facilidad de masticación en bollos blandos (de acuerdo con el estado de la técnica)

Se hornearon los bollos de acuerdo con el método anteriormente mencionado con la adición de monoglicéridos insaturados (Multex Mono 9202 mpw producidos por Beldem, Bélgica). Se midieron la fuerza y el trabajo total 1 día después del horneado con el analizador de la textura, y la facilidad de masticación la estimó un grupo de catadores como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1:

	Fuerza máxima G	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia	565	921	0
500 g* de monoglicéridos	491	726	4
* por 100 kg de harina			

En comparación con la referencia, la adición de monoglicéridos mejora la facilidad de masticación según lo estimado por un panel de expertos, y reduce la fuerza y el trabajo total en más del 10 %.

Existe una relación (inversa) entre la fuerza máxima y el trabajo total con la percepción sensorial de la facilidad de masticación.

Ejemplo 6: Efecto de la dosis de proteasa Taq en la facilidad de masticación en bollos blandos y relación con los parámetros de textura

Se hornearon los bollos de acuerdo con el método anteriormente mencionado con la adición de diferentes concentraciones de proteasa Taq (0 U = Referencia).

El efecto de las proteasas añadidas a productos de panadería en la facilidad de masticación puede ser medido por un grupo de catadores, preferentemente expertos, utilizando bollos blandos horneados de acuerdo con el Ejemplo 5, y un analizador de la textura.

La facilidad de masticación fue estimada por un panel de catadores, y la fuerza y el trabajo total se midieron 1 día después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

	Fuerza máxima G	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia (0 U)*	514	924	0
230 U* de proteasa Taq	462	831	2
690 U* de proteasa Taq	445	773	4
1.150 U* de proteasa Taq	462	790	4
* expresadas como unidades añadidas a 100 kg de harina			

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que, en comparación con el bollo de referencia a todas las dosis ensayadas, la adición de proteasa Taq mejora la facilidad de masticación, tanto como los resultados obtenidos con los monoglicéridos utilizados de acuerdo con el estado de la técnica, y produce una reducción de la fuerza y del trabajo total en al menos un 10 %.

Ejemplo 7: Efecto de la proteasa Taq y la termitasa en la facilidad de masticación en bollos blandos y relación con los parámetros de textura

Se hornearon los bollos de acuerdo con el método anteriormente mencionado con la adición de diferentes concentraciones de termitasa o proteasa Taq. La facilidad de masticación fue estimada por un grupo de catadores, y la fuerza y el trabajo total se midieron 1 día después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

	Fuerza g	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia (0 U*)	549	825	0
800 U* de proteasa Taq	452	693	4
1.600 U* de proteasa Taq	421	696	4
5.000 U* de termitasa	429	634	5
7.500 U* de termitasa	405	623	5
* expresadas como unidades añadidas a 100 kg de harina			

En comparación con el bollo de referencia, a todas las dosis ensayadas, la proteasa Taq y la termitasa mejoran la facilidad de masticación y producen una reducción de la fuerza y del trabajo total en al menos un 10 %.

Ejemplo 8: Efecto de la proteasa Taq, la termolisina y la subtilisina en la facilidad de masticación en bollos blandos y relación con los parámetros de textura

Se hornearon los bollos de acuerdo con el método anteriormente mencionado con la adición de diferentes concentraciones de proteasa Taq, termolisina y subtilisina. La facilidad de masticación fue estimada por un grupo de catadores, y la fuerza y el trabajo total se midieron 1 día después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

	Fuerza máxima g	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia (0 U*)	762	1.102	0
345 U* de proteasa Taq	594	765	4
690 U* de proteasa Taq	525	713	4
0,35 U* de termolisina	595	969	2
0,7 U* de termolisina	592	920	2
0,35 U* de subtilisina	558	898	2
0,7 U* de subtilisina	553	973	2
* expresadas como unidades añadidas a 100 kg de harina			

En comparación con los bollos de referencia, a todas las dosis ensayadas, la proteasa Taq, la termolisina y la subtilisina mejoran la facilidad de masticación y producen una reducción de la fuerza y del trabajo total en al menos un 10 %.

Ejemplo comparativo 1: Efecto de la proteasa Taq y la amilasa maltogénica en la facilidad de masticación en bollos blandos y relación con los parámetros de textura

Se hornearon los bollos de acuerdo con el método anteriormente mencionado con la adición de diferentes concentraciones de proteasa Taq, Novamyl® (Novozymes) y alfa-amilasa maltogénica bien conocida por su efecto en la blandura del pan. La facilidad de masticación fue estimada por un grupo de catadores, y la fuerza y el trabajo total se midieron 1 día después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

	Fuerza máxima g	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia (0 U)*	730	1.058	0
230 U* de proteasa Taq	652	839	2
460 U* de proteasa Taq	538	711	4
2,5 g* de Novamyl	571	1.051	0
5 g* de Novamyl	573	1.067	0
8 g* de Novamyl	579	1.100	0
10 g* de Novamyl	568	1.052	0
* expresadas como unidades añadidas a 100 kg de harina			

En comparación con los bollos de referencia, solo la adición de proteasa Taq mejora la facilidad de masticación y produce una reducción de la fuerza y del trabajo total en al menos un 10 %. Se confirmó la ausencia de efecto sobre los parámetros de la textura y la facilidad de masticación de otra amilasa, la Ban 800 (Novozymes) utilizando los mismos métodos.

Ejemplo comparativo 2: Efecto de la proteasa Taq y de la papaína en la facilidad de masticación en bollos blandos y relación con los parámetros de textura

Se hornearon los bollos de acuerdo con el método anteriormente mencionado con la adición de diferentes concentraciones de proteasa Taq y de papaína. La facilidad de masticación fue estimada por un grupo de catadores, y la fuerza y el trabajo total se midieron 1 día después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

	Fuerza máxima g	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia (0 U*)	549	825	0
350 U* de proteasa Taq	452	693	4
700 U* de proteasa Taq	421	696	4
0,3 g* de papaína	514	870	0
0,5 g* de papaína	502	919	0
* expresadas como unidades añadidas a 100 kg de harina			

En comparación con los bollos de referencia, solo la proteasa Taq mejora la facilidad de masticación y produce una reducción de la fuerza y del trabajo total en al menos un 10 %.

Ejemplo 9: Efecto de la proteasa Taq en la facilidad de masticación en bollos aptos para microondas y relación con los parámetros de textura

Se hornearon los bollos aptos para microondas de acuerdo con el método anteriormente mencionado con la adición de proteasa Taq. La facilidad de masticación fue estimada por un grupo de catadores, y la fuerza y el trabajo total se midieron 4 días después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7

	Fuerza máxima g	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia (0 U*)	275	1.246	0
780 U* de proteasa Taq	196	1.054	4
* expresadas como unidades requeridas por 100 kg de harina			

La proteasa Taq tiene un efecto sobre la facilidad de masticación, y reduce la fuerza y el trabajo total en un 28,7 % y un 15,4 %, respectivamente.

Ejemplo 10: Efecto de la proteasa Taq en la facilidad de masticación en bollos blandos con diferentes tipos de harina y relación con los parámetros de textura

Se hornearon los bollos de acuerdo con el método anteriormente mencionado con diferentes tipos de harina y con la adición de proteasa Taq. La facilidad de masticación fue estimada por un grupo de catadores, y la fuerza y el trabajo total se midieron 1 día después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

	Fuerza máxima g	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Harina de alto nivel de gluten (HGF)	638	1.256	0
HGF + 460 U* de proteasa Taq	465	953	4
Harina de nivel medio de gluten (MGF)	671	893	1
MGF + 460 U* de proteasa Taq	487	688	4
Harina de bajo nivel de gluten (LGF)	580	993	1
LGF + 460 U* de proteasa Taq	489	783	4
* expresadas como unidades requeridas por 100 kg de harina			

En comparación con los bollos de referencia en todas las harinas ensayadas, la adición de proteasa Taq mejora la facilidad de masticación y reduce la fuerza y el trabajo total en más del 10 %.

Ejemplo 11: Efecto de la proteasa Taq en la facilidad de masticación en productos crujientes

El ensayo de horneado convencional para baguettes (patrón para productos crujientes) se realiza de la siguiente manera. La receta básica es (en gramos):

Harina (Surbi)	2.000
Agua	1.400
Harina fresca (Bruggeman, Bélgica)	150
Cloruro sódico	50
Controlador S-500	75

Se mezclan los ingredientes durante 2 min a baja velocidad y durante 10 min a alta velocidad en un mezclador de espiral de tipo Diosna (SP24). La temperatura final de la masa es de 26 ºC. Tras una fermentación a granel durante 45 minutos a 25 ºC, se preparan piezas de 250 g de masa utilizando una moldeadora de tipo Alliance (para piezas de 50 cm de masa). Se gradúan las piezas de masa a 30 ºC y 95 % de humedad relativa durante 150 min. A continuación, se hornean los bollos en un horno giratorio durante 25 min a 230/200 ºC con una corriente de 7 s en la carga del horno y la abertura de la llave de vapor tras 10 min. Es evidente para un experto en la materia que se pueden obtener los mismos resultados finales utilizando equipos de otros proveedores.

Se evalúan los efectos de las proteasas en los productos crujientes mediante un grupo de catadores y utilizando el analizador de la textura TA-XT2™, como se ha descrito anteriormente para los bollos.

Se hornearon los baguettes de acuerdo con el método anteriormente mencionado para los productos crujientes con la adición de diferentes concentraciones de proteasa Taq. Se analizaron las baguettes por un grupo de catadores, y se midieron la fuerza y el trabajo total 2 horas después de hornear con el analizador de la textura como se ha descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10

	Fuerza máxima g	Trabajo total g.s	Facilidad de masticación
Referencia	4.885	3.297	0
1.300 U* de proteasa Taq	4.243	2.271	4
2.600 U* de proteasa Taq	4.292	2.136	4
3.900 U* de proteasa Taq	3.942	2.167	4
* expresadas como unidades añadidas a 100 kg de harina			

En comparación con la referencia, la adición de proteasa Taq mejora la facilidad de masticación, y reduce la fuerza y el trabajo total en más del 10 %.

La invención no está limitada por los ejemplos anteriores y, a la luz de la descripción, el experto en la materia podrá utilizar otras proteasas distintas a las de los ejemplos del presente texto y aplicarlas para obtener las características del método de la invención.

Se analizaron los productos de panadería para determinar sus parámetros de textura como se ha definido anteriormente, utilizando preferentemente un analizador de la textura TA-XT2™, pero el experto en la materia puede encontrar fácilmente y/o adaptar otros dispositivos adecuados para la invención sin salirse del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una serina- o una metaloproteasa termoestable intermedia o termoestable para mejorar la facilidad de masticación de un producto de panadería, en la que se miden los parámetros de textura que consisten en la fuerza (g) y el trabajo total (g.s) necesarios para romper una muestra idéntica de producto de panadería, en el que tanto la fuerza (g) como el trabajo total (g.s) se mejoran en al menos un 10 % con respecto a una muestra idéntica, pero que no contiene al menos una serina- o una metaloproteasa termoestable intermedia o termoestable, y en el que la proporción entre la actividad de la proteasa a la temperatura óptima y la actividad de la proteasa a 25 ºC es superior a 10.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los parámetros de textura se miden de manera simultánea con un dispositivo analizador de la textura, utilizado para romper dicho producto de panadería.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la facilidad de masticación por muestra de producto de panadería es estimada por un panel de catadores.

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteasa termoestable intermedia y/o termoestable tiene una temperatura de actividad óptima superior a 60 ºC, preferentemente superior a 70 ºC, preferentemente superior a 80 ºC.

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proporción entre la actividad de la proteasa a la temperatura óptima y la actividad de la proteasa a 25 ºC es superior a 15.

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las proteasas no muestran ningún efecto adverso en la reología de la masa, en la estructura de la miga ni en el volumen del producto de panadería resultante.

7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteasa es una proteasa aislada de *Thermus aquaticus*, siendo, de manera preferente, esencialmente aqualisina I, termitasa, aislada de *Thermoactinomyces vulgaris*, termolisina, aislada de *Bacillus thermoproteolyticus*, o subtilisina, aislada de *Bacillus licheniformis*.

8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los productos de panadería son productos de panadería blandos tales como pan, panecillos blandos, donuts, bollos, bollos aptos para microondas, repostería danesa, panecillos para hamburguesa, pan de pizza y de pita, y pasteles.

9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se utilizan de 5.000 a 7.500 unidades/100 kg de harina de termitasa, se utilizan de 0,35 a 0,7 unidades/100 kg de harina de termolisina, se utilizan de 0,35 a 0,7 unidades/100 kg de harina de subtilisina, o se utilizan de 230 a 10.400 unidades/100 kg de harina de proteasa de *Thermus aquaticus*, más preferentemente de 350 a 700 unidades/100 kg de harina de proteasa de *Thermus aquaticus*.

10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los productos de panadería son productos crujientes tales como baguettes y panecillos.

11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que se utilizan de 1.300 a 10.400 unidades/100 kg de harina de proteasa de *Thermus aquaticus*.

12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha proteasa se añade a dicho producto de panadería antes de la formación de la masa; preferentemente, dicha proteasa se añade a la harina; más preferentemente, dicha proteasa se añade a una mezcla que comprende vehículos apropiados normalmente utilizados en las aplicaciones de panadería y/o principios activos y/o aditivos de horneado utilizados convencionalmente.

Figura 1

Fig. 1a.

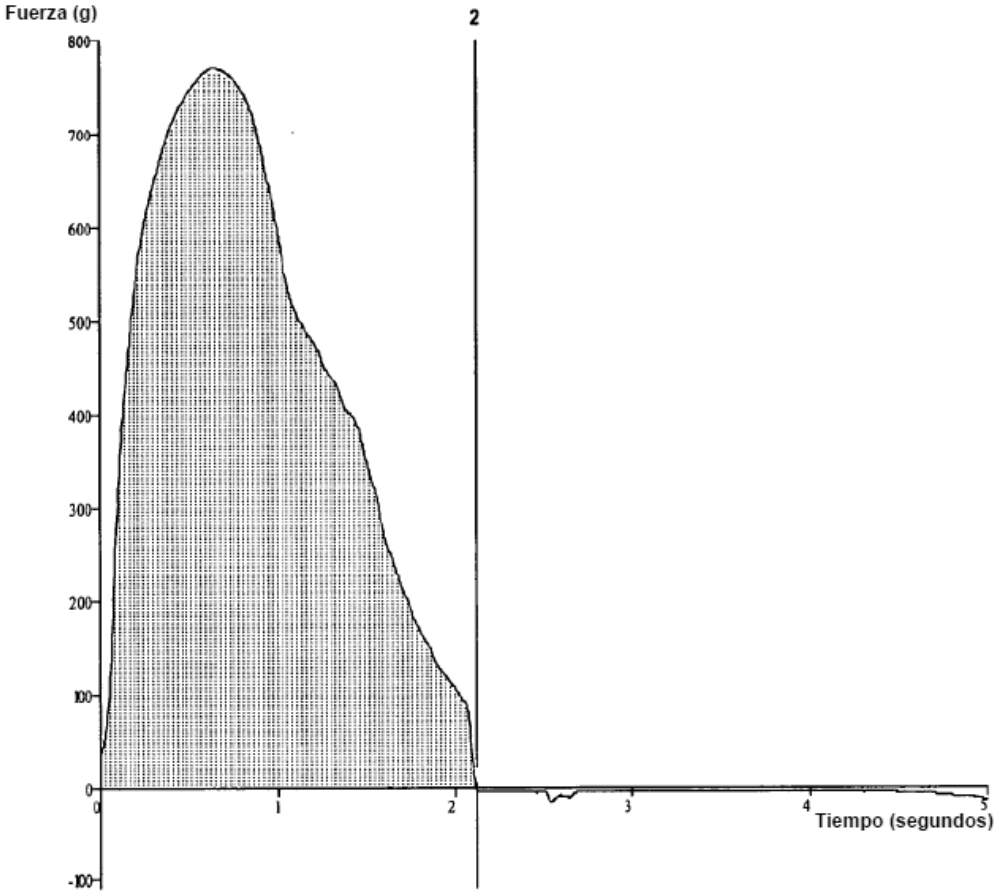
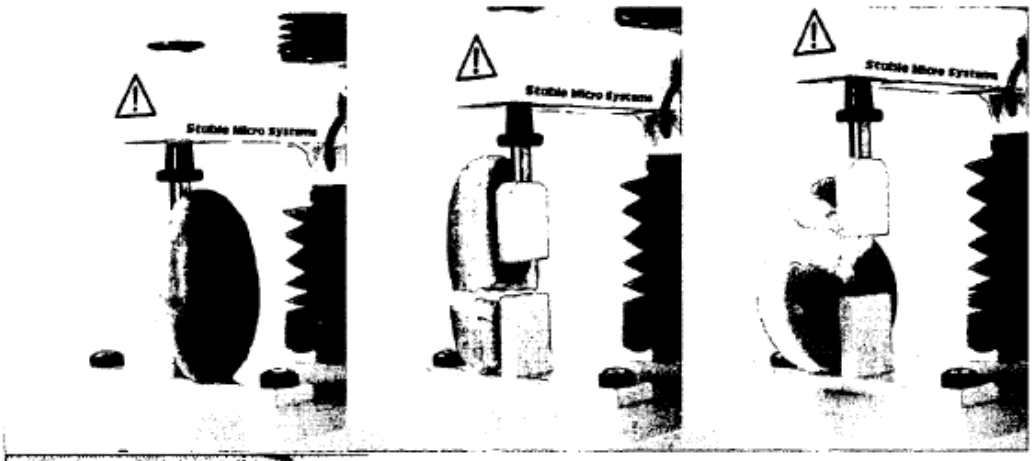


Fig. 1b


Stable Micro Systems
Stable Micro Systems
Stable Micro Systems

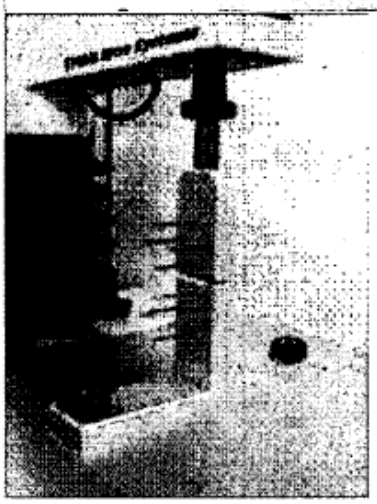


Figura 2:

Fig. 2a

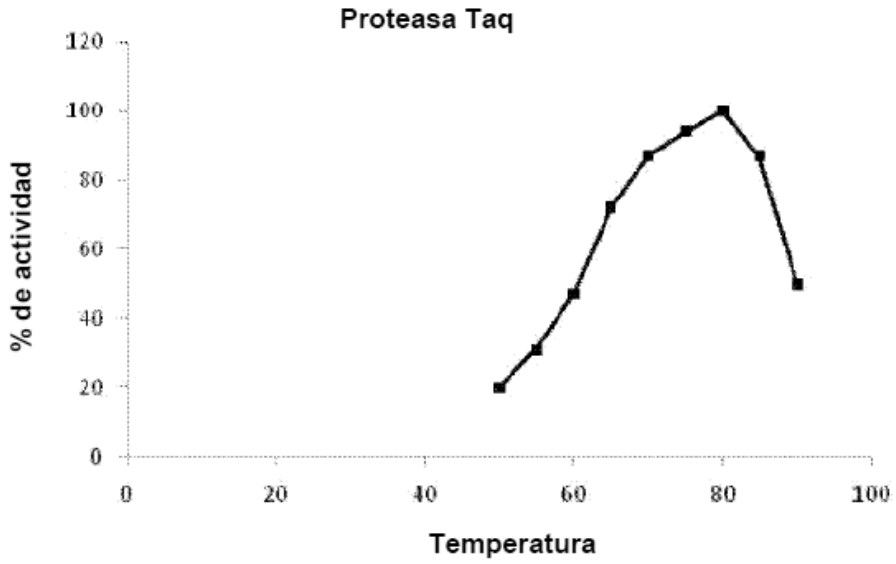


Fig. 2b

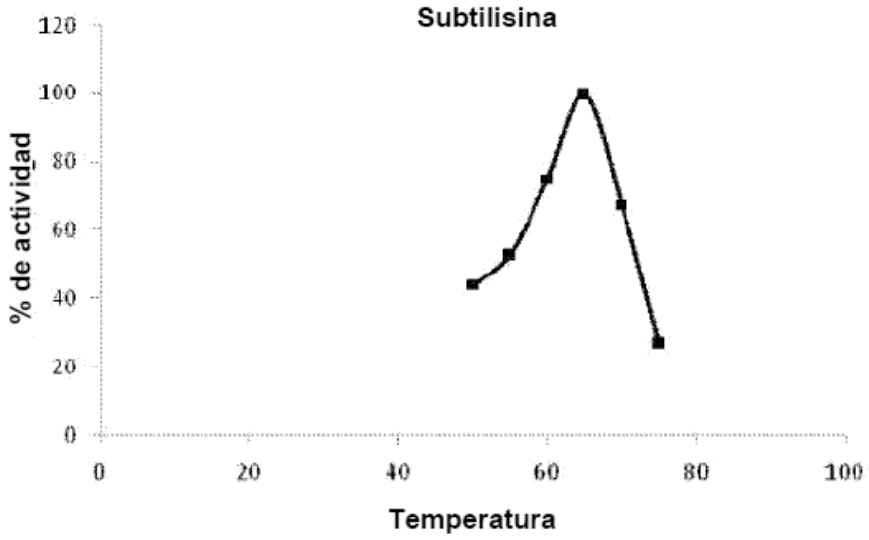
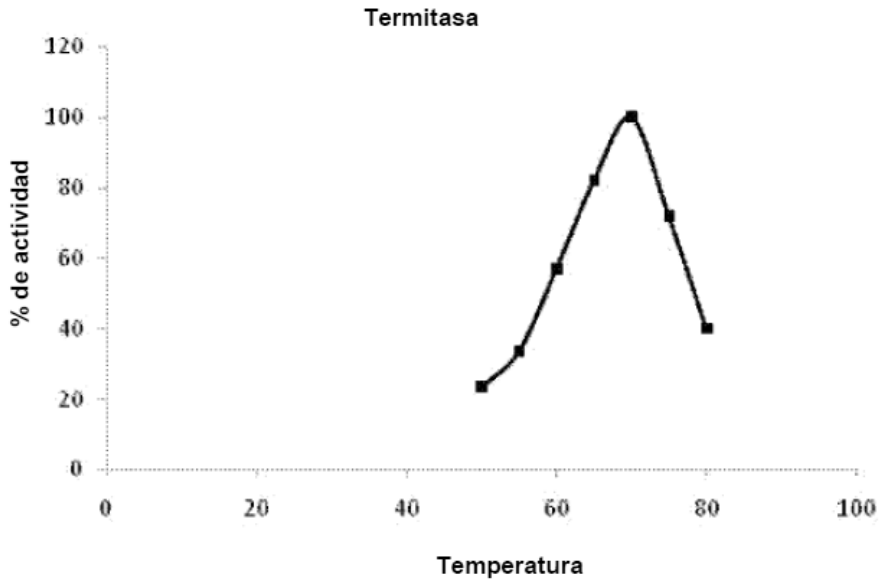


Fig. 2c


Termitasa
% de actividad
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Temperatura