

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 645**

51 Int. Cl.:

**A21D 8/04** (2006.01)

**A23L 7/10** (2006.01)

**C11B 1/02** (2006.01)

**A23L 7/104** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2010 PCT/EP2010/050445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10081869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 10700862 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2387330**

54 Título: **Generación enzimática de lípidos funcionales a partir de extracto de fibra de cereal**

30 Prioridad:

**16.01.2009 EP 09150744**

**16.01.2009 US 145366 P**

**26.01.2009 EP 09151352**

**26.01.2009 US 147412 P**

**01.04.2009 EP 09157090**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS  
(100.0%)**

**Langebrogade 1  
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**SØRENSEN, JENS FRISBÆK;  
MIKKELSEN, RENÉ;  
POULSEN, CHARLOTTE HORSMANS y  
KRAGH, KARSTEN MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 658 645 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**

Generación enzimática de lípidos funcionales a partir de extracto de fibra de cereal

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la modificación de lípidos en material vegetal que contiene lípidos, tal como fibra de cereal, para la generación de lípidos funcionales. La presente invención se refiere además a la preparación de composiciones que comprenden tales lípidos funcionales, así como al uso de estas composiciones que comprenden lípidos funcionales y otros compuestos funcionales derivados de la acción de enzimas modificadoras de lípidos para la preparación de composiciones adecuadas para la preparación de bioetanol así como productos alimenticios, tales como pan.

**10 Antecedentes de la invención**

La utilización de corrientes secundarias del procesamiento de residuos de fermentación de materiales vegetales, tales como fibra de cereal de molienda o grano seco gastado de destilerías con solubles (DDGS) ha recibido poca atención más allá del uso en piensos para animales.

15 El uso beneficioso de enzimas lipolíticas (E.G. 3.1.1.x) en aplicaciones industriales de alimentos y/o piensos se conoce desde hace muchos años.

Sin embargo la mayoría de la técnica anterior describe el uso de enzimas lipolíticas en harina y en masa, y no para corrientes secundarias o subproductos de procesos industriales. Por ejemplo, en el documento EP 0 585 988 se reivindica que la adición de lipasa a masa dio como resultado una mejora en el efecto de antienranciamiento. La solicitud de patente internacional WO94/04035 muestra que puede obtenerse una blandura del pan mejorada añadiendo una lipasa a masa sin la adición de ninguna grasa/aceite adicional a la masa.

20 El sustrato para las lipasas en el material vegetal es una mezcla compleja de lípidos polares y no polares. Los lípidos polares pueden dividirse en glicolípidos y fosfolípidos. Estos lípidos están constituidos por glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo polar. El grupo polar contribuye a la actividad superficial de estos lípidos.

25 La escisión enzimática de uno de los ácidos grasos en estos lípidos conduce a lípidos con una actividad superficial mucho más alta. Es bien sabido que emulsionantes, tales como DATEM, con alta actividad superficial son muy funcionales cuando se añaden a masa.

Las enzimas lipolíticas hidrolizan uno o más de los ácidos grasos de los lípidos presentes en el material vegetal, lo que puede dar como resultado la formación de moléculas emulsionantes poderosas.

30 En el documento EP 1 193 314, los inventores descubrieron que el uso de enzimas lipolíticas activas sobre glicolípidos fue particularmente beneficioso en aplicaciones en la preparación de pan.

El documento US-B1-6365204 describe un procedimiento para preparar una masa o un producto horneado a partir de la masa, procedimiento que implica incorporar a la masa una amilasa antienranciamiento y una fosfolipasa.

35 El documento EP-A1-0468731 describe un mejorador del pan que comprende glucosa oxidasa en combinación con una o más hidrolasas y, opcionalmente, una o más oxidasas. El documento EP-B1-0977869 describe un polipéptido que tiene actividad lipasa que conserva al menos 80 % de actividad después de 4 días a 20 grados C a un pH en el intervalo de 3,5-8, conserva al menos 60 % de su actividad después de 1 hora a 60 grados C en tampón acetato a pH 5,0, y tiene un punto isoeléctrico en el intervalo de 3,5-4,5.

Novozymes A/S Research Disclosure, Mason Publications, Hampshire, GB, 1 de febrero de 2001, describe el uso combinado de glucosa oxidasa y fosfolipasa para hornear.

40 Katina et al. Lebensmittel Wissenschaftt und Technologie, Academic Press, Londres, GB, páginas 479-491, 1 de junio de 2006, describe los efectos de masa madre y enzimas sobre el enranciamiento de pan de trigo de alto contenido en fibra.

La solicitud de patente internacional WO2008/112282 describe un método para preparar DDGS que contiene niveles reducidos de betaglucono y ácido fítico adecuado para un pienso para animales.

45 La solicitud de patente internacional WO2005/079193 describe un procedimiento para producir etanol, que comprende la etapa de tratar grano de destilerías con una enzima oxidante de ácidos grasos.

Morrison et al. J. Sci. Food Agric, 1981, 32, 579-587, describe la distribución de lípidos de semillas de trigo blando en las fracciones de molienda de harinas.

50 Hay una necesidad en la técnica de una mejor utilización de las corrientes secundarias del procesamiento de materiales vegetales, tales como fibra de cereal de molienda, borras de neutralización del refinado de aceites

5 vegetales, grano seco gastado de destilerías con solubles (DDGS), en donde la parte menor del material vegetal irá a aplicaciones de bajo precio como pienso para ganado. Además, es una necesidad sentida desde hace mucho tiempo poder utilizar la fracción de fibra de los cereales en productos de cereales tradicionales, ya existentes, sin un impacto significativo en la apariencia/estructura del producto, el color o el sabor, y hacer posible aumentar el efecto saludable y nutricional de productos ya existentes.

Objeto de la invención

10 Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para generar lípidos funcionales a partir de material vegetal en general y a partir de corrientes secundarias industriales en particular. Es además un objeto de la presente invención proporcionar métodos adecuados que permitan la utilización de composiciones que comprenden lípidos funcionales derivados de material vegetal, tal como fibra en productos alimenticios tradicionales, tal como en pan o productos de cereales, sin un impacto significativo en la apariencia/estructura del producto, el color o el sabor, y hacer posible aumentar el efecto saludable y nutricional de productos ya existentes.

**Compendio de la invención**

15 En un aspecto amplio la presente invención se refiere a un método para la producción de un producto alimenticio seleccionado de pan, un cereal de desayuno, una pasta, bizcochos, pastas y aperitivos, en donde dicho método comprende la generación de un extracto de fibra de cereal que comprende lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, a partir de fibra de cereal que contiene lípidos, y en donde dicho método comprende la etapa de tratar una suspensión líquida de una fibra de cereal que contiene lípidos solubilizada al menos parcialmente que tiene un grado de solubilización más alto que 1% con una fosfolipasa, en donde menos que 20% (en peso) de la suspensión  
20 líquida de dicha fibra de cereal que contiene lípidos es almidón o componentes que contienen almidón, y en donde el contenido total de lípidos y lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, determinado en materia seca frente a fibra de cereal de materia seca en la fracción soluble obtenida es al menos 0,05%. Se describen en la presente memoria métodos para tratar material vegetal que contiene lípidos con enzimas modificadoras de lípidos, para la generación de lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, a partir de materiales vegetales.

25 También se describe un método para el tratamiento de material vegetal que contiene lípidos, comprendiendo el método la etapa de tratar una suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente con una o más enzimas modificadoras de lípidos.

30 También se describe una composición que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, producidos por un método para el tratamiento de material vegetal que contiene lípidos, comprendiendo el método la etapa de tratar una suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente con una o más enzimas modificadoras de lípidos.

35 Una composición que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, producidos por un método para el tratamiento de material vegetal que contiene lípidos, comprendiendo el método la etapa de tratar una suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente con una o más enzimas modificadoras de lípidos, puede usarse para la producción de un producto alimenticio.

Una composición que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, producidos por un método para el tratamiento de material vegetal que contiene lípidos, comprendiendo el método la etapa de tratar una suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente con una o más enzimas modificadoras de lípidos, puede usarse para la producción de bioetanol.

40 Puede obtenerse un producto alimenticio mediante el uso de una composición que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, producidos por un método para el tratamiento de material vegetal que contiene lípidos, comprendiendo el método la etapa de tratar una suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente con una o más enzimas modificadoras de lípidos.

45 Puede obtenerse un bioetanol mediante el uso de una composición que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, producidos por un método para el tratamiento de material vegetal que contiene lípidos, comprendiendo el método la etapa de tratar una suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente con una o más enzimas modificadoras de lípidos.

Un kit de partes puede comprender

50 a) una combinación de enzimas que comprenden: una o más enzimas modificadoras de lípidos; una o más enzimas modificadoras de la pared celular, y opcionalmente una o más enzimas adicionales;

b) instrucciones para el uso en un método según la invención; y

c) opcionalmente otros ingredientes para la preparación de un producto alimenticio.

**Leyendas a las figuras**

Fig. 1. Resultados del ensayo de horneado. Vol. rel. de los panes frente al blanco (%). Las columnas representan el volumen de pan para los números de ensayo 1-6 según la tabla 5 y 6.

5 Fig. 2. Panes obtenidos a partir del horneado con las fracciones de fibra soluble obtenidas. Los números se refieren a los números en la tabla 5.

Fig. 3. Resultados del ensayo de horneado. Vol. rel. de los panes frente al blanco (%). Las columnas representan los experimentos del ensayo de horneado según la tabla 12.

Fig. 4. Panes obtenidos a partir del horneado con las fracciones de fibra soluble obtenidas. Los números se refieren a los números en la tabla 12.

10 Fig. 5. Resultados del ensayo de horneado. Vol. rel. de los panes frente al blanco (%). Las columnas representan los experimentos del ensayo de horneado según la tabla 17 y 18.

Fig. 6. Panes obtenidos a partir del horneado con las fracciones de fibra soluble obtenidas. Los números se refieren a los números en la tabla 18.

15 Fig. 7. Panes obtenidos a partir del horneado con las fracciones de fibra modificadas. Los números se refieren a los números en la tabla 24.

Fig. 8. Panes obtenidos a partir del horneado con extractos de fibra de arroz modificados. Los números se refieren a los números en la tabla 30.

Fig. 9. Panes obtenidos a partir del horneado con las fracciones de fibra modificadas obtenidas. Los números se refieren a los números en la tabla 36.

20 **Descripción detallada de la invención**

Enormes cantidades de corrientes secundarias del procesamiento de materiales vegetales, tales como fibra de cereal de molienda, borras de neutralización del refinado de aceites vegetales, grano seco gastado de destilería con solubles (DDGS), etc. están disponibles como materia prima para generar lípidos funcionales que podrían servir como emulsionantes en diferentes aplicaciones, como aplicaciones para alimentos, aplicaciones para piensos, ablandadores en la producción de materiales plásticos etc.

25 Los autores de la invención muestran aquí que la modificación de la fracción lipídica en p. ej. fibra de trigo es aumentada significativamente si el material es co-tratado con otras enzimas, como enzimas modificadoras de la pared celular y, en algunas realizaciones también, enzimas modificadoras del almidón. Combinando estas clases de enzimas, los autores de la invención han visto una funcionalización de los lípidos que no puede obtenerse usando las lipasas en solitario.

Los lípidos modificados generados pueden usarse en p. ej. la preparación de pan, añadiendo la fracción soluble aislada o añadiendo la composición completa de fibra tratada con enzimas que contiene los lípidos modificados que tienen propiedades emulsionantes.

35 Por tanto, las composiciones generadas por los métodos según la presente invención pueden usarse como solubles aislados. Sin embargo, las composiciones también pueden usarse como una mezcla de solubles e insolubles, es decir, material vegetal insoluble, tal como material de fibra residual. Es de entender que parte de la fracción lipídica puede estar presente aún en esta fracción insoluble residual.

40 La expresión "material vegetal que contiene lípidos", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier material que comprende cantidades significativas de material derivado de una planta que contiene cantidades endógenas de lípidos. Adecuadamente el material vegetal puede obtenerse en altas cantidades, contener una cantidad significativa de lípidos, y puede usarse en procesos industriales.

El material vegetal que contiene lípidos puede ser una corriente secundaria, o subproductos de procesos industriales. En algunas realizaciones el material vegetal también puede contener material no vegetal, tal como un subproducto de una fermentación, que puede contener células de levadura.

45 Según la presente invención el material vegetal que contiene lípidos es una fibra de cereal, tal como p. ej. fibra de trigo de molienda tradicional.

En algunas realizaciones una cantidad de al menos aproximadamente 100 mg, tal como al menos aproximadamente 200 mg, tal como al menos aproximadamente 300 mg por 100 de peso seco del material que contiene lípido es fosfolípido.

50 En algunas realizaciones una cantidad de al menos aproximadamente 10 mg, tal como al menos aproximadamente

20 mg, tal como al menos aproximadamente 30 mg por 100 g de peso seco del material vegetal que contiene lípido es fosfatidilinositol (PI).

La frase “material vegetal que contiene lípidos solubilizado parcialmente”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a material vegetal que contiene lípidos y que se han solubilizado al menos parcialmente por acción enzimática o mecánica.

El término “cereal”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a los frutos de una planta de la familia Poaceae, conteniendo tal semilla al menos la fibra que comprende la aleurona, y el endospermo rico en almidón, con o sin la presencia adicional de pericarpio, el tegumento (llamado alternativamente testa) y/o germen. El término incluye, pero no se limita a, especies tales como trigo, cebada, avena, espelta, centeno, sorgo, maíz y arroz.

El término “fibra”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una fracción de molienda derivada de cereal enriquecida en cualquiera o todos de los tejidos a seleccionar de aleurona, pericarpio y tegumento, en comparación a la semilla intacta correspondiente.

El término “solubilización”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a la solubilización de material vegetal, tal como fibra de cereal, en los métodos según la invención, y pretende incluir cualquier grado de solubilización. Por consiguiente la “solubilización” puede ser para obtener 100% de material soluble o puede ser para obtener un grado de solubilización menor que 100%, tal como menos que 70%, tal como en el intervalo de 30%-60%. En algunas realizaciones el grado de solubilización se determina en materia seca frente a fibra de materia seca.

La expresión “solubilizado al menos parcialmente”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un grado de solubilización que es más alto que 1%, tal como más alto que 5, tal como más alto que 10%. Es de entender que la acción de enzimas modificadoras de lípidos puede no funcionar óptimamente según la invención, si el material vegetal no se solubiliza hasta un cierto punto. En los aspectos específicos según la presente invención, en donde las enzimas modificadoras de lípidos se añaden para trabajar simultáneamente con el tratamiento para obtener solubilización, tal como con un tratamiento con una o más enzimas modificadoras de la pared celular, la solubilización y acción de las enzimas modificadoras de lípidos tendrán lugar al mismo tiempo.

La expresión “fracción de molienda”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a todas o parte de las fracciones que resultan de la reducción mecánica del tamaño de los granos, mediante, como ejemplos, pero no limitados a, corte, laminación, machacado, rotura o molienda, con o sin fraccionamiento, mediante, como ejemplos, pero no limitados a, tamizado, cribado, cernido, soplado, aspirado, cernido centrífugo, cernido por aire, separación electrostática, o separación por campo eléctrico.

En el contexto de la presente invención, “lípidos funcionales” se refiere a lípidos que tienen un efecto sobre el producto en donde se usa el lípido funcional. En algunas realizaciones particulares, los lípidos funcionales son emulsionantes u otros mejoradores de alimentos.

En el contexto de la presente invención, “enzima modificadora de la pared celular” se refiere a cualquier enzima capaz de hidrolizar o modificar la matriz compleja de polisacáridos de la pared celular vegetal, tal como cualquier enzima que tenga actividad en el “ensayo de solubilización de la pared celular” incluido en la presente memoria. Incluidas dentro de esta definición de “enzima modificadora de la pared celular” están celulasas, tales como celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II, endo-glucanasas y beta-glucosidasas, y enzimas hemicelulolíticas, tales como xilanasas.

Los términos “celulasas” o “enzimas celulolíticas”, como se emplean en la presente memoria, se entiende que comprenden las celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), p. ej., celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II, así como las endo-glucanasas (EC 3.2.1.4) y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21).

Incluidas con la definición de celulasas están: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que cortan las cadenas de celulosa al azar; celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) que escinden unidades celobiosilo de los extremos de la cadena de celulosa, y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) que convierten la celobiosa y celodextrinas solubles en glucosa. Entre estas tres categorías de enzimas implicadas en la biodegradación de la celulosa, las celobiohidrolasas son las enzimas claves para la degradación de celulosa cristalina nativa. El término “celobiohidrolasa I” se define en la presente memoria como una actividad celulosa 1,4-beta-celobiosidasa (denominada también exo-glucanasa, exo-celobiohidrolasa o 1,4-beta-celobiohidrolasa), definida en la clase de enzimas EC 3.2.1.91, que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa y celotetraosa, mediante la liberación de celobiosa desde los extremos no reductores de las cadenas. La definición de la expresión “actividad de celobiohidrolasa II” es idéntica, excepto que la celobiohidrolasa II ataca desde los extremos reductores de las cadenas.

Las celulasas pueden comprender un módulo de unión a carbohidratos (CBM) que potencia la unión de la enzima a una fibra que contiene celulosa y aumenta la eficacia de la parte activa catalítica de la enzima. Un CBM se define como una secuencia de aminoácidos contiguos dentro de una enzima activa a los carbohidratos con un pliegue discreto que tiene actividad de unión a carbohidratos. Para información adicional de los CBMs véase el servidor de internet CAZy (Supra) o Tomme et al. (1995) en *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides* (Saddler and Penner, eds.), Cellulose-binding domains: classification and properties, pp. 142-163, American Chemical Society,

- Washington. En una realización preferida las celulasas o enzimas celulolíticas pueden ser una preparación celulolítica definida en la solicitud de EE.UU. N° 60/941.251. En una realización preferida comprende un polipéptido que tiene actividad potenciadora celulolítica (GH61A), preferiblemente el descrito en la solicitud de patente internacional WO2005/074656. La enzima modificadora de la pared celular puede ser además una beta-glucosidasa, tal como una beta-glucosidasa derivada de una cepa del género *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*, incluyendo la proteína de fusión que tiene actividad beta-glucosidasa descrita en la solicitud de EE.UU. N° 60/832.511 (Novozymes). En algunas realizaciones la enzima modificadora de la pared celular es una CBH II, tal como celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A). En algunas realizaciones la enzima modificadora de la pared celular es una enzima celulasa, tal como una derivada de *Trichoderma reesei*.
- La actividad celulolítica puede, en algunas realizaciones, derivarse de una fuente fúngica, tal como una cepa del género *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*; o una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*.
- En algunas realizaciones la enzima modificadora de la pared celular es un polipéptido que tiene actividad potenciadora celulolítica (GH61A) descrito en la solicitud de patente internacional WO 2005/074656; una celobiohidrolasa, tal como celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A), una beta-glucosidasa (p. ej., la proteína de fusión descrita en la solicitud de EE.UU. N° 60/832.511) y enzimas celulolíticas, p. ej., derivadas de *Trichoderma reesei*.
- En algunas realizaciones la enzima modificadora de la pared celular es un polipéptido que tiene actividad potenciadora celulolítica (GH61A) descrito en la solicitud de patente internacional WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (p. ej., la proteína de fusión descrita en la solicitud de EE.UU. N° 60/832.511) y enzimas celulolíticas, p. ej., derivadas de *Trichoderma reesei*. En algunas realizaciones la enzima modificadora de la pared celular es un producto disponible en el mercado, tal como GC220, disponible en Genencor, A Danisco Division, EE.UU., o CELLULAST® 1.5L o CELLUZYME™, disponibles en Novozymes A/S, Dinamarca.
- Las endoglucanasas (EC N° 3.2.1.4) catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados de celulosa (tales como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mixtos tales como beta-D-glucanos o xiloglucanos de cereal y otro material vegetal que contenga partes celulósicas. El nombre autorizado es endo- 1,4-beta-D-glucan- 4-glucano hidrolasa, pero se usa el término abreviado endoglucanasa en la presente memoria descriptiva. La actividad endoglucanasa puede determinarse usando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268.
- En algunas realizaciones las endoglucanasas pueden derivarse de una cepa del género *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.
- El término "celobiohidrolasa" significa una 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier polímero que contenga glucosa enlazada en beta-1,4, liberando celobiosa desde los extremos reductores o no reductores de la cadena.
- Se mencionan anteriormente ejemplos de celobiohidrolasas, que incluyen CBH I y CBH II de *Trichoderma reesei*; *Humicola insolens* y CBH II de celobiohidrolasa de *Thielavia terrestris* (CELL6A).
- La actividad celobiohidrolasa puede determinarse según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, *Anal. Biochem.* 47: 273-279 y por van Tilbeurgh et al., 1982, *FEBS Letters* 149: 152-156; van Tilbeurgh y Claeysens, 1985, *FEBS Letters* 187: 283-288. El método de Lever et al. es adecuado para evaluar la hidrólisis de celulosa en rastrojo de maíz, y el método de van Tilbeurgh et al. es adecuado para determinar la actividad celobiohidrolasa en un derivado disacárido fluorescente.
- El término "beta-glucosidasa" significa una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no reductores terminales con la liberación de beta-D-glucosa. Para los fines de la presente invención, la actividad beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi et al., 2002, *J. Basic Microbiol.* 42: 55-66, excepto que se emplearon condiciones diferentes descritas en la presente memoria. Una unidad de actividad beta-glucosidasa se define como 1,0 µmoles de p-nitrofenol producidos por minuto a 50°C, pH 5, de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido 4 mM como sustrato en citrato de sodio 100 mM, TWEEN® 20 al 0,01%.
- En algunas realizaciones la beta-glucosidasa es de origen fúngico, tal como una cepa del género *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*. En algunas realizaciones la beta-glucosidasa es una derivada de *Trichoderma reesei*, tal como la beta-glucosidasa codificada por el gen *bgl1* (véase el documento EP 562003). En otra realización la beta-glucosidasa se deriva de *Aspergillus oryzae* (producida de manera recombinante en *Aspergillus oryzae* según la solicitud de patente internacional WO 02/095014), *Aspergillus fumigatus* (producida de manera recombinante en *Aspergillus oryzae* según el Ejemplo 22 de la solicitud de patente internacional WO 02/095014) o *Aspergillus niger* (1981, *J. Appl.* 3: 157-163).

Los términos “enzimas hemicelulíticas” o “hemicelulasas”, como se emplean en la presente memoria, se refieren a enzimas que pueden romper la hemicelulosa.

5 Puede usarse cualquier hemicelulasa adecuada para el uso en la hidrólisis de hemicelulosa, preferiblemente a oligosacáridos de arabinoxilano. Las hemicelulasas preferidas incluyen xilanasa, arabinofuranosidasas, acetilxilano esterasa, feruloilo esterasa, glucuronidasas, galactanasa, endo-galactanasa, manasas, endo o exo arabinasas, exo-galactanasas, pectinasa, xiloglucanasa, o mezclas de dos o más de las mismas. Un ejemplo de hemicelulasa adecuada para el uso en la presente invención incluye Grindamyl Powerbake 930 (disponible en Danisco A/S, Dinamarca) o VISCOZYM E™ (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca). En una realización la hemicelulasa es una xilanasa. En una realización la xilanasa es de origen microbiano, tal como de origen fúngico (p. ej., Trichoderma, Meripilus, Humicola, Aspergillus, Fusarium) o de una bacteria (p. ej., Bacillus). En algunas realizaciones la xilanasa se deriva de un hongo filamentoso, preferiblemente derivada de una cepa de Aspergillus, tal como Aspergillus aculeatus; o una cepa de Humicola, preferiblemente Humicola lanuginosa. La xilanasa puede ser preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa, más preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa de GH 10 o GH 11. Ejemplos de xilanasas comerciales incluyen Grindamyl H121 o Grindamyl Powerbake 930, de Danisco A/S, Dinamarca, o SHEARZYME™ y BIOFEED WHEAT™, de Novozymes A/S, Dinamarca.

La arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) cataliza la hidrólisis de residuos de alfa-L-arabinofuranósido no reductores terminales en alfa-L-arabinósidos. La galactanasa (EC 3.2.1.89), arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa, cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-D-galactosídicos en arabinogalactanos.

20 La pectinasa (EC 3.2.1.15) cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos.

La xiloglucanasa cataliza la hidrólisis de xiloglucano.

El término “xilanasa”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una enzima que puede hidrolizar el enlace beta-1,4 glicosilo en unidades beta-D-xilopiranosil-1,4-beta-D-xilopiranosilo no terminales de xilano o arabinoxilano. Otros nombres incluyen 1,4-beta-D-xilano xilanohidrolasa, 1,4-beta-xilano xilanohidrolasa, beta-1,4-xilano xilanohidrolasa, (1-4)-beta-xilano 4-xilanohidrolasa, endo-1,4-beta-xilanasa, endo-(1-4)-beta-xilanasa, endo-beta-1,4-xilanasa, endo-1,4-beta-D-xilanasa, endo-1,4-xilanasa, xilanasa, beta-1,4-xilanasa, beta-xilanasa, beta-D-xilanasa. Las xilanasas pueden derivarse de diversos organismos, que incluyen especies vegetales, fúngicas (p. ej. especies de Aspergillus, Penicillium, Disporotrichum, Neurospora, Fusarium, Humicola, Trichoderma) o bacterianas (p. ej. especies de Bacillus, Aeromonas, Streptomyces, Nocardiosis, Thermomyces) (véanse por ejemplo las solicitudes de patente internacional WO92/17573, WO92/01793, WO91/19782, WO94/21785).

35 En un aspecto de la invención, la xilanasa usada en los métodos de la invención es una enzima clasificada como EC 3.2.1.8. El nombre oficial es endo-1,4-beta-xilanasa. El nombre sistemático es 1,4-beta-D-xilano xilanohidrolasa. Pueden usarse otros nombres, tales como endo-(1-4)-beta-xilanasa; (1-4)-beta-xilano 4-xilanohidrolasa; endo-1,4-xilanasa; xilanasa; beta-1,4-xilanasa; endo-1,4-xilanasa; endo-beta-1,4-xilanasa; endo-1,4-beta-D-xilanasa; 1,4-beta-xilano xilanohidrolasa; beta-xilanasa; beta-1,4-xilano xilanohidrolasa; endo-1,4-beta-xilanasa; beta-D-xilanasa. La reacción catalizada es la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en los xilanos.

En un aspecto de la invención, la xilanasa de la invención es una xilanasa de la Familia 11 de Glicósido Hidrolasas (GH). La expresión “de la Familia 11 de Glicósido Hidrolasas (GH)” significa que la xilanasa en cuestión es o puede ser clasificada en la familia GH 11.

40 En un aspecto de la invención, la xilanasa usada según la invención es una xilanasa que tiene actividad xilanasa medida en el “ensayo de Xilanasa” descrito en la presente memoria.

Según el sitio Cazy(ModO), las glicósido hidrolasas de la Familia 11 pueden caracterizarse como sigue:

Actividades conocidas: xilanasa (EC 3.2.1.8).

Mecanismo: Retención

45 Nucleófilo/base catalítica: Glu (experimental)

Donador de protones catalítico: Glu (experimental)

Estatus de la estructura 3D: Plegada: rollo de gelatina  $\beta$

Clan: GH-C

50 Como se emplea en la presente memoria, “Clan C” se refiere a agrupamientos de familias que comparten un pliegue tridimensional común y maquinaria catalítica idéntica (véase, por ejemplo, Henrissat, B., y Bairoch, A., (1996) Biochem J., 316, 695-696).

Como se emplea en la presente memoria, “Familia 11” se refiere a una familia de enzimas establecida por Henrissat

y Bairoch (1993) *Biochem J.*, 293, 781-788 (véase, también, Henrissat y Davies (1997) *Current Opinion in Structural Biol.* 1997, &:637-644). Los rasgos comunes para los miembros de la familia 11 incluyen alta homología genética, un tamaño de aproximadamente 20 kDa y un mecanismo catalítico de desplazamiento doble (véase Tenkanen et al., 1992; Wakarchuk et al., 1994). La estructura de las xilanasas de la familia 11 incluye dos láminas  $\beta$  grandes hechas de hebras  $\beta$  y hélices  $\alpha$ .

Las xilanasas de la familia 11 incluyen las siguientes: *Aspergillus niger* XynA, *Aspergillus kawachii* XynC, *Aspergillus tubigenensis* XynA, *Bacillus circulans* XynA, *Bacillus punzilus* XynA, *Bacillus subtilis* XynA, *Neocalliniastix patriciarum* XynA, *Streptomyces lividans* XynB, *Streptomyces lividans* XynC, *Streptomyces therinviolaceus* XynII, *Thermomonospora fusca* XynA, *Trichoderma harzianum* Xyn, *Trichoderma reesei* XynI, *Trichoderma reesei* XynII, *Trichoderma viride* Xyn.

En el contexto de la presente invención, “enzima modificadora de almidón” se refiere a cualquier enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,3 y/o  $\alpha$ -1,6 en glucósidos. Están incluidas dentro de este término las glicosidas hidrolasas nombradas típicamente por el sustrato sobre el que actúan. En algunas realizaciones según la invención, la “enzima modificadora del almidón” se selecciona de lactasa, amilasa, pululanasa, isoamilasa, quitinasa, sucrasa, maltasa, neuraminidasa, hialuronidasa y lisozima.

En algunas realizaciones la enzima modificadora del almidón es una enzima desramificadora del almidón.

En un aspecto de la invención, la enzima modificadora del almidón usada según la invención es una enzima que tiene actividad desramificadora del almidón medida en el “ensayo de actividad desramificadora del almidón” descrito en la presente memoria.

Las enzimas desramificadoras del almidón incluyen pululanasa (EC 3.2.1.41) e isoamilasa (EC 3.2.1.68). Hidrolizan enlaces de ramas glucosídicas  $\alpha$ -1,6-D en amilopectina, dextrinas de límite  $\beta$  y pululanos. Las isoamilasas pueden distinguirse de las pululanastas (EC 3.2.1.41) por la incapacidad de la isoamilasa para atacar el pululano, y por la acción limitada sobre dextrinas de límite  $\alpha$ .

Por “amilasa” se pretende incluir cualquier amilasa, tales como glucoamilasas,  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasas y  $\alpha$ -amilasas de tipo salvaje de *Bacillus* sp., tales como *B. licheniformis* y *B. subtilis*. “Amilasa” significará una enzima que es, entre otras cosas, capaz de catalizar la degradación del almidón. Las amilasas son hidrolasas que escinden los enlaces O-glicosídicos  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) en el almidón. De manera general, las  $\alpha$ -amilasas (EC 3.2.1.1; (X-D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano glucanohidrolasa) se definen como enzimas endo-actantes que escinden enlaces O-glicosídicos  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) dentro de la molécula de almidón de un modo aleatorio. En contraste, las enzimas amiolíticas exo-actantes, tales como  $\beta$ -amilasas (EC 3.2.1.2;  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano maltohidrolasa) y algunas amilasas específicas a producto como  $\alpha$ -amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133) escinden la molécula de almidón desde el extremo no reductor del sustrato,  $\beta$ -amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas (EC 3.2.1.20;  $\alpha$ -D-glucósido glucohidrolasa), glucoamilasa (EC 3.2.1.3;  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano glucohidrolasa), y amilasas específicas a producto pueden producir glucosa a partir de almidón.

“Variante de  $\alpha$ -amilasa”, “polipéptido variante de  $\alpha$ -amilasa” y “enzima variante” quieren decir una proteína  $\alpha$ -amilasa que ha sido modificada sustituyendo residuos de aminoácidos en el término amino de la proteína  $\alpha$ -amilasa madura. Como se emplea en la presente memoria, “enzimas parentales”, “secuencia parental”, “polipéptido parental”, “proteína  $\alpha$ -amilasa de tipo salvaje” y “polipéptidos parentales” significarán enzimas y polipéptidos a partir de los cuales derivan los polipéptidos variantes de  $\alpha$ -amilasa. La enzima parental puede ser una enzima de tipo salvaje o una  $\alpha$ -amilasa que había sido previamente manipulada de manera recombinante. La variante de  $\alpha$ -amilasa puede incluir además mutaciones en la secuencia señal del polipéptido parental de  $\alpha$ -amilasa, o en otras partes en el polipéptido parental de  $\alpha$ -amilasa. Por tanto, el polipéptido de  $\alpha$ -amilasa puede ser una enzima manipulada de manera recombinante.

En un aspecto de la invención, la  $\alpha$ -amilasa usada según la invención es una  $\alpha$ -amilasa que tiene actividad  $\alpha$ -amilasa medida en el “ensayo de  $\alpha$ -amilasa” descrito en la presente memoria.

En un aspecto de la invención, la beta-amilasa usada según la invención es una beta-amilasa que tiene actividad beta-amilasa medida en el “ensayo de beta-amilasa” descrito en la presente memoria.

El término “pululanasa” se refiere a un tipo específico de glucanasa, una endoenzima amiolítica que degrada el pululano. Es producida como, por ejemplo, una lipoproteína extracelular, anclada en la superficie celular, por bacterias Gram-negativas del género *Klebsiella*. Las bacterias Gram-positivas, sin embargo, producen pululanastas como proteínas secretadas. Las pululanastas de tipo I atacan específicamente enlaces  $\alpha$ -1,6, mientras que las pululanastas de tipo II también pueden hidrolizar enlaces  $\alpha$ -1,4. También es producida por algunas otras bacterias y arqueas. La pululanasa se usa como detergente en biotecnología. La pululanasa (EC 3.2.1.41) también se conoce como pululano-6-glucanohidrolasa (enzima desramificadora). El pululano se considera como una cadena de unidades maltotriosa enlazadas por enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos. La pululanasa escindirán hidrolíticamente el pululano (polisacáridos de  $\alpha$ -glucano).

La expresión “enzima de transglucosilación” se refiere a cualquier enzima que tiene actividad transglucosidasa, tal como trans-glucosidasa. El término “transglucosidasa” se refiere a una enzima que transfiere un residuo de  $\alpha$ -D-

glucosilo en un 1,4- $\alpha$ -D-glucano al grupo hidroxilo primario de la glucosa, libre o combinado en un 1,4- $\alpha$ -D-glucano. La transglucosidasa descrita en la presente memoria tiene una actividad descrita como EC 2.4.1.24, según la nomenclatura de enzimas de IUBMB. El nombre sistemático para la transglucosidasa descrita en la presente memoria es 1,4- $\alpha$ -D-glucano:1,4- $\alpha$ -D-glucano(D-glucosa) 6- $\alpha$ -D-glucosiltransferasa. Esta enzima puede denominarse  $\alpha$ -glucosidasa en ciertas publicaciones.

Como se indicó anteriormente, la enzima transglucosidasa tiene generalmente una actividad definida como EC 2.4.1.24, según la nomenclatura de enzimas de IUBMB, actividad que transfiere residuos de glucosilo en ciertos glucanos al grupo hidroxilo primario de la glucosa. En algunas realizaciones, la enzima también puede tener una actividad que degrada polisacáridos de goma natural (p. ej., xantana, y polisacáridos que contienen galactomanano tales como goma guar o goma de judía de Lima), cortando cadenas laterales de azúcar o escindiendo enlaces internos para romper la cadena principal del polisacárido. Cualquier enzima transglucosidasa adecuada encuentra uso en la presente invención (véase p. ej. Pazur et al, Carbohydr. Res. 1986 149:137-47; y Nakamura et al, J. Biotechnol., 53:75-84, 1997). En algunas realizaciones, las enzimas transglucosidasas que encuentran uso en la presente invención están disponibles en el mercado (p. ej., que incluyen, pero no se limitan a, enzimas obtenidas de Megazyme, Wicklow, Irlanda; o Danisco US Inc., Genencor Division, Palo Alto, CA). En algunas realizaciones, la enzima es una transglucosidasa de *Aspergillus niger* producida en células de *Trichoderma reesei*. En algunas realizaciones adicionales, la transglucosidasa es una transglucosidasa fúngica de tipo salvaje (p. ej., que incluyen, pero no se limitan a, transglucosidasa fúngica que tiene una secuencia de aminoácidos depositada en la base de datos GENBANK® de NCBI como números de acceso: D45356 (GID:2645159; *Aspergillus niger*), BAD06006.1 (GID:4031328; *Aspergillus awamori*), BAA08125.1 [GID:\054565; *Aspergillus oryzae*), XPJ)OI 210809.1 (GID: 15492363; *Aspergillus terreus*), XP\_001271891.1 (GID: 121707620; *Aspergillus clavatus*), XPJ)01266999.1 (GID: 119500484; *Neosartorya fischeri*), XP\_75181\_1.1 (GID: 70993928; *Aspergillus fumigatus*), XP\_659621.1 (GID: 67523121; *Aspergillus nidulans*), XP\_001216899.1 (GID: 115433524; *Aspergillus terreus*), y XPJ)01258585.1 (GID: 119473371; *Neosartorya fischeri*)), o una variante de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70% idéntica, al menos aproximadamente 80% idéntica, al menos aproximadamente 85% idéntica, al menos aproximadamente 90% idéntica, al menos aproximadamente 95% idéntica, o al menos aproximadamente 98% idéntica a una transglucosidasa fúngica de tipo salvaje.

En un aspecto de la invención, la transglucosidasa usada según la invención es una transglucosidasa que tiene actividad transglucosidasa medida en el "ensayo de transglucosidasa" descrito en la presente memoria.

Ensayos de actividad enzimática según la invención:

Ensayo de solubilización de la pared celular:

Preferiblemente, la solubilidad de la fibra se mide usando el siguiente ensayo.

Se prepara una suspensión de fibra de trigo en tampón (0,1 M) - hidrogenofosfato de disodio (0,2 M), pH 5,0, hasta una concentración de 1,33% de fibra (en peso). De esta suspensión, se transfieren alícuotas de 750  $\mu$ l a tubos de eppendorph bajo agitación. Cada tubo de sustrato se precalienta durante 5 minutos a 40°C. A esto, se añaden 250  $\mu$ l de disolución de enzima, haciendo que la concentración final de sustrato sea 1%. Se hacen tres diluciones (por duplicado) de cada composición de enzima, con concentración de enzima creciente (p. ej., 0,33, 1,0 y 3,0  $\mu$ g de enzima/gramo de fibra) para cada tiempo de determinación (0, 30, 60 y 240 minutos). Como blanco, se usa una disolución desnaturalizada por calor de la composición de enzima. La reacción se termina a los tiempos dados, transfiriendo los tubos a una incubadora ajustada a 95°C. Las muestras desnaturalizadas por calor se mantienen a 4°C hasta que todas las reacciones enzimáticas se terminan. Cuando todas las reacciones enzimáticas se terminan, los tubos de Eppendorph se centrifugan hasta obtener un sobrenadante transparente. La capacidad de las enzimas para solubilizar la fibra se expresa como el aumento en grupos terminales reductores, determinado usando PAHBAH (Lever, 1972).

Si la fibra usada contiene almidón residual, actividades secundarias tales como actividad amilasa pueden interferir con el ensayo anterior, el ensayo de solubilización de fibra debe llevarse a cabo sólo sobre enzimas modificadoras de la pared celular purificadas (que no tengan actividad amilasa).

Alternativamente el grado de solubilización puede medirse según el siguiente método:

El grado de solubilización de un material vegetal, p. ej. fibra de cereal, puede determinarse suspendiendo el material vegetal insoluble en un tampón de extracción (típicamente 10-25% de fibra en tampón (en peso)) con y sin enzimas, incubar la suspensión bajo agitación y 40 grados C durante un tiempo controlado (p. ej. 30 a 1.440 minutos). Después de la solubilización, el material solubilizado se separa del material insoluble por centrifugación (20 min, 25.000 x g, temp. ambiente). El contenido de materia seca en el sobrenadante se determina bien liofilizando parte de la muestra, o bien mediante un análisis de humedad (analizador de Humedad, AND ML-50, Buch & Holm, Dinamarca). Todo el tampón de extracción no puede recuperarse usando este protocolo, sin embargo, se asume que la concentración de material soluble es la misma en el tampón de extracción recuperado que en el tampón de extracción no recuperado, por lo que se hace una corrección para el tampón de extracción usado en total. Habiendo determinado el contenido de materia seca en la fracción soluble, conociendo la cantidad de material vegetal que se

toma en el trabajo y la cantidad de tampón de extracción, el grado de solubilización puede determinarse usando la siguiente ecuación.

$$\text{Grado de solubilización} = \left( \frac{\text{gramos de materia seca/ml de sobrenadante recuperado} \times \text{ml de tampón de extracción usado}}{\text{gramos de material vegetal tomado en el trabajo}} \right) \times 100\%$$

5 Ensayo de xilanasa (actividad de endo- $\beta$ -1,4-xilanasa)

Las muestras se diluyeron en tampón ácido cítrico (0,1 M) - hidrogenofosfato de disodio (0,2 M), pH 5,0, para obtener aprox. OD<sub>590</sub> = 0,7 en este ensayo. Se preincubaron tres diluciones diferentes de la muestra durante 5 minutos a 40°C. En el tiempo = 5 minutos, se añadió 1 comprimido de Xylazyme (sustrato de xilano teñido, reticulado, Megazyme, Bray, Irlanda) a la disolución de enzima en un volumen de reacción de 1 ml. En el tiempo = 10 minutos, se terminó la reacción añadiendo 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. Se prepararon blancos usando 1.000  $\mu$ l de tampón en lugar de disolución de enzima. La mezcla de reacción se centrifugó (1.500 x g, 10 minutos, 20°C) y se midió el OD del sobrenadante a 590 nm. Una unidad xilanasa (XU) se define como la actividad xilanasa que aumenta el OD<sub>590</sub> con 0,025 por minuto.

Actividad  $\alpha$ -amilasa:

15 Las  $\alpha$ -amilasas hidrolizan enlaces  $\alpha$ -D-1,4-glucosídicos, y su actividad puede detectarse como velocidad de cambio de color de una disolución de almidón-yodo debido a la hidrólisis de los enlaces alfa-1,4-D.

Actividad beta-amilasa:

La actividad beta-amilasa puede detectarse como la liberación de maltosa del extremo no reductor de una disolución de almidón.

20 Actividad transglucosidasa:

La transglucosidasa cataliza reacciones tanto catalíticas como de transferencia en incubación con  $\alpha$ -D-glucooligosacáridos. La actividad transglucosidasa puede detectarse como la formación de isomaltooligosacáridos tales como isomaltosa, pansosa e isomaltotriosa tras una incubación con maltosa o maltodextrina.

Ensayo de actividad de desramificación del almidón:

25 Las enzimas específicas para los enlaces  $\alpha$ -D-1,6 glucosídicos en el almidón incluyen actualmente isoamilasa (EC 3.2.1.68) y pululanasa (EC 3.2.1.41). Las enzimas que actúan sobre los enlaces  $\alpha$ -D-1,6 glucosídicos del almidón también se clasifican por su acción sobre el pululano, y su actividad se mide como la hidrólisis específica de los enlaces  $\alpha$ -D-1,6 glucosídicos del almidón y el pululano.

30 La expresión "enzima modificadora de lípidos", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier enzima que puede modificar un lípido.

En algunas realizaciones preferidas la enzima modificadora de lípidos es una enzima lipolítica, tal como una lipasa.

35 La expresión "enzima lipolítica", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier enzima que hidroliza uno o más de los ácidos grasos de los lípidos presentes en un material vegetal, tal como en bi-corrientes de cereal, lo que puede dar como resultado la formación de lípidos funcionales dentro de la bi-corriente de cereal que proporcionan valor comercial. Las moléculas que contribuyen a los efectos funcionales más significativos son las moléculas con características emulsionantes que son los productos de hidrólisis parcial, tales como moléculas de liso-fosfolípidos, liso-glicolípidos y monoglicéridos. Los productos de hidrólisis de lípidos polares, tales como liso-fosfolípidos y liso-glicolípidos, son particularmente ventajosos en la preparación de pan, y pueden dar una funcionalidad equivalente como emulsionantes, tales como DATEM.

40 Los sustratos para las lipasas en las bi-corrientes de cereal son los lípidos de la fibra, que son una mezcla compleja de lípidos polares y no polares. Los lípidos polares pueden dividirse en glicolípidos y fosfolípidos. Estos lípidos están constituidos por glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo polar. El grupo polar contribuye a la actividad superficial de estos lípidos. La escisión enzimática de uno de los ácidos grasos en estos lípidos conduce a lípidos con una actividad superficial mucho más alta. Es bien sabido que emulsionantes tales como DATEM, con alta actividad superficial, son muy funcionales cuando se añaden a alimentos.

45 El uso de lipasas (E.C. 3.1.1.X) en productos de masa puede tener un impacto perjudicial en la actividad de la levadura, y/o un efecto negativo sobre el volumen del pan. El efecto negativo sobre el volumen del pan se explica a menudo por sobredosificación. La sobredosificación puede conducir a una disminución en la elasticidad del gluten, lo que da como resultado una masa que es demasiado rígida y da como resultado por tanto volúmenes de pan reducidos. Además, o alternativamente, tales lipasas pueden degradar la manteca, el aceite o la grasa de leche añadidos a la masa, dando como resultado un mal sabor en la masa y el producto horneado. La sobredosificación y el mal sabor se han atribuido a la acumulación de ácidos grasos libres en la masa. En relación a la presente invención, estos efectos no deseados pueden ser evitados mientras la lipasa es añadida a la bi-corriente de cereal

- como p. ej. una suspensión de fibras de cereal, los lípidos funcionales son generados después en la suspensión de fibras de cereal, que se usa con o sin procesamiento adicional como mejorador de la masa. Un procesamiento adicional puede ser dilución, purificación de los lípidos funcionales. Además, los lípidos funcionales pueden procesarse para ser suministrados como un producto líquido o como un producto formulado seco, tal como un producto liofilizado.
- En los documentos EP1193314, EP0977869, WO02/094123, WO00/32758 y también en WO01/39602, se reportó que el uso de enzimas lipolíticas activas sobre glicolípidos es particularmente beneficioso en la aplicación en la preparación de pan, ya que se encontró que los productos de hidrólisis parcial, los liso-glicolípidos, tienen una funcionalidad emulsionante muy alta, dando como resultado aparentemente una proporción más alta de funcionalidad emulsionante positiva en comparación con la acumulación perjudicial de ácidos grasos libres. Sin embargo, también se encontró que las enzimas tienen una actividad no selectiva significativa sobre los triglicéridos, lo que dio como resultado ácidos grasos libres innecesariamente altos. Además la aplicación de las lipasas en la preparación de pan ha sido la adición de lipasa a la masa seguido de una generación in situ de emulsionante en la masa.
- La lipasa puede ser de cualquier origen, p. ej. de origen animal (tal como, p. ej. mamífero), p. ej. de páncreas (p. ej. páncreas bovino o porcino), o veneno de serpiente o veneno de abeja. Alternativamente, la lipasa puede ser de origen microbiano, p. ej. de hongos filamentosos, levaduras o bacterias, tales como el género o especie *Aspergillus*, p. ej. *A. niger*, *Dyctiostelium*, p. ej. *D. discoideum*; *Magnaporthe*, p. ej. *M. griseae*, *Mucor*, p. ej. *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, p. ej. *N. crassa*; *Rhizomucor*, p. ej. *R. pusillus*; *Rhizopus*, p. ej. *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*, *Sclerotinia*, p. ej. *S. libertiana*; *Trichophyton*, p. ej. *T. rubrum*; *Whetzelinia*, p. ej. *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, p. ej. *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, p. ej. *C. freundii*; *Enterobacter*, p. ej. *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, p. ej. *E. herbicola*; *Escherichia*, p. ej. *E. coli*; *Klebsiella*, p. ej. *K. pneumoniae*; *Proteus*, p. ej. *P. vulgaris*; *Providencia*, p. ej. *P. stuartii*; *Salmonella*, p. ej. *S. typhimurium*; *Serratia*, p. ej. *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, p. ej. *S. flexneri*; *Streptomyces*, p. ej. *S. violeceoruber*, *Yersinia*, p. ej. *Y. enterocolitica*. Por tanto, la lipasa puede ser fúngica, p. ej. de la clase *Pyrenomycetes*, tal como el género *Fusarium*, tal como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o una cepa de *F. oxysporum*. La fosfolipasa también puede ser de una cepa de un hongo filamentos dentro del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.
- Una fuente de enzimas lipolíticas preferida en el mercado es una lipasa o aciltransferasa microbiana.
- En algunas realizaciones, la lipasa es de hongos filamentosos, tales como *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* Se ha encontrado que las lipasas aisladas de hongos filamentosos tienen características aplicables en la industria, y también se ha encontrado que se expresan rutinariamente en sistemas de producción heterólogos, tales como en *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* y levadura.
- En algunas realizaciones, la lipasa es de *Aspergillus tubingensis* como se describe en el documento EP1433852.
- En algunas realizaciones, la lipasa es de *Fusarium heterosporum* como se describe en el documento EP1722636.
- En algunas realizaciones, la lipasa es de *Fusarium oxysporum*, identificada en el documento EP 0 130 064, o en Hoshino et al. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem* 56: 660-664.
- En algunas realizaciones, la lipasa es fosfolipasa A2 pancreática porcina, expresada por ejemplo en *Aspergillus niger* (Cakezyme(TM), DSM).
- En algunas realizaciones, la lipasa es como se describe en el documento EP 0 869 167, en donde se describe la clonación y expresión de una lipasa de *Fusarium oxysporum* y su uso en horneado. La enzima se describe como que tiene actividad fosfolipasa. Esta enzima es vendida ahora por Novozymes A/S (Dinamarca) como Lipopan F<sup>TM</sup>.
- En algunas realizaciones, la lipasa es como se describe en la solicitud de patente internacional WO 02/00852, que describe cinco enzimas lipasa y sus polinucleótidos codificantes, aislados de *F. venenatum*, *F. sulphureum*, *A. berkeleyanum*, *F. culmorum* y *F. solani*. Se describe que las cinco enzimas tienen actividad hidrolizante del triacilglicerol, actividad fosfolipasa y galactolipasa. Tres de las enzimas tienen actividad equivalente a la enzima de *F. oxysporum* mostrada en el documento EP 0 869 167: *F. venenatum*, *F. sulphureum*, *F. culmorum*.
- En algunas realizaciones, la enzima modificadora de lípidos es una variante de una enzima lipolítica. Se han producido variantes de enzimas lipolíticas, con sustituciones y fusiones de aminoácidos específicas, algunas de las cuales tienen una actividad potenciada sobre los lípidos polares en comparación con las enzimas parentales de tipo salvaje. La solicitud de patente internacional WO01/39602 describe tal variante, denominada SP979, que es una fusión de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* y la lipasa de *Fusarium oxysporum* descritas en el documento EP 0 869 167. Se ha encontrado que esta variante tiene una relación de actividad significativamente alta sobre fosfolípidos y glicolípidos en comparación con triglicéridos.
- En algunas realizaciones, la enzima modificadora de lípidos es una lipasa o aciltransferasa.

- El término “lípidos aciltransferasa”, como se emplea en la presente memoria, significa una enzima que además de tener actividad lipasa (clasificada generalmente como E.C. 3.1.1.x de acuerdo con las Recomendaciones de Nomenclatura de Enzimas (1992) del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular) tiene también actividad aciltransferasa (clasificada generalmente como E.C. 2.3.1.x), por lo cual la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta uno o más sustratos aceptores, tales como uno o más de los siguientes: un esteroles; un estanol; un carbohidrato; una proteína; una subunidad de proteína; glicerol.
- En algunas realizaciones, la lípidos aciltransferasa para uso en los métodos de la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido (definido en la presente memoria) hasta uno o más de los siguientes sustratos aceptores de acilo: un esteroles, un estanol, un carbohidrato, una proteína o subunidades de la misma, o un glicerol.
- Para algunos aspectos el aceptor de acilo puede ser cualquier compuesto que comprenda un grupo hidroxilo (-OH), tal como por ejemplo, alcoholes polivalentes, incluyendo glicerol; esteroles; estanoles; carbohidratos; hidroxilácidos, que incluyen ácidos de frutas, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico y ácido ascórbico; proteínas o una subunidad de las mismas, tales como aminoácidos, hidrolizados de proteínas y péptidos (proteína hidrolizada parcialmente) por ejemplo; y mezclas y derivados de los mismos.
- En algunas realizaciones, el sustrato lípidos sobre el que actúa la lípidos aciltransferasa usada según la presente invención es uno o más de los siguientes lípidos: un fosfolípido, tal como una lecitina, p. ej. fosfatidilcolina, un triacilglicérido, una cardiolipina, un diglicérido, o un glicolípido, tal como digalactosildiglicérido (DGDG) por ejemplo. El término lecitina, como se emplea en la presente memoria, abarca fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.
- Para algunos aspectos, preferiblemente el sustrato lípidos sobre el que actúa la lípidos aciltransferasa es un fosfolípido, tal como lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina o fosfatidilinositol.
- En algunas realizaciones el sustrato lipídico es un lípidos de alimentos, es decir, un componente lipídico de un producto alimenticio.
- Adecuadamente, la lípidos aciltransferasa usada según la presente invención puede exhibir una o más de las siguientes actividades lipasa: actividad glicolipasa (E.C. 3.1.1.26), actividad triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3), actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32). El término “actividad glicolipasa”, como se emplea en la presente memoria, abarca “actividad galactolipasa”.
- Adecuadamente, la lípidos aciltransferasa usada según la presente invención puede tener al menos una o más de las siguientes actividades: actividad glicolipasa (E.C. 3.1.1.26) y/o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32) y/o actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4).
- Para algunos aspectos, preferiblemente la lípidos aciltransferasa usada según la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo desde un glicolípido y/o un fosfolípido a un esteroles y/o un estanol para formar al menos un éster de esteroles y/o un éster de estanol.
- Los aceptores de acilo de esteroles adecuados incluyen colesterol y fitosteroles, por ejemplo lafa-sitosterol, beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, campesterol, 5,6-dihidrosterol, brassicasterol, alfa-espinasterol, beta-espinasterol, gamma-espinasterol, deltaespinasterol, fucosterol, dimosterol, ascosterol, serbisterol, episterol, anasterol, hiposterol, condriasterol, desmosterol, calinosterol, poriferasterol, clionasterol, glicósidos de esteroides, y otras formas isoméricas y derivados naturales o sintéticos.
- En un aspecto, preferiblemente el aceptor de acilo es uno o más de los siguientes: alfa-sitosterol, beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, beta-sitostanol, ss-sitostanol o campesterol.
- Para algunos aspectos, preferiblemente la lípidos aciltransferasa usada según la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo desde un glicolípido y/o un fosfolípido a glicerol para formar al menos un diglicérido y/o un monoglicérido.
- Para algunos aspectos, uno o más esteroides presentes en el material vegetal que contiene lípidos pueden ser convertidos en uno o más estanoles antes de o al mismo tiempo que se añade la lípidos aciltransferasa según la presente invención. Puede emplearse cualquier método adecuado para convertir esteroides en estanoles. Por ejemplo, la conversión puede llevarse a cabo por hidrogenación química por ejemplo. La conversión puede realizarse antes de la adición de la lípidos aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o simultáneamente con la adición de la lípidos aciltransferasa de acuerdo con la presente invención. Se muestran enzimas adecuadas para la conversión de esteroles en estanoles en la solicitud de patente internacional WO00/061771.
- Adecuadamente la presente invención puede emplearse para producir ésteres de fitostanol en el material vegetal lipídico. Los ésteres de fitostanol tienen solubilidad aumentada a través de las membranas lipídicas, biodisponibilidad y beneficios para la salud potenciados (véase por ejemplo la solicitud de patente internacional WO92/99640).

Protocolo para la determinación del % de actividad aciltransferasa:

5 El material vegetal que contiene lípidos al que se ha añadido una lípido aciltransferasa según la presente invención puede extraerse siguiendo la reacción enzimática con  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  2:1, y la fase orgánica que contiene el material lipídico se aísla y se analiza por GLC y HPLC según el procedimiento detallado en la presente memoria más adelante. A partir de los análisis GLC y HPLC se determina la cantidad de ácidos grasos libres y uno o más de ésteres de esteroles/estanoles; ésteres de carbohidratos, ésteres de proteínas; diglicéridos; o monoglicéridos. Se analiza de la misma manera un control del material vegetal que contiene lípidos al que no se ha añadido enzima.

Cálculo:

10 A partir de los resultados de los análisis GLC y HPLC puede calcularse el aumento en ácidos grasos libres y/o ésteres de carbohidratos y/o ésteres de proteínas y/o diglicéridos y/o monoglicéridos:

$$\Delta \% \text{ ácido graso} = \% \text{ ácido graso(enzima)} - \% \text{ ácido graso(control)};$$

Mv ácido graso = peso molecular medio de los ácidos grasos;

$$A = \Delta \% \text{ éster de esteroles/Mv éster de esteroles}$$

15 (donde  $\Delta \% \text{ éster de esteroles} = \% \text{ éster de esteroles/estanol(enzima)} - \% \text{ éster de esteroles/estanol(control)}$ , y Mv éster de esteroles = peso molecular medio de los ésteres de esteroles/estanol) - aplicable donde el aceptor de acilo es un esteroles y/o estanol;

$$B = \Delta \% \text{ éster de carbohidrato/Mv éster de carbohidrato}$$

20 (donde  $\Delta \% \text{ éster de carbohidrato} = \% \text{ éster de carbohidrato(enzima)} - \% \text{ éster de carbohidrato(control)}$ , y Mv éster de carbohidrato = peso molecular medio del éster de carbohidrato) - aplicable donde el aceptor de acilo es un carbohidrato;

$$C = \Delta \% \text{ éster de proteína/Mv éster de proteína}$$

(donde  $\Delta \% \text{ éster de proteína} = \% \text{ éster de proteína(enzima)} - \% \text{ éster de proteína(control)}$  y Mv éster de proteína = peso molecular medio del éster de proteína) - aplicable donde el aceptor de acilo es una proteína; y

$$D = \text{valor absoluto de diglicérido y/o monoglicérido/Mv di/monoglicérido}$$

25 (donde  $\Delta \% \text{ diglicérido y/o monoglicérido} = \% \text{ diglicérido y/o monoglicérido (enzima)} - \% \text{ diglicérido y/o monoglicérido (control)}$ , y Mv di/monoglicérido = peso molecular medio del diglicérido y/o monoglicérido) - aplicable donde el aceptor de acilo es glicerol.

La actividad transferasa se calcula como porcentaje de la actividad enzimática total:

$$\% \text{ actividad transferasa} = \frac{A * + B * + C * \times 100}{A * + B * + C * + D * + \Delta \% \text{ ácido graso/(Mv ácido graso)}}$$

30 (\* - suprimir según sea apropiado)

La presente invención facilita la producción de un material vegetal que contiene lípidos en donde los lípidos han sido modificados a lípidos funcionales mediante la acción de enzimas lipolíticas. Esto puede usarse con o bien sin purificación de los lípidos funcionales como ingrediente de productos alimenticios.

35 Adecuadamente, la expresión "producto alimenticio", como se emplea en la presente memoria, puede significar un producto alimenticio en una forma que sea fácil para el consumo. Alternativamente o además, sin embargo, la expresión producto alimenticio, como se emplea en la presente memoria, puede significar uno o más materiales alimenticios que se usan en la preparación de un producto alimenticio. A modo de ejemplo sólo, la expresión producto alimenticio abarca tanto bienes horneados producidos a partir de masa como la masa usada en la preparación de dichos bienes horneados.

40 Adecuadamente, la expresión "producto alimenticio", como se emplea en la presente memoria, significa una sustancia para consumo humano y/o animal.

En otro aspecto, el producto alimenticio discutido en la presente memoria puede ser un pienso para animales.

45 El producto alimenticio puede seleccionarse de uno o más de los siguientes: huevos, productos a base de huevo, que incluyen, pero no se limitan a, mayonesa, aderezos para ensaladas, salsas, helados, huevo en polvo, yema de huevo modificada y productos preparados a partir de los mismos; bienes horneados, que incluyen panes, pasteles, productos de masa dulces, masas laminadas, mezclas líquidas para rebozar, bollos, donuts, bizcochos, galletas y pastas; golosinas, que incluyen chocolate, dulces, caramelos, halva, gominolas, que incluyen gominolas edulcoradas

- 5 exentas de azúcar y con azúcar, chicle, chicle blando, goma de mascar, y budines; productos congelados, que incluyen sorbetes, preferiblemente productos lácteos congelados, que incluyen helado y helado de leche; productos lácteos, que incluyen queso, mantequilla, leche, crema de café, nata montada, natillas, bebidas lácteas y yogures; mousses, cremas vegetales batidas, productos de carne, que incluyen productos de carne procesados; aceites y grasas comestibles, productos batidos aireados y no aireados, emulsiones aceite en agua, emulsiones agua en aceite, margarina, manteca y untables, que incluyen untables bajos en grasa y muy bajos en grasa; aderezos, mayonesa, salsas para untar, salsas a base de crema, sopas a base de crema, bebidas, emulsiones y salsas picantes.
- 10 Adecuadamente el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser un "alimento fino", que incluye pasteles, hojaldre, golosinas, chocolates, dulce de leche y similares.
- En un aspecto el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser un producto de masa o u producto horneado, tal como un pan, un producto frito, un aperitivo, pasteles, tartas, bizcochos de chocolate, pastas, fideos, fideos instantáneos, tortillas, artículos de aperitivo tales como galletas, galletas graham, pretzeles, y patatas fritas, y pasta, y cereales de desayuno.
- 15 En un aspecto adicional, el producto alimenticio puede ser un producto alimenticio derivado de plantas tales como harinas, premezclas, aceites, grasas, manteca de cacao, blanqueante de café, aderezos para ensalada, margarina, untables, manteca de cacahuete, manteca, helado, aceites para cocinar.
- En otro aspecto, el producto alimenticio puede ser un producto lácteo, que incluye mantequilla, leche, crema, queso tales como quesos naturales, procesados, y de imitación en diversas formas (que incluyen en tiras, bloque, lonchas o rallado), crema de queso, helado, postres congelados, yogur, bebidas de yogur, grasa de mantequilla, grasa de leche anhidra, otros productos lácteos. La enzima usada según la presente invención puede mejorar la estabilidad de las grasas en los productos lácteos.
- 20 En otro aspecto, el producto alimenticio puede ser un producto alimenticio que contiene ingredientes derivados de animales, tales como productos de carne procesados, aceites para cocinar, mantecas.
- 25 En un aspecto adicional, el producto alimenticio puede ser una bebida, una fruta, fruta mixta, un vegetal o vino. En algunos casos la bebida puede contener hasta 20 g/l de fitosteroles añadidos derivados de la invención.
- En un aspecto adicional, el producto alimenticio puede ser un pienso para animales. El pienso para animales puede ser enriquecido con fitosterol y/o fitostanoles, preferiblemente con beta-sitosterol/estanol. Adecuadamente, el pienso para animales puede ser un pienso para aves de corral. Cuando el producto alimenticio es pienso para aves de corral, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para disminuir el contenido de colesterol de huevos producidos por aves de corral alimentadas con el producto alimenticio.
- 30 El producto alimenticio puede seleccionarse de uno o más de los siguientes: huevos, productos a base de huevo, que incluyen mayonesa, aderezos para ensaladas, salsas, helado, huevo en polvo, yema de huevo modificada y productos preparados a partir de los mismos.
- 35 Preferiblemente el producto alimenticio según la presente invención es un producto alimenticio que contiene agua. Adecuadamente el producto alimenticio puede estar comprendido de 10-98% de agua, adecuadamente 14-98%, adecuadamente de 18-98% de agua, adecuadamente de 20-98%, adecuadamente de 40-98%, adecuadamente de 50-98%, adecuadamente de 70-98%, adecuadamente de 75-98%.
- 40 En un aspecto de esta invención el lípido funcional producido a partir del material vegetal que contiene lípidos es un emulsionante. Preferiblemente, se genera al menos un emulsionante en el material vegetal que contiene lípidos.
- En un aspecto de la invención se generan al menos dos emulsionantes diferentes en el material que contiene lípidos.
- En un aspecto de la invención se generan al menos tres emulsionantes diferentes en el material que contiene lípidos.
- 45 En un aspecto de la invención se generan al menos cuatro emulsionantes en el material que contiene lípidos.
- Adecuadamente, el emulsionante de acuerdo con la presente invención puede ser por ejemplo uno o más de los siguientes: un diglicérido, un monoglicérido, tal como 1-monoglicérido o una lisolecitina, tal como lisofosfatidilcolina o fosfatidilinositol, por ejemplo, un monoglicérido de digalactosidilo (DGMG). El emulsionante se produce preferiblemente desde el donador de acilo lipídico después de la retirada de uno o más grupos acilo de dicho donador de acilo lipídico. El término lisolecitina, como se emplea en la presente memoria, abarca lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidilglicerol. El término lisofosfatidilcolina, como se emplea en la presente memoria, es sinónimo con el término lisolecitina, y estos términos pueden usarse en la presente memoria de manera intercambiable.
- 50 Donde uno de los emulsionantes es un éster de proteína y/o un diglicérido y/o un monoglicérido, el segundo

emulsionante puede ser por ejemplo uno o más de los siguientes: un diglicérido, un monoglicérido, tal como 1-monoglicérido, lipofosfatidilcolina, o monoglicérido de digalactosilo (DGMG). El segundo emulsionante es producido preferiblemente desde el donador de acilo lipídico después de la retirada de uno o más grupos acilo de dicho donador de acilo lipídico.

- 5 Los lípidos funcionales generados descritos en la presente memoria pueden usarse en un procedimiento para la preparación de un producto alimenticio.

Los lípidos funcionales según la presente invención pueden usarse con uno o más otras enzimas de calidad alimentaria adecuadas. Por tanto, está dentro del alcance de la presente invención que, además de los lípidos funcionales de la invención, se añade al menos una enzima adicional al producto alimenticio. Tales enzimas  
10 adicionales incluyen enzimas degradadoras del almidón tales como endo- o exoamilasas, pululanasa, enzimas desramificadoras, hemicelulasas, que incluyen xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, p. ej. glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfhidrilo oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como una que oxide la maltosa, por ejemplo hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas, glucolipasas y hexosa oxidasa, y proteasas.

El material vegetal que contiene lípidos tratado con enzimas lipolíticas para generar lípidos funcionales según la presente invención puede usarse sin purificación o con purificación limitada de los lípidos funcionales junto con una o más otras enzimas de calidad alimentaria adecuadas. Por tanto, está dentro del alcance de la presente invención que, además de los lípidos funcionales purificados o no purificados de la invención, se añade al menos una enzima  
15 adicional al producto alimenticio. Tales enzimas adicionales incluyen enzimas degradadoras del almidón tales como endo- o exoamilasas, pululanasa, enzimas desramificadoras, hemicelulasas, que incluyen xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, p. ej. glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfhidrilo oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como una que oxide la maltosa, por ejemplo hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas, glucolipasas y hexosa oxidasa, y proteasas.

En una realización preferida la enzima lipolítica tiene una o más de las siguientes actividades lipasa: actividad glicolipasa (E.C. 3.1.1.26), actividad triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3), actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32). Adecuadamente, las enzimas lipasa son bien conocidas dentro de la técnica, e incluyen, a modo de ejemplo, las siguientes lipasas: Grindamyl Powerbake 4070 o 4080 (Danisco A/S), Lysomax Oil (Danisco A/S), Lipopan® F, Lipopan® Xtra, y/o LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipasa A2 (p. ej. fosfolipasa A2 de LIPOMOD™ 22L de Biocatalysts, LIPOMAX™ de Genencor), LIPOLASE®  
25 (Novozymes A/S, Dinamarca), Panomore™ (DSM Nutritional Products), las lipasas mostradas en la solicitud de patente internacional WO03/97835, los documentos EP 0 977 869 o EP 1 193 314. Un experto en la técnica podrá combinar proporciones de enzimas lipolíticas.

Tradicionalmente la industria de los pasteles usa mejoradores de pasteles para la producción de pasteles y para asegurar pasteles de alta calidad en términos de sabor, estructura, calidad comestible y apariencia. Estos mejoradores de pasteles están basados normalmente en emulsionantes secados por rociado en un vehículo como  
35 almidón y maltodextrina. Algunos mejoradores de pasteles también están en una forma de gel basada en emulsionantes, azúcares y agua. Estos mejoradores de pasteles son muy importantes para la industria de los pasteles para producir un pastel de alta calidad. Los mejoradores de pasteles, sin embargo, contienen emulsionantes y otros ingredientes “no naturales” con un número E. Debido a la demanda para que los consumidores reduzcan los números de números E, la industria de los pasteles ha pedido maneras alternativas de producir pasteles de alta calidad sin usar este tipo de emulsionantes.

El material vegetal que contiene lípidos tratado con enzimas lipolíticas para generar lípidos funcionales según la presente invención puede usarse como mejoradores de alimentos, bien sin purificación o bien con purificación limitada de los lípidos funcionales o como lípidos funcionales purificados completamente.

En un aspecto de la invención el mejorador de alimentos es un mejorador de pasteles.

- 45 En un aspecto de la invención el mejorador de alimentos es un mejorador de pan.

El mejorador de alimentos generado según la presente invención puede comprender adecuadamente uno o más de los siguientes aditivos:

material de proteína de soja; carotenoides, flavenoides, antioxidante y fitoquímico (especialmente antocianonida, carotenoide, bioflavinoide, glutatión, catequina, isoflavona, licopeno, ginsenósido, picnogenol, alcaloide, fitosterol de pigeo, sulforafona, resveretrol, extracto de semilla de uva o alimento que contiene ésteres de estanol), vitamina  
50 (especialmente vitamina C, vitamina A, vitamina B3, vitamina D, vitamina E, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cianocobalamina, ácido fólico, biotina, ácido pantoténico o vitamina K), minerales (especialmente calcio, yodo, magnesio, cinc, hierro, selenio, manganeso, cromo, cobre, cobalto, molibdeno o fósforo), ácido graso (especialmente ácido gamma-linoleico, ácido ucospentaenoico o ácido decosahexaenoico), aceite (especialmente aceite de borraja, aceite de colza de alto contenido en carotenoides o aceite de semilla de lino), glucerol, sorbitol, aminoácido  
55 (especialmente triptófano, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, leucina, isoleucina, alanina, arginina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, prolina, hidroxiprolina, serina, taurina o tirosina), enzima definida anteriormente (especialmente bromelaína, papaína, amilasa, celulasa o coenzima Q),

lignina, éster de estanol o bacterias amistosas (especialmente *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus plantarum* o *Streptococcus faecium*), ácido fólico, fibra insoluble y/o soluble.

5 La presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en productos de huevo, particularmente mayonesa: estabilidad al calor mejorada durante la pasteurización; propiedades organolépticas mejoradas, una consistencia mejorada.

10 La presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en masa y/o productos horneados: un volumen específico mejorado de la masa o bien de los productos horneados (por ejemplo de pan y/o de pastel); una estabilidad de la masa mejorada; una puntuación de corteza mejorada (por ejemplo una corteza de pan más fina y/o más crujiente), una puntuación de miga mejorada (por ejemplo una distribución de miga más homogénea y/o una estructura de miga más fina y/o una miga más blanda); una apariencia mejorada (por ejemplo una superficie lisa sin ampollas o agujeros o sustancialmente sin ampollas o agujeros); un enranciamiento reducido; una blandura potenciada; un olor mejorado; un sabor mejorado.

15 La presente invención puede proporcionar un efecto beneficioso a partir de los lípidos funcionales, ya que éstos funcionan como materiales altamente activos en superficie en un producto alimenticio sin la formación de una cantidad sustancial de ácidos grasos libres, lo que reduce la posibilidad de que el producto alimenticio se oxide en el almacenamiento, porque los ácidos grasos libres son más propensos a la oxidación que los ésteres de ácidos grasos correspondientes.

Puede usarse una enzima lipolítica para generar otros compuestos funcionales en un material vegetal que contiene lípidos.

20 Es de entender que la acción de las enzimas modificadoras de lípidos, tales como enzimas lipolíticas, sobre el material vegetal que contiene lípidos puede no sólo generar lípidos funcionales, sino también otros compuestos funcionales, tal como con la acción de una lipido transferasa, en donde un grupo acilo de un lípido es transferido a uno o más otros sustratos aceptores, tales como uno o más de los siguientes: un esteroles; un estanol; un carbohidrato; una proteína; una subunidad de proteína; y glicerol.

25 En algunas realizaciones particulares los compuestos funcionales generados en los métodos según la presente invención son ésteres funcionales.

En algunas realizaciones, se generan tanto lípidos funcionales como otros compuestos funcionales por los métodos según la presente invención.

30 Estos compuestos funcionales generados por los métodos según la presente invención pueden usarse después en la fabricación de una masa y/o un producto horneado, que comprende añadir dichos compuestos funcionales a una masa, y (opcionalmente) hornear la masa para preparar un producto horneado para uno o más de lo siguiente: reducir la pegajosidad de la masa; mejorar la maquinabilidad de la masa; reducir la formación de ampollas durante el horneado del producto horneado; mejorar el volumen y/o la blandura de pan; prolongar la vida útil del producto horneado y/o la masa; mejorar el efecto antienranciamiento del producto horneado y/o la masa; mejorar la estructura de las migas del producto horneado; reducir la heterogeneidad de poros del producto horneado; mejorar la homogeneidad de poros del producto horneado; reducir el tamaño de poro medio del producto horneado; potenciar el índice de gluten de la masa; mejorar el sabor y/o el olor del producto horneado, mejorar el color de la miga del producto horneado.

40 En un aspecto los compuestos funcionales generados por los métodos según la presente invención son purificados o parcialmente purificados.

En un aspecto los compuestos funcionales generados por los métodos según la presente invención no son purificados adicionalmente antes del uso en un producto alimenticio.

En un aspecto los compuestos funcionales generados por los métodos según la presente invención son formulados en un producto seco.

45 En un aspecto los compuestos funcionales se concentran o diluyen antes del uso en un producto alimenticio.

En otro aspecto de la invención, puede usarse un método de la invención para preparar fideos, o una masa de fideos o un producto a base de fideos, método que comprende añadir un compuesto funcional según la presente invención al fideo, masa de fideos o producto a base de fideos.

50 Puede usarse un compuesto funcional según la presente invención en la fabricación de un fideo o un producto a base de fideos para uno o más de mejorar el color/amarillez, estabilizar características de color, reducir el brillo, reducir el contenido de grasa, mejorar la textura y la masticación, reducir la actividad del agua, reducir la rotura, aumentar la firmeza del núcleo y mejorar la retención de la forma durante el procesamiento.

En otro aspecto de la invención, puede usarse un método de la invención para preparar una tortilla o masa de tortilla, método que comprende añadir un mejorador de alimentos generado según la presente invención a la tortilla o masa

de tortilla.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar pasta o pasta de grano entero o una masa de pasta, método que comprende añadir un mejorador de alimentos generado según la presente invención a la pasta o masa de pasta.

- 5 Puede usarse un mejorador de alimentos generado según el método de la presente invención en la fabricación de una tortilla o una masa de tortilla para mejorar la capacidad de enrollamiento de una tortilla, aumentar la flexibilidad de una tortilla, mejorar las propiedades antienranciamiento de la tortilla y/o masa de tortilla, mejorar la blandura y/o reducir el mal sabor en la tortilla y/o masa de tortilla.

- 10 La funcionalidad del mejorador de alimentos puede ser mejorada por combinación con emulsionantes tales como DATEM.

Adecuadamente, la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en un producto alimenticio: una apariencia mejorada, una sensación en la boca mejorada, una estabilidad mejorada, en particular una estabilidad térmica mejorada, un sabor mejorado, una blandura mejorada, una resiliencia mejorada, una emulsión mejorada.

- 15 Adecuadamente, la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en productos lácteos, tales como helado por ejemplo: una sensación en la boca mejorada (preferiblemente una sensación en la boca más cremosa); un sabor mejorado; una fusión mejorada.

- 20 Adecuadamente, la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en huevo o productos de huevo: estabilidad de emulsión mejorada; estabilidad térmica de emulsión mejorada; sabor mejorado; mal olor reducido; propiedades de espesamiento mejoradas, consistencia mejorada.

Se enumeran en la tabla a continuación efectos técnicos específicos asociados con el uso del mejorador de alimentos definido en la presente memoria en la preparación de un producto alimenticio:

	Producto alimenticio	Efecto
1	Pan, bollos y donuts	Refuerza la masa y aumenta la resistencia mecánica y aumenta la capacidad de absorción de agua. Aumenta el volumen de productos de panadería y mantiene la blandura de la miga
2	Masa congelada	Impide que se estropee durante la refrigeración
3	Bizcocho	Hace un buen volumen de pastel y una textura blanda uniforme
4	Bizcocho, galleta y pasta	Hace emulsiones estables de grasa e impide que se pegue a la máquina. Impide la formación de capas de grasa en productos altos en grasa
5	Rebozado y empanado	Mejora la textura de productos fritos.
6	Fideos	Impide que la masa se pegue a la máquina. Aumenta el contenido de agua, y disminuye la pérdida por cocción
7	Fideos instantáneos	Impide que los fideos se adhieran unos a otros
8	Pasta	El acondicionador de la masa impide la adhesión al cocer
9	Natillas	Hace una pasta almidonada con una textura suave y cremosa, e impide la deshidratación.
10	Blanqueador de café	Impide la separación del aceite y agua
11	Nata montada	Proporciona una emulsión estable
12	Chocolate	Impide o reduce la formación de capas de grasa
13	Caramelo, dulce y turrón	Mejora la emulsión de azúcar fundido y aceite. Impide la separación del aceite.
14	Carne procesada, salchichas	Mejora la capacidad de retención de agua de salchichas y jamón prensado, e impide la separación de la fase oleosa de mantecas y paté.

Como se discute en la presente memoria, la presente invención proporciona el uso de una enzima lipolítica en un procedimiento para preparar lípidos funcionales.

- 25 En otro aspecto de la presente invención el método puede implicar preparar un liso-fosfolípido, por ejemplo lisolecitina, procedimiento que comprende tratar un material vegetal que contiene lípidos con la enzima lipolítica

según la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención el método puede implicar preparar un liso-glicolípido, (por ejemplo monoglicérido de digalactosilo (DGMG) o monoglicérido de monogalactosilo (MGMG)) por tratamiento de un material vegetal que contiene lípidos con la enzima lipolítica según la presente invención.

- 5 Como se describe en la presente memoria, la suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente puede estar esencialmente exenta de almidón.

10 Por ejemplo, menos que aproximadamente 50%, tal como menos que aproximadamente 40%, tal como menos que aproximadamente 30%, menos que aproximadamente 20%, tal como menos que aproximadamente 10%, tal como menos que aproximadamente 6%, tal como menos que aproximadamente 3%, tal como menos que aproximadamente 1% (en peso) de la suspensión líquida de un material vegetal que contiene lípidos solubilizado al menos parcialmente es almidón o componentes que contienen almidón, tales como harina.

15 Por consiguiente, en algunas realizaciones es de entender que las enzimas son para tener un efecto enzimático sobre el material vegetal que contiene lípidos que está esencialmente exento de almidón o que sólo contiene almidón residual de una etapa de procesamiento previa. La presente invención no pretende cubrir el tratamiento enzimático de composiciones con preparaciones de harina añadida adicionales, tales como aplicaciones enzimáticas de preparación de pan in situ.

Determinación de la actividad galactolipasa (ensayo de actividad glicolipasa):

Sustrato:

20 Se disolvió diglicérido de digalactosilo al 0,6% (Sigma D 4651), Triton-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0,05M, pH 7.

Procedimiento del ensayo:

25 Se añadieron 400 µl del sustrato a un tubo de Eppendorf de 1,5 ml y se puso en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 5 minutos. En el tiempo t= 0 min, se añadieron 50 µl de disolución de enzima. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló a 10\*100 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 10 minutos. En el tiempo t=10 min el tubo de Eppendorf se puso en otro termomezclador a 99°C durante 10 minutos para detener la reacción.

El ácido graso libre en las muestras se analizó usando el kit NEFA C de WAKO GmbH.

La actividad enzimática GLU a pH 7 se calculó como micromoles de ácido graso producido por minuto bajo las condiciones del ensayo.

- 30 Determinación de la actividad fosfolipasa (ensayo de actividad fosfolipasa):

La actividad fosfolipasa se midió usando dos métodos diferentes que dan resultados comparables. Puede usarse cualquiera de estos métodos para determinar la actividad fosfolipasa de acuerdo con la presente invención.

“Ensayo PLY” para la determinación de la actividad fosfolipasa

Sustrato:

35 Se disolvió L-α fosfatidilcolina al 0,6%, 95% Planta (Avanti #441601), Triton-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0,05M, pH 7.

Procedimiento del ensayo:

40 Se añadieron 400 µl del sustrato a un tubo de Eppendorf de 1,5 ml y se puso en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 5 minutos. En el tiempo t= 0 min, se añadieron 50 µl de disolución de enzima. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló a 10\*100 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 10 minutos. En el tiempo t=10 min el tubo de Eppendorf se puso en otro termomezclador a 99°C durante 10 minutos para detener la reacción.

El ácido graso libre en las muestras se analizó usando el kit NEFA C de WAKO GmbH.

45 La actividad enzimática PLU-7 a pH 7 se calculó como micromoles de ácido graso producido por minuto bajo las condiciones del ensayo.

“Ensayo TIPU” para la determinación de la actividad fosfolipasa

1 TIPU (Unidad de Fosfolipasa de Titulación) se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de ácido graso libre por minuto en las condiciones del ensayo.

La fosfolipasa A1 y A2 catalizan la conversión de lecitina en iso-lecitina con liberación del ácido graso libre de la posición 1 y 2, respectivamente. La actividad fosfolipasa puede determinarse por titulación continua de los ácidos grasos liberados de la lecitina durante la enzimación, dado que el consumo de álcali es igual a la cantidad de ácido graso liberado.

5 Sustrato:

Lecitina al 4%, Triton-X 100 al 4% y CaCl<sub>2</sub> 6 mM: Se dispersaron 12 g de lecitina en polvo (Avanti Polar Lipids #44160) y 12 g de Triton-X 100 (Merck 108643) en aprox. 200 ml de agua desmineralizada durante agitación magnética. Se añadieron 3,0 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,6 M (p.a. Merck 1.02382). Se ajustó el volumen a 300 ml con agua desmineralizada y la emulsión se homogeneizó usando un Ultra Thurax. El sustrato se preparó fresco cada día.

10 Procedimiento del ensayo:

Se preparó una disolución de enzima para dar una pendiente en la curva de titulación entre 0,06 y 0,18 ml/min con una adición de 300 µl de enzima.

Se incluye una muestra de control de actividad conocida.

Las muestras se disolvieron en agua desmineralizada y se agitaron durante 15 minutos a 300 rpm.

15 Se calentaron en termostato a 37,0°C 25,00 ml de sustrato durante 10-15 minutos antes de ajustar el pH a 7,0 con NaOH 0,05 M. Se añadieron 300 µl de disolución de enzima al sustrato y se llevó a cabo la titulación continua con NaOH 0,05 M usando un titulador pH-Stat (Phm 290; Mettler Toledo). Se hacen dos determinaciones de actividad en cada escalado.

20 Después de 8 minutos se detiene la titulación y se calcula la pendiente de la curva de titulación entre 5 y 7 minutos. El límite de detección es 3 TIPU/min de disolución de enzima.

Cálculos:

La actividad fosfolipasa (TIPU/g de enzima) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{TIPU/g} = \frac{\alpha \cdot N \cdot 10^6 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mol}} \cdot 10^{-3} \frac{\text{l}}{\text{ml}} \cdot V_1}{m \cdot V_2} = \frac{\alpha \cdot N \cdot 10^3 \cdot V_1}{m \cdot V_2}$$

Donde:

25 α es la pendiente de la curva de titulación entre 5 y 7 minutos de tiempo de reacción (ml/min).

N es la normalidad del NaOH usado (mol/l).

V1 es el volumen en el que la enzima está disuelta (ml).

m es la cantidad de enzima añadida a V1 (g).

V2 es el volumen de disolución de enzima añadida al sustrato (ml).

30 Determinación de la actividad triacilglicérido lipasa: ensayo basado en triglicérido (tributirina) como sustrato (LIPU):

La actividad lipasa basada en tributirina se mide según Food Chemical Codex, Forth Edition, National Academy Press, 1996 , p 803, con las modificaciones de que la muestra se disuelve en agua desionizada en lugar de tampón glicina, y el punto de ajuste del pH stat es 5,5 en lugar de 7.

35 1 LIPU se define como la cantidad de enzima que puede liberar 1 mol de ácido butírico por minuto bajo las condiciones del ensayo.

40 En un aspecto de la invención, la enzima lipolítica usada según la presente invención puede ser obtenible de un hongo filamentoso. Más preferiblemente, la enzima lipolítica fúngica es obtenible (preferiblemente obtenida) de *Fusarium* spp. Preferiblemente, la enzima lipolítica fúngica usada según la presente invención puede ser obtenible (preferiblemente obtenida) de *Fusarium heterosporum* o *Fusarium semitectum*. Adecuadamente, la enzima lipolítica fúngica usada según la presente invención puede ser obtenible (preferiblemente obtenida) de *Fusarium heterosporum* (CBS 782.83) o *Fusarium semitectum* (IBT 9507).

Por tanto, en un aspecto, preferiblemente, la enzima lipolítica fúngica usada según la presente invención es una enzima lipolítica fúngica filamentosa, preferiblemente una enzima lipolítica fúngica de tipo salvaje.

En algunas de las aplicaciones mencionadas en la presente memoria, particularmente las aplicaciones para

alimentos, tales como aplicaciones de panadería, el mejorador de alimentos generado según la presente invención puede usarse con uno o más emulsionantes convencionales, que incluyen por ejemplo monoglicéridos, ésteres de ácido acetiltartárico de mono- o diglicéridos de ácidos grasos, estearoil-lactilato de sodio (SSL) y lecitinas.

5 El mejorador de alimentos generado por los métodos según la presente invención es preferido especialmente en recetas de pan con grasa añadida.

Además o alternativamente, el mejorador de alimentos generado por los métodos según la presente invención puede usarse con una o más de otras enzimas de calidad alimentaria adecuadas. Por tanto, está dentro del alcance de la presente invención que, además de la enzima lipolítica de la presente invención, puede añadirse al menos una enzima adicional al producto horneado y/o la masa. Tales enzimas adicionales incluyen enzimas degradadoras del almidón tales como endo- o exoamilasas, pululaninas, enzimas desramificadoras, hemicelulasas, que incluyen xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, p. ej. glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfhidrilo oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como una que oxida la maltosa, por ejemplo hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas, galactolipasas u hexosa oxidasa, proteasas, y aciltransferasas (tales como las descritas en la solicitud de patente internacional WO04/064987 por ejemplo).

15 Se prefiere particularmente que la enzima lipolítica usada según la presente invención se use en combinación con alfa amilasas al producir productos alimenticios. En particular, la amilasa puede ser una amilasa no maltogénica, tal como un polipéptido que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en particular, actividad glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60) (descrita en la solicitud de patente internacional WO05/003339). Una amilasa no maltogénica adecuada está disponible en el mercado como Powersoft™ (disponible en Danisco A/S, Dinamarca).  
20 También pueden usarse amilasas maltogénicas tales como Novamyl™ (Novozymes A/S, Dinamarca). En una realización, el uso combinado de alfa amilasas y el mejorador de alimentos de la invención puede usarse en una masa, y/o la producción de un producto horneado, tal como pan, pasteles, donuts, donuts de pastel o bageles. La combinación de alfa amilasas y el mejorador de alimentos de la invención también se considera como preferible para uso en métodos de producción de tortillas, tales como tortillas de trigo y/o maíz.

25 En otra realización preferida, el mejorador de alimentos generado según la presente invención puede usarse en combinación con una xilanasas al producir productos alimenticios. GRINDAMYL™ y POWERBake 7000 son ejemplos de enzimas xilanasas disponibles en el mercado, disponibles en Danisco A/S. Pueden encontrarse otros ejemplos de enzimas xilanasas en las solicitudes de patente internacionales WO03/020923 y WO01/42433.

30 Preferiblemente, el mejorador de alimentos generado según la presente invención puede usarse en combinación con una xilanasas y una alfa amilasa. Adecuadamente la alfa amilasa puede ser una alfa amilasa maltogénica, o una no maltogénica (tales como GRINDAMYL™ o POWERSoft, disponibles en el mercado en Danisco A/S), o una combinación de las mismas.

35 El mejorador de alimentos de la invención también puede usarse preferiblemente en combinación con una enzima oxidante, tal como una enzima oxidante de maltosa (MOX), por ejemplo hexosa oxidasa (HOX). Se describen métodos adecuados en la solicitud de patente internacional WO03/099016. Las enzimas oxidantes de maltosa disponibles en el mercado GRINDAMYL™ y SUREBake están disponibles en Danisco A/S.

40 Opcionalmente puede usarse en los métodos según la presente invención una alfa amilasa, tal como una exoamilasa no maltogénica y/o una amilasa maltogénica, y/o una enzima oxidante de maltosa (MOX) en combinación con la enzima para preparar una masa, un producto horneado, tortilla, pastel, pasta, fideo instantáneo/alimento de aperitivo frito, o un producto lácteo tal como queso.

45 El mejorador de alimentos generado según la presente invención se incluye típicamente en el producto alimenticio u otra composición por métodos conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen añadir el mejorador de alimentos directamente al producto alimenticio o composición, adición del mejorador de alimentos en combinación con un estabilizante y/o vehículo, y adición de una mezcla que comprende el mejorador de alimentos y un estabilizante y/o vehículo.

Los estabilizantes adecuados para uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sales inorgánicas (tales como NaCl, sulfato de amonio), sorbitol, emulsionantes y detergentes (tales como Tween 20, Tween 80, Panodan AB100 sin triglicéridos, poligliceroléster, monooleato de sorbitán), aceite (tal como aceite de colza, aceite de semilla de girasol y aceite de soja), pectina, trehalosa, sorbitol y glicerol.

50 Los vehículos adecuados para uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, almidón, harinas de cereales, trigo molido, harina de trigo, NaCl y citrato.

55 Para productos horneados, tales como pan, bollos al vapor, y pan de molde blanco de EE.UU., por ejemplo, la adición de un mejorador de alimentos de la presente invención puede dar como resultado uno o más de lo siguiente: volumen y blandura del pan mejorados, vida útil prolongada y/o un efecto antienranciamiento, estructura de la miga mejorada, heterogeneidad de poros reducida, tamaño medio de poro reducido, índice de gluten potenciado, sabor y/o olor mejorado, y color de la corteza mejorado.

- Ventajosamente, el mejorador de alimentos generado según la presente invención puede usarse para reemplazar emulsionantes en productos alimenticios, tales como masa y/o productos horneados.
- 5 El mejorador de alimentos generado según la presente invención puede tener sinergia con emulsionantes tales como DATEM, SSL, CSL, monoglicérido, polisorbatos y Tween. Por tanto, el mejorador de alimentos generado según la presente invención puede usarse en combinación con uno o más emulsionantes. Ventajosamente, el uso del mejorador de alimentos generado según la presente invención en combinación con uno o más emulsionantes puede reducir la cantidad global de emulsionante usado en comparación con la cantidad necesitada cuando no se usa mejorador de alimentos generado según la presente invención.
- 10 El mejorador de alimentos generado según la presente invención puede tener también sinergia con hidrocoloides, Guar, xantana y pectina, y con enzimas oxidantes de la maltosa tales como hexosa oxidasa.
- Para donuts, donuts de pastel, bageles, pasteles de aperitivo y bollos, por ejemplo, el uso de un mejorador de alimentos de la presente invención puede dar como resultado un efecto sinérgico cuando se usa en combinación con una o más de alfa-amilasas, alfa-amilasa maltogénica y alfa-amilasa no maltogénica.
- 15 Para pasteles, bizcochos y palmeras, por ejemplo, el uso de un mejorador de alimentos de la presente invención puede dar como resultado un efecto sinérgico cuando se usa en combinación con una o más de hidrocoloides tales como Guar, y/o uno o más emulsionantes tales como DATEM.
- Para bizcochos, por ejemplo, el uso de un mejorador de alimentos generado según la presente invención confiere capacidad de enrollamiento y propiedades de manipulación mejoradas, particularmente cuando está frío (capacidad de enrollamiento en frío).
- 20 Ventajosamente, en mayonesa y otros productos a base de huevo, por ejemplo, el uso de un mejorador de alimentos generado según la presente invención puede conducir a textura mejorada, tamaño medio de partícula reducido, y/o distribución media de partículas reducida, estabilidad al calor mejorada, rendimiento y/o estabilidad en microondas mejorados.
- 25 En pasteles, el uso de la presente invención conduce ventajosamente a blandura mejorada, volumen, propiedades de conservación y vida útil mejoradas.
- Para fideos o productos de fideos, p. ej. fideos instantáneos, el mejorador de alimentos de la presente invención puede conferir una o más de las siguientes características: color/amarillez mejorados, características de color más estables, brillo reducido, contenido de grasa reducido, textura y mordedura (masticación) mejoradas, actividad del agua reducida, rotura reducida, firmeza del núcleo aumentada y retención de la forma mejorada durante el procesamiento.
- 30 Preferiblemente, el mejorador de alimentos de la presente invención puede usarse para reducir el contenido de grasa de un fideo o producto de fideos, por ejemplo un fideo instantáneo.
- En tortilla, por ejemplo, el uso del mejorador de alimentos generado según la presente invención puede dar como resultado uno o más de lo siguiente: capacidad de enrollamiento de la tortilla reducida, por ejemplo aumentando la flexibilidad, propiedades antienciamiento mejoradas, mejorando la blandura y/o reduciendo el mal sabor.
- 35 Ventajosamente, la capacidad de enrollamiento y/o la flexibilidad pueden conducir a una probabilidad reducida de que la tortilla se rompa cuando se enrolla.
- El mejorador de alimentos generado según la presente invención es particularmente útil en la preparación de productos horneados, tales como los preparados a partir de una masa, que incluyen panes, pasteles, productos de masa dulces, masas laminadas, rebozados líquidos, bollos, donuts, bizcochos, galletas y pastas.
- 40 El mejorador de alimentos generado según la presente invención es particularmente útil en la preparación de cereales de desayuno, tales como los preparados a partir de una masa.
- El mejorador de alimentos también puede usarse en aditivo mejorador del pan, p. ej. composiciones de masa, aditivo de masa, acondicionadores de masa, premezclas y preparaciones similares añadidas convencionalmente a la harina y/o la masa durante los procedimientos para preparar pan u otros productos horneados para proporcionar propiedades mejoradas al pan u otros productos horneados.
- 45 Por tanto, una composición mejoradora del pan y/o una composición mejoradora de la masa puede comprender un mejorador de alimentos generado según la presente invención; una masa o producto horneado puede comprender tal composición mejoradora del pan y/o composición mejoradora de la masa.
- 50 La composición mejoradora del pan y/o composición mejoradora de la masa puede comprender, además de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención, otras sustancias, sustancias que se usan convencionalmente en el horneado para mejorar las propiedades de la masa y/o productos horneados.

La composición mejoradora del pan y/o composición mejoradora de la masa puede comprender uno o más agentes de horneado convencionales, tales como uno o más de los siguientes constituyentes:

Una leche en polvo, gluten, un emulsionante, grasa granulada, un oxidante, un aminoácido, un azúcar, una sal, harina o almidón.

- 5 Son ejemplos de emulsionantes adecuados: monoglicéridos, ésteres de ácido acetiltartárico de mono- o diglicéridos de ácidos grasos, estearoil-lactilato de sodio (SSL) y lecitinas.

10 La composición mejoradora del pan y/o de la masa puede comprender además otra enzima, tal como una o más otras enzimas de calidad alimentaria adecuadas, que incluyen enzimas degradadoras del almidón tales como endo- o exoamilasas, pululanasa, enzimas desramificadoras, hemicelulasas, que incluyen xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, p. ej. glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfhidrilo oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como una que oxide la maltosa, por ejemplo hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas, glucolipasas y hexosa oxidasa, proteasas y aciltransferasas (tales como las descritas en la solicitud de patente internacional WO04/064987 por ejemplo).

15 La expresión "producto horneado", como se emplea en la presente memoria, incluye un producto preparado a partir de una masa. Ejemplos de productos horneados (ya sea de tipo blanco, claro u oscuro) que pueden producirse ventajosamente mediante la presente invención incluyen uno o más de los siguientes: pan (que incluye pan blanco, de harina entera y de centeno), típicamente en la forma de barras o rollos o tostado, pan de tipo baguette francesa, pan de pita, tortillas, tacos, pasteles, tortitas, bizcochos, pan crujiente, pasta, fideos y similares.

20 La masa de acuerdo con la presente invención puede ser una masa fermentada o una masa para ser sometida a fermentación. La masa puede ser fermentada de diversas maneras, tales como añadiendo bicarbonato de sodio o similar, o añadiendo un cultivo de levadura adecuado tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del panadero).

La masa de acuerdo con la presente invención puede ser masa para la preparación de un producto de cereal seco, un pan crujiente, un bizcocho o una galleta.

25 Como se discutió anteriormente, la presente invención se refiere a un método para la producción de un producto alimenticio seleccionado de pan, un cereal de desayuno, una pasta, bizcochos, pastas y aperitivos, en donde dicho método comprende la generación de un extracto de fibra de cereal que comprende lípidos modificados, tales como lípidos funcionales de fibra de cereal que contiene lípidos, y en donde dicho método comprende la etapa de tratar una suspensión líquida de una fibra de cereal que contiene lípidos solubilizada al menos parcialmente que tiene un grado de solubilización más alto que 1% con una fosfolipasa, en donde menos que 20% (en peso) de la suspensión líquida de dicha fibra de cereal que contiene lípidos es almidón o componentes que contienen almidón, y en donde el contenido total de lípidos y lípidos modificados, tales como lípido funcional determinado sobre materia seca frente a fibra de cereal de materia seca en la fracción soluble obtenida es al menos 0,05%.

35 En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa precedente o simultánea de tratar una suspensión líquida de material vegetal que contiene lípidos para obtener dicho material vegetal solubilizado al menos parcialmente.

En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa posterior de tratar dicha suspensión líquida para obtener material vegetal solubilizado adicional.

40 En algunas realizaciones, el tratamiento para obtener un material vegetal solubilizado al menos parcialmente es un tratamiento con una o más enzimas modificadoras de la pared celular.

En algunas realizaciones, el tratamiento para obtener un material vegetal solubilizado al menos parcialmente es un tratamiento por sonicación, tal como tratamiento ultrasónico y/o extrusión.

En algunas realizaciones, la suspensión líquida solubilizada al menos parcialmente de material vegetal contiene material vegetal insoluble.

45 En algunas realizaciones, el material vegetal se trata bajo las etapas de dicho método simultáneamente.

En algunas realizaciones, el material vegetal se trata bajo las etapas del método según la presente invención sin la retirada de una cantidad sustancial de ningún componente.

En algunas realizaciones, la suspensión líquida se trata además con una o más enzimas adicionales.

En algunas realizaciones, la enzima adicional es una o más enzimas de transglucosilación.

50 En algunas realizaciones, la enzima adicional es una proteasa.

En algunas realizaciones, también puede usarse una o más enzimas modificadoras de lípidos tal como una enzima

lipolítica seleccionada del grupo que consiste en: una triacilglicerol lipasa, una fosfolipasa y una galacto-lipasa.

En algunas realizaciones, la una o más enzimas modificadoras de lípidos contienen dos o tres actividades seleccionadas del grupo que consiste en: actividad triacilglicerol lipasa, actividad fosfolipasa y actividad galacto-lipasa.

- 5 En algunas realizaciones, la una o más enzimas modificadoras de lípidos es una, dos, tres, cuatro o cinco enzimas modificadoras de lípidos diferentes.

En algunas realizaciones, el método según la presente invención comprende además una etapa de aislar la fracción soluble.

- 10 En algunas realizaciones, la una o más enzimas modificadoras de la pared celular se seleccionan del grupo que consiste en una xilanasas, y una celulasa, tales como celobiohidrolasas, endo-gluconasas y beta-gluconasa.

En algunas realizaciones, la celulasa se selecciona de una endo-celulasa, una exo-celulasa, una celobiasa, una celulasa oxidativa, una celulosa fosforilasa.

En algunas realizaciones, la una o más enzimas adicionales es una enzima modificadora del almidón seleccionada del grupo que consiste en una alfa-amilasa, una pululanasa, isoamilasa y una beta-amilasa.

- 15 En algunas realizaciones, la una o más enzimas de transglucosilación se seleccionan del grupo que consiste en enzimas de la clase de enzimas EC 3.2.1.20.

En algunas realizaciones, el material vegetal se proporciona en partículas, en donde el tamaño medio de partícula de dicho material vegetal en partículas está por debajo de 3.000 µm, tal como por debajo de 1.000 µm, tal como por debajo de 500 µm.

- 20 En algunas realizaciones, la fibra de cereal se selecciona de trigo, cebada, avena, centeno, triticale, arroz y maíz.

En algunas realizaciones, el método según la presente invención comprende además una etapa precedente de i) fraccionar el grano de cereal para obtener endospermo, fibra y germen; ii) separar y distribuir el endospermo, fibra y germen para permitir que sean tratados; y iii) moler la fibra.

- 25 En algunas realizaciones, la fibra de cereal se obtiene de un procedimiento de molienda industrial y se muele adicionalmente para obtener un tamaño medio de partícula por debajo de 500 µm, tal como por debajo de 400 µm, por debajo de 200 µm.

En algunas realizaciones, el material vegetal es una corriente secundaria de procesamiento de material vegetal, tal como borras de neutralización de refinado de aceites vegetales, grano gastado de cerveceras o grano gastado seco de destilerías con solubles (DDGS).

- 30 En algunas realizaciones, la composición obtenida que comprende lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, se trata adicionalmente para inactivar actividad enzimática adicional.

- 35 En algunas realizaciones, el grado de solubilización de dicho material vegetal determinado sobre materia seca frente a material vegetal de materia seca obtenido es más alto que 15%, tal como más alto que 25%, tal como más alto que 35%, tal como más alto que 40%, tal como más alto que 50%, tal como en el intervalo de 40%-60%, tal como en el intervalo de 50%-60%.

En algunas realizaciones, el contenido total de lípidos y lípidos modificados, tal como lípido funcional determinado sobre materia seca frente a material vegetal de materia seca en la fracción soluble obtenida es al menos aproximadamente 0,05%, tal como en el intervalo de 0,05-5%, tal como al menos 1%.

- 40 En algunas realizaciones, el método según la presente invención comprende además una etapa de secar la composición obtenida que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales.

En algunas realizaciones, el método según la presente invención comprende además una etapa de secar por rociado la composición obtenida que comprende lípidos modificados y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales.

- 45 En algunas realizaciones, el método según la presente invención comprende además una etapa de liofilización de la composición obtenida que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípidos funcionales.

En algunas realizaciones, el tratamiento con una o más enzimas modificadoras de lípidos genera lípidos funcionales, tales como emulsionantes.

En algunas realizaciones, el tratamiento con una o más enzimas modificadoras de lípidos genera otros compuestos funcionales, tales como ésteres de esteroides funcionales.

En algunas realizaciones, el tratamiento con una o más enzimas modificadoras de lípidos genera más que 5%, tal como más que 10%, tal como más que 25%, tal como más que 50% de conversión de fosfatidilinositol en lisofosfatidilinositol (liso-PI).

5 En algunas realizaciones, el tratamiento con una o más enzimas modificadoras de lípidos hidroliza al menos 5% de los fosfolípidos, tal como al menos 10% de los fosfolípidos, tal como al menos 20% de los fosfolípidos, tal como al menos 50% de los fosfolípidos, tal como 75% de los fosfolípidos.

En algunas realizaciones, el tratamiento con una o más enzimas modificadoras de lípidos hidroliza al menos 5% de los glicolípidos, tal como al menos 10% de los glicolípidos, tal como al menos 20% de los glicolípidos, tal como al menos 50% de los glicolípidos, tal como 75% de los glicolípidos.

10 En algunas realizaciones, el tratamiento con una o más enzimas modificadoras de lípidos hidroliza al menos 5% de los triglicéridos, tal como al menos 10% de los triglicéridos, tal como al menos 20% de los triglicéridos, tal como al menos 50% de los triglicéridos, tal como 75% de los triglicéridos.

15 En algunas realizaciones, la composición que comprende lípidos y/o lípidos modificados, tales como lípido funcional obtenido en el método según la invención, se añade directamente como una mezcla de material vegetal soluble e insoluble en la producción del producto alimenticio.

En algunas realizaciones, el producto alimenticio según la presente invención se selecciona del grupo que consiste en pan, un cereal de desayuno, una pasta, bizcochos, pastas y aperitivos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

20 Ejemplo 1. Modificación a escala de laboratorio de fibra de trigo comercial y lípidos de fibra de trigo seguido de evaluación en horneado:

Fibra:

25 Se usaron fracciones de fibra de trigo obtenidas de un molino comercial. Las fracciones consistían en una fracción de fibra fina y una fracción de fibra gruesa. Antes del uso, la fracción de fibra gruesa se molió para obtener un tamaño de partícula más pequeño, lo que aumentará la superficie específica de la fibra, aumentará finalmente la eficacia de la solubilización enzimática de la fibra. La molienda se realizó en un molino Retch para obtener un tamaño medio de partícula de 500 µm. Sin embargo, debe apuntarse que podría ser preferible un tamaño de partícula más pequeño, considerando el grado de solubilización.

Enzimas:

30 Tabla 1. Enzimas usadas para modificación de fibra de trigo

Actividad de enzima	ID de enzima
Xilanasas	Xilanasas bacterianas
Celulasas/glucanasas	Genencor GC220
Amilasa	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Pululanasa	Genencor Optimax L-1000 (401-05349-002)
Beta-amilasa	Genencor Optimalt BBA (EDS 221)
Fosfo-galactolipasa	Grindamyl Powerbake 4070
Transglucosidasa	Genencor TGL-500 (1600675782)

Protocolo:

Tabla 2: Protocolo usado para modificación de fibra

35 Se suspende fibra de trigo en NaPi 50 mM, pH 5 (13% en peso) en un recipiente/reactor con tapa cerrada  
 La suspensión de fibra se calienta hasta 100 grados C bajo agitación, y se hierve durante 2 min  
 La muestra se pone bajo agitación (con tapa cerrada) a 50 grados C y se deja equilibrar con respecto a temp  
 Se añaden las enzimas y se continúa la reacción a 50 grados C durante 24 h (temp y tiempo pueden optimizarse)

adicionalmente)

Se separa el sobrenadante de los sólidos residuales

Se hierve el sobrenadante para inactivar la actividad de enzima adicional

La muestra se enfría y se almacena para evitar contaminación

5 Se liofiliza el gránulo

Se analiza el sobrenadante

Ensayos:

Se hicieron las siguientes modificaciones a la fibra (tabla 3)

Tabla 3. Cantidad de fibra, g, tratada con diferentes enzimas

10

**gramos de muestra de enzima/10 g de fibra**

Ensayo	Fibra, g	Tampón, g	Xilanasa	GC220	Amilasa	Pululanasa	Beta-amilasa	Transglu.	Fosfolipasa
1	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	-
2	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	0,000002
3	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	0,000017
4	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,01	0,01	0,05	0,000172

Análisis:

La fracción de fibra soluble (el sobrenadante) se analiza con respecto a:

Contenido de materia seca (%):

15

Se liofiliza una muestra cuantitativa de la fibra soluble obtenida. Después de la liofilización, se cuantifica de nuevo el tamaño de la muestra y se calcula la cantidad de materia seca. Como blanco, se incluye el tampón en este análisis.

Evaluación de la modificación de lípidos usando ensayos de horneado:

Receta de horneado:

El rendimiento de horneado de la harina, fibra solubilizada modificada con harina añadida se evaluó en ensayos de horneado a pequeña escala (mezclas de 50 gramos y barras de 10 g) usando la receta a continuación (tabla 4).

20

Tabla 4. Receta usada para evaluar el rendimiento de horneado de harina, fibra solubilizada con harina añadida y la fibra no solubilizada con harina añadida reconstituida. Sal/azúcar es una mezcla 1:1 (en peso) de sal y azúcar. Agua es la absorción de agua determinada por análisis con farinógrafo.

Ingredientes	Miniescala
	ml o g
Harina	50
Levadura seca	1
Sal/azúcar	1,6
Agua	400BU - 2%

Preparación y horneado de masa

25

La harina (o mezcla de harina y fibra) e ingredientes secos se mezclan durante un minuto, después de lo cual se añadió agua y se continuó la mezcla durante otros cinco minutos.

Después de mezclar, se pesaron cuatro trozos de masa, que contenían cada uno 10 gramos de harina. Estos se moldearon a pan usando un moldeador a mano. Las barras se pusieron en cazos para hornear y se colocaron en un recipiente sellado (con una tapa) y se dejaron en la mesa durante 10 minutos. Después, se protege el pan a 34°C 85% RH durante 45 minutos, y finalmente se hornea a 230°C durante cinco minutos en una estufa Bago (Bago-line,

Fåborg, Dinamarca). Durante el escalado de la masa, la pegajosidad se evaluó subjetivamente en una escala de 1 (muy pegajosa) a 5 (seca).

El pan se enfrió durante 20 minutos antes de la evaluación (pesado, medida del volumen, y evaluación de la miga, corteza y sensorial).

5 Ensayos de horneado

Se realizaron los ensayos de horneado a continuación (tabla 5).

10 Tabla 5. Configuración experimental del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de harina, bien con fibra solubilizada añadida o bien reconstituida con fibra insoluble, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 3. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Fibra (g) es la cantidad de fibra usada para reconstitución. Fibra Sol. (ml) es la cantidad de fibra solubilizada añadida a la harina en lugar de agua. Agua (ml) es la cantidad de agua añadida a la harina. "Fibra" (%) es la cantidad de fibra, bien solubilizada o bien como fibra insoluble en base al peso de harina. TIPU se refiere a la Unidad de Fosfolipasa de Titulación descrita anteriormente.

Horneado	ID	Harina, g	Fibra, g	Fibra Sol., g	Agua, ml	"Fibra", % en la harina
1	Blanco	50	0	0	29,00	-
2	Fibra sol 5,0% (1)	50	0	29,00	-	5,22
3	Fibra sol 5,0%, 1TIPU (2)	50	0	29,00	-	
4	Fibra sol 5,0%, 10TIPU (3)	50	0	29,00	-	
5	Fibra sol 5,0%, 100TIPU (4)	50	0	29,00	-	
6	5,0% de fibra	47,5	2,5	-	29,00	5,00

Resultados:

Grado de solubilización de la fibra:

15 En base a materia seca, la cantidad de fibra solubilizada en los ensayos fue aprox. 54%.

Resultados del horneado:

Como puede verse en la tabla 6 y la figura 1, la adición de las fibras solubles tuvo poco a ningún efecto sobre el volumen específico del pan. Sin embargo, combinar la solubilización de la fibra con la fosfolipasa, tiene un efecto significativo sobre el volumen del pan.

20 Tab. 6. Resultados del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de la harina, bien con fibra solubilizada añadida o bien reconstituida con fibra insoluble. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Fibra (g) es la cantidad de fibra usada para la reconstitución. Vol. espec. (mg/ml) es el volumen específico absoluto de los panes. Vol rel vs blanco (%) es el volumen relativo de los panes frente al pan 1 (blanco)

Horneado	ID	Vol. espec., ml/g	Vol rel vs blanco
1	Blanco	3,58	100
2	Fibra sol 5,0%	3,46	97
3	Fibra sol 5,0%, 1TIPU	4,05	113
4	Fibra sol 5,0%, 10TIPU	4,24	118
5	Fibra sol 5,0%, 100TIPU	4,97	139
6	5,0% de fibra	3,38	94

Los panes resultantes pueden verse en la figura 2.

Ejemplo 2. Modificación a escala de laboratorio de lípidos de fibra de trigo comercial seguido de evaluación en horneado:

Para evaluar el efecto de la modificación de la fracción lipídica, que genera lípidos funcionales con propiedades emulsionantes, se realizó otro experimento usando diferentes dosis y diferentes lipasas.

5 Fibra:

Se usaron fracciones de fibra de trigo obtenidas de un molino comercial. Las fracciones consistían en una fracción de fibra fina y una fracción de fibra gruesa. Antes del uso, la fracción de fibra gruesa se molió para obtener un tamaño de partícula más pequeño, lo que aumentará la superficie específica de la fibra, aumentará finalmente la eficacia de la solubilización enzimática de la fibra. La molienda se realizó en un molino Retch para obtener un tamaño medio de partícula de 500 µm. Sin embargo, debe apuntarse que podría ser preferible un tamaño de partícula más pequeño, considerando el grado de solubilización.

Enzimas:

Tabla 7. Enzimas usadas para modificación de fibra de trigo

Actividad de enzima	ID de enzima
Fosfo-galactolipasa	Grindamyl Powerbake 4070
Lipasa	EDS 321

Protocolo:

15 Tabla 8: Protocolo usado para modificación de fibra

Se suspende fibra de trigo en NaPi 50 mM, pH 5 (13% en peso) en un recipiente/reactor con tapa cerrada

La suspensión de fibra se calienta hasta 100 grados C bajo agitación, y se hierve durante 2 min

La muestra se pone bajo agitación (con tapa cerrada) a 50 grados C y se deja equilibrar con respecto a temp

20 Se añaden las enzimas y se continúa la reacción a 50 grados C durante 24 h (temp y tiempo pueden optimizarse adicionalmente)

Se separa el sobrenadante de los sólidos residuales

Se hierve el sobrenadante para inactivar actividad de enzima adicional

La muestra se enfría y se almacena para evitar contaminación

Se liofiliza el gránulo

25 Se analiza el sobrenadante

Ensayos:

Se hicieron las siguientes modificaciones a la fibra (tabla 9)

Tabla 9. Cantidad de fibra, g, tratada con diferentes enzimas

**gramos de muestra de enzima/10 g de fibra**

Ensayo	Fibra, g	Tampón, g	Fosfolipasa	Lipasa
1	10	66,7	0,000017	
2	10	66,7	0,000172	
3	10	66,7		7,28E-09
4	10	66,7		7,28E-08
5	10	66,7		7,28E-07
6	10	66,7	0,000017	7,28E-08

30

Análisis:

La fracción de fibra soluble (el sobrenadante) se analiza con respecto a:

Contenido de materia seca (%):

- 5 Se liofiliza una muestra cuantitativa de la fibra soluble obtenida. Después de la liofilización, se cuantifica de nuevo el tamaño de la muestra y se calcula la cantidad de materia seca. Como blanco, se incluye el tampón en este análisis.

Evaluación de la modificación de lípidos usando ensayos de horneado:

Receta de horneado:

El rendimiento de horneado de harina, fibra solubilizada modificada con harina añadida se evaluó en ensayos de horneado a pequeña escala (mezclas de 50 gramos y barras de 10 g) usando la receta a continuación (tabla 10).

- 10 Tabla 10. Receta usada para evaluar el rendimiento de horneado de harina, fibra solubilizada modificada con harina y la fibra no solubilizada con harina añadida reconstituida. Sal/azúcar es una mezcla 1:1 (en peso) de sal y azúcar. Agua es la absorción de agua determinada por análisis con farinógrafo.

Ingredientes	Miniescala
	ml o g
Harina	50
Levadura seca	1
Sal/azúcar	1,6
Agua	400BU - 2%

Preparación y horneado de masa

- 15 La harina (o mezcla de harina y fibra) e ingredientes secos se mezclan durante un minuto, después de lo cual se añadió agua y se continuó la mezcla durante otros cinco minutos.

- 20 Después de mezclar, se pesaron cuatro trozos de masa, que contenían cada uno 10 gramos de harina. Estos se moldearon a pan usando un moldeador a mano. Las barras se pusieron en cazos para hornear y se colocaron en un recipiente sellado (con una tapa) y se dejaron en la mesa durante 10 minutos. Después, se protege el pan a 34°C 85% RH durante 45 minutos, y finalmente se hornea a 230°C durante cinco minutos en una estufa Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). El pan se enfrió durante 20 minutos antes de la evaluación (pesado, medida del volumen, y evaluación de la miga, corteza y sensorial).

Ensayos de horneado

Se realizaron los ensayos de horneado a continuación (tabla 11).

- 25 Tabla 11. Configuración experimental del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de harina con fibra solubilizada añadida, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 9. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Extracto de fibra (ml) es la cantidad de fibra solubilizada añadida a la harina en lugar de agua. Agua (ml) es la cantidad de agua añadida a la harina.

Horneado	ID	Harina, g	Extracto de fibra, g	Agua, ml
1	Blanco	50	0	28
2	Blanco de lípido de fibra	50	29,00	-
3	Lípido de fibra 10 TIPU (1)	50	29,00	-
4	Lípido de fibra 100 TIPU (2)	50	29,00	-
5	Lípido de fibra 3 LIPU (3)	50	29,00	-
6	Lípido de fibra 30 LIPU (4)	50	29,00	-
7	Lípido de fibra 300 LIPU (5)	50	29,00	-
8	Lípido de fibra 10 TIPU + 3 LIPU (6)	50	29,00	-

Resultados:

Grado de solubilización de la fibra:

En base a materia seca, la cantidad de fibra solubilizada en los ensayos fue aprox. 30%.

Resultados del horneado:

- 5 Como puede verse en la tabla 12 y la figura 3, la adición de las fibras solubles tuvo poco a ningún efecto sobre el volumen específico del pan. Sin embargo, combinar la solubilización de la fibra con la fosfolipasa, tiene un efecto significativo sobre el volumen del pan.

10 Tab. 12. Resultados del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de harina con fibra solubilizada añadida, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 9. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Vol. espec. (mg/ml) es el volumen específico absoluto de los panes. Vol rel vs blanco (%) es el volumen relativo de los panes frente al pan 1 (blanco)

Horneado	ID	Vol. espec., ml/g	Vol rel vs blanco
1	Blanco	3,39	100
2	Blanco de lípido de fibra	3,16	93
3	Lípido de fibra 10 TIPU (1)	3,29	97
4	Lípido de fibra 100 TIPU (2)	3,44	101
5	Lípido de fibra 3 LIPU (3)	3,18	94
6	Lípido de fibra 30 LIPU (4)	3,20	94
7	Lípido de fibra 300 LIPU (5)	3,29	97
8	Lípido de fibra 10TIPU (1) + 3 LIPU (6)	3,52	104

Los panes resultantes pueden verse en la figura 4.

- 15 Como puede verse a partir de los resultados anteriores en el experimento 2, no se obtuvo efecto significativo sobre el rendimiento de horneado en este experimento. En comparación con el ejemplo 1, la configuración en el ejemplo 2 difirió en la ausencia de enzimas modificadoras de la pared celular y el almidón. Puede concluirse por tanto que debe haber un efecto sinérgico entre enzimas modificadoras de la pared celular, almidón y lípidos con respecto a la generación de lípidos funcionales a partir de la fibra de trigo.

Ejemplo 3. Modificación a escala de laboratorio de fibra de trigo comercial y lípidos de fibra de trigo seguido de evaluación en horneado - 2.

- 20 Para evaluar adicionalmente el efecto sinérgico de modificar fibra de trigo con enzimas modificadoras de la pared celular, almidón y lípidos, se realizó este experimento.

Fibra:

- 25 Se usaron fracciones de fibra de trigo obtenidas de un molino comercial. Las fracciones consistían en una fracción de fibra fina y una fracción de fibra gruesa. Antes del uso, la fracción de fibra gruesa se molió para obtener un tamaño de partícula más pequeño, lo que aumentará la superficie específica de la fibra, aumentará finalmente la eficacia de la solubilización enzimática de la fibra. La molienda se realizó en un molino Retch para obtener un tamaño medio de partícula de 500 µm. Sin embargo, debe apuntarse que podría ser preferible un tamaño de partícula más pequeño, considerando el grado de solubilización.

Enzimas:

- 30 Tabla 13. Enzimas usadas para modificación de fibra de trigo

Actividad de enzima	ID de enzima
Xilanasa	Xilanasa bacteriana
Celulasa/glucanasa	Genencor GC220
Amilasa	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galactolipasa	Grindamyl Powerbake 4070

Protocolo:

Tabla 14: Protocolo usado para modificación de fibra

- Se suspende fibra de trigo en NaPi 50 mM, pH 5 (13% en peso) en un recipiente/reactor con tapa cerrada
- La suspensión de fibra se calienta hasta 100 grados C bajo agitación, y se hierve durante 2 min
- 5 La muestra se pone bajo agitación (con tapa cerrada) a 50 grados C y se deja equilibrar con respecto a temp
- Se añaden las enzimas y se continúa la reacción a 50 grados C durante 24 h (temp y tiempo pueden optimizarse adicionalmente)
- Se separa el sobrenadante de los sólidos residuales
- Se hierve el sobrenadante para inactivar actividad de enzima adicional
- 10 La muestra se enfría y se almacena para evitar contaminación
- Se liofiliza el gránulo
- Se analiza el sobrenadante

Ensayos:

Se hicieron las siguientes modificaciones a la fibra (tabla 15)

- 15 Tabla 15. Cantidad de fibra, g, tratada con diferentes enzimas

**gramos de muestra de enzima/10 g de fibra**

Ensayo	Fibra, g	Tampón, g	Xilanas	GC220	Amilasa	Fosfolipasa
1	10	66,7				-
2	10	66,7	1,12			0,000172
3	10	66,7	1,12	0,05		0,000172
4	10	66,7	1,12	0,05	0,04	0,000172
5	10	66,7		0,05		0,000172
6	10	66,7			0,04	0,000172
7	10	66,7				0,000172

Análisis:

La fracción de fibra soluble (el sobrenadante) se analiza con respecto a:

Contenido de materia seca (%):

- 20 Se liofiliza una muestra cuantitativa de la fibra soluble obtenida. Después de la liofilización, se cuantifica de nuevo el tamaño de la muestra y se calcula la cantidad de materia seca. Como blanco, se incluye el tampón en este análisis.

Evaluación de la modificación de lípidos usando ensayos de horneado:

Receta de horneado:

- 25 El rendimiento de horneado de la harina, fibra solubilizada modificada con harina añadida se evaluó en ensayos de horneado a pequeña escala (mezclas de 50 gramos y barras de 10 g) usando la receta a continuación (tabla 16).

Tabla 16. Receta usada para evaluar el rendimiento de horneado de harina, fibra solubilizada con harina y la fibra no solubilizada con harina añadida reconstituida. Sal/azúcar es una mezcla 1:1 (en peso) de sal y azúcar. Agua es la absorción de agua determinada por análisis con farinógrafo.

Ingredientes	Miniescala
	ml o g
Harina	50

Ingredientes	Miniescala
Levadura seca	1
Sal/azúcar	1,6
Agua	400BU - 2%

Preparación y horneado de masa

La harina (o mezcla de harina y fibra) e ingredientes secos se mezclan durante un minuto, después de lo cual se añadió agua y se continuó la mezcla durante otros cinco minutos.

5 Después de mezclar, se pesaron cuatro trozos de masa, que contenían cada uno 10 gramos de harina. Estos se moldearon a pan usando un moldeador a mano. Las barras se pusieron en cazos para hornear y se colocaron en un recipiente sellado (con una tapa) y se dejaron en la mesa durante 10 minutos. Después, se protege el pan a 34°C 85% RH durante 45 minutos, y finalmente se hornea a 230°C durante cinco minutos en una estufa Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). El pan se enfrió durante 20 minutos antes de la evaluación (pesado, medida del volumen, y evaluación de la miga, corteza y sensorial).

10 Ensayos de horneado

Se realizaron los ensayos de horneado a continuación (tabla 17).

15 Tabla 17. Configuración experimental del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de fibra solubilizada con harina añadida, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 15. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Extracto de fibra (ML) es la cantidad de fibra solubilizada añadida a la harina en lugar de agua. Agua (ml) es la cantidad de agua añadida a la harina. El horneado N° 9 es una repetición del Horneado 5, sin embargo, se añadieron además 0,2 mg de xilanasa y 0,5 mg de fosfolipasa/kg de harina durante la mezcla de la masa.

Horneado	ID	Harina, g	Enz. extra, mg/kg	Extracto de fibra, ml	Agua, ml
1	Blanco	50		0	28
2	Blanco de fibra (1)	50		0	29
3	Fibra BS3, KLM1 (2)	50		29	
4	Fibra BS3, GC 220, KLM1 (3)	50		29	
5	Fibra BS3, GC 220, Spezyme, KLM1(4)	50		29	
6	Fibra GC220, KLM1 (5)	50		29	
7	Fibra Spezyme, KLM1 (6)	50		29	
8	Fibra KLM1 (7)	50		29	
9	Fibra, BS3, GC220, Spezyme, KLM1 (+BS3, KLM1)	50	0,2 + 0,5	29	

Resultados:

Grado de solubilización de la fibra:

20 En base a materia seca, la cantidad de fibra solubilizada en los ensayos estuvo en el intervalo de aprox. 30 a 54%.

Resultados del horneado:

Como puede verse en la tabla 18 y la figura 5, la adición de las fibras solubles tuvo poco a ningún efecto sobre el volumen específico del pan. Sin embargo, combinar la solubilización de la fibra con la fosfolipasa, tiene un efecto significativo sobre el volumen del pan.

25

Tab. 18. Resultados del ensayo de horneado. ID se refiere a la composición de la harina con fibra solubilizada añadida, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 15. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Vol. espec. (mg/ml) es el volumen específico absoluto de los panes. Vol rel vs blanco (%) es el volumen relativo de los panes frente al pan 1 (blanco)

Horneado	ID	Vol. espec., ml/g	Vol rel vs blanco
1	Blanco	3,38	110
2	Blanco de fibra (1)	3,08	100
3	Fibra BS3, KLM1 (2)	3,14	102
4	Fibra BS3, GC 220, KLM1 (3)	3,57	116
5	Fibra BS3, GC220, Spezyme, KLM1(4)	3,84	125
6	Fibra GC220, KLM1 (5)	3,57	116
7	Fibra Spezyme, KLM1 (6)	3,26	106
8	Fibra KLM1 (7)	3,10	101
9	Fibra, BS3, GC220, Spezyme, KLM1 (+BS3, KLM1)	4,98	162

5 Los panes resultantes pueden verse en la figura 6.

Como puede verse a partir de los resultados anteriores en el experimento 3, se obtuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de horneado en este experimento combinando el tratamiento de la fibra con enzimas modificadoras de la pared celular, almidón y lípidos.

10 Ejemplo 4. Modificación a escala de laboratorio de fibra de trigo comercial y lípidos de fibra de trigo seguido de evaluación de la fibra modificada en horneado:

15 Para evaluar adicionalmente el efecto sinérgico de modificar fibra de trigo con enzimas modificadoras de la pared celular, almidón y lípidos, los autores de la invención quieren ensayar el efecto de la generación in situ de lípidos modificados que tienen propiedades de emulsión, tras la adición de fibra de trigo con respecto al rendimiento de horneado. Es bien sabido que la adición de fibra a harina, o harina de grano entero, tiene menos potencial de horneado que la harina de endospermo.

Fibra:

20 Se usaron fracciones de fibra de trigo obtenidas de un molino comercial. Las fracciones consistían en una fracción de fibra fina y una fracción de fibra gruesa. Antes del uso, la fracción de fibra gruesa se molió para obtener un tamaño de partícula más pequeño, que aumentará la superficie específica de la fibra, aumentará finalmente la eficacia de la solubilización enzimática de la fibra. La molienda se realizó en un molino Retch para obtener un tamaño medio de partícula de 500 µm. Sin embargo, debe apuntarse que podría ser preferible un tamaño de partícula más pequeño, considerando el grado de solubilización.

Enzimas:

Tabla 19. Enzimas usadas para modificación de fibra de trigo

Actividad de enzima	ID de enzima
Xilanasas	Xilanasas bacterianas de Danisco (1223449, 4010866762)
Celulasas/glucanasas	Genencor GC220
Amilasas	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galactolipasas	Danisco Grindamyl Powerbake 4070

25 Protocolo:

Tabla 20. Protocolo usado para modificación de fibra

Se suspende fibra de trigo en NaPi 50 mM, pH 5 (13% en peso) en un recipiente/reactor con tapa cerrada

La suspensión de fibra se calienta hasta 100 grados C bajo agitación, y se hierve durante 2 min

La muestra se pone bajo agitación (con tapa cerrada) a 50 grados C y se deja equilibrar con respecto a temp

Se añaden las enzimas y se continúa la reacción a 50 grados C durante 24 h (temp y tiempo pueden optimizarse adicionalmente)

La fibra modificada se hierve para inactivar la actividad enzimática adicional

Las muestras se enfrían y se almacenan para evitar contaminación

5 Ensayos:

Se hicieron las siguientes modificaciones a la fibra (tabla 21)

Tabla 21. Cantidad de fibra, g, tratada con diferentes enzimas

gramos de muestra de enzima/10 g de fibra						
Ensayo	Fibra, g	Tampón, g	Xilanasas	GC220	Amilasa	Fosfo-galactolipasa de Danisco
1	10	66,7	0,19	0,05	0,04	
2	10	66,7	0,19	0,05	0,04	0,0003

Evaluación de la modificación de lípidos usando ensayos de horneado:

10 Receta de horneado:

El rendimiento de horneado de la harina y la fibra modificada con harina añadida se evaluó en ensayos de horneado a pequeña escala (mezclas de 50 gramos y barras de 10 g) usando la receta a continuación (tabla 22).

Tabla 22. Receta usada para evaluar el rendimiento de horneado de harina, y fibra modificada con harina añadida. Sal/azúcar es una mezcla 1:1 (en peso) de sal y azúcar. Agua es la absorción de agua determinada por análisis con farinógrafo.

15

Ingredientes	Miniescala
	ml o g
Harina	50
Levadura seca	1
Sal/azúcar	1,6
Agua	400BU - 2%

Preparación y horneado de masa

La harina e ingredientes secos se mezclan durante un minuto, después de lo cual se añadió agua (o agua y fibra modificada) y se continuó la mezcla durante otros cinco minutos.

20

Después de mezclar, se pesaron cuatro trozos de masa, que contenían cada uno 10 gramos de harina. Estos se moldearon a pan usando un moldeador a mano. Las barras se pusieron en cazos para hornear y se colocaron en un recipiente sellado (con una tapa) y se dejaron en la mesa durante 10 minutos. Después, se protege el pan a 34°C 85% RH durante 45 minutos, y finalmente se hornea a 230°C durante cinco minutos en una estufa Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). El pan se enfrió durante 20 minutos antes de la evaluación (pesado, medida del volumen, y evaluación de la miga, corteza y sensorial).

25

Ensayos de horneado

Se realizaron los ensayos de horneado a continuación (tabla 23).

Tabla 23. Configuración experimental del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de la masa, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 21. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Extracto de fibra (ml) es la cantidad de fibra solubilizada añadida a la harina en lugar de agua. Agua (ml) es la cantidad de agua añadida a la harina.

30

Horneado	ID	Harina, g	Extracto de fibra, ml	Agua, ml
1	Blanco (trigo)	50	0	29
2	Fibra W enz pared celular (con insolubles) (1)	50	30	0

Horneado	ID	Harina, g	Extracto de fibra, ml	Agua, ml
3	Fibra W enz pared celular (con insolubles) + lipasa (con insol) (2)	50	30	0

Resultados:

Resultados del horneado:

Como puede verse en la tabla 24 y la figura 7, la adición de las fibras modificadas tuvo un efecto negativo sobre el volumen específico del pan. Sin embargo, la adición de fibra modificada también con la fosfolipasa, que genera lípidos funcionales, tiene un efecto mucho menos perjudicial sobre el volumen del pan en comparación con añadir sólo fibra modificada en la pared celular.

Tab. 24. Resultados del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de la masa, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 21. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Vol. espec. (mg/ml) es el volumen específico absoluto de los panes. Vol rel vs blanco (%) es el volumen relativo de los panes frente al pan 1 (blanco)

Horneado	ID	Vol. espec., ml/g	Vol rel vs blanco
1	Blanco (trigo)	3,40	100
2	Fibra W enz pared celular (con insolubles) (1)	3,14	92
3	Fibra W enz pared celular (con insolubles) + lipasa (con insol) (2)	3,51	103

Los panes resultantes pueden verse en la figura 7.

Como puede verse a partir de los resultados anteriores, se obtuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de horneado en este experimento combinando el tratamiento de la fibra con enzimas modificadoras de la pared celular, almidón y lípidos antes de la adición a la masa.

Ejemplo 5. Modificación a escala de laboratorio de fibra de arroz y lípidos de fibra de arroz seguido de evaluación de la fibra solubilizada y los lípidos de la fibra modificados en horneado:

Para evaluar adicionalmente los sorprendentes hallazgos de los autores de la invención con respecto a solubilización de la fibra combinada con modificación de lípidos de la fibra, los autores de la invención quieren ensayar el efecto de fibra de arroz solubilizada y lípidos de fibra de arroz modificados en ensayos de horneado.

Fibra:

Se usó una fracción de fibra de arroz comercial para el experimento.

Enzimas:

Tabla 25. Enzimas usadas para modificación de fibra de trigo

Actividad de enzima	ID de enzima
Xilanasas	Xilanasas bacteriana de Danisco (1223449, 4010866762)
Celulasas/glucanasas	Genencor GC220
Amilasas	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galactolipasas	Grindamyl Powerbake 4070 de Danisco

Protocolo:

Tabla 26: Protocolo usado para modificación de fibra

Se suspende fibra de arroz en NaPi 50 mM, pH 5 (13% en peso) en un recipiente/reactor con tapa cerrada

La suspensión de fibra se calienta hasta 100 grados C bajo agitación, y se hierve durante 2 min

La muestra se pone bajo agitación (con tapa cerrada) a 50 grados C y se deja equilibrar con respecto a temp

Se añaden las enzimas y se continúa la reacción a 50 grados C durante 24 h (temp y tiempo pueden optimizarse adicionalmente)

Se separa el sobrenadante de los sólidos residuales

Se hierve el sobrenadante para inactivar la actividad de enzima adicional

La muestra se enfría y se almacena para evitar contaminación

Ensayos:

- 5 Se hicieron las siguientes modificaciones a la fibra de arroz (tabla 27)

Tabla 27. Cantidad de fibra de arroz, g, tratada con diferentes enzimas

gramos de muestra de enzima/10 g de fibra						
Ensayo	Fibra, g	Tampón, g	Xilanasa	GC220	Amilasa	Fosfo-galactolipasa de Danisco
1	10	66,7	0,19	0,05	0,04	
2	10	66,7	0,19	0,05	0,04	0,0003

Evaluación de la modificación de lípidos usando ensayos de horneado:

Receta de horneado:

- 10 El rendimiento de horneado de la harina y la fibra solubilizada con harina añadida y/o lípidos modificados se evaluó en ensayos de horneado a pequeña escala (mezclas de 50 gramos y barras de 10 g) usando la receta a continuación (tabla 28).

Tabla 28. Receta usada para evaluar el rendimiento de horneado de diferentes composiciones de masa (+/- fibra solubilizada). Sal/azúcar es una mezcla 1:1 (en peso) de sal y azúcar. Agua es la absorción de agua determinada por análisis con farinógrafo.

15

Ingredientes	Miniescala
ml o g	
Harina	50
Levadura seca	1
Sal/azúcar	1,6
Agua	400BU - 2%

Preparación y horneado de masa

La harina e ingredientes secos se mezclan durante un minuto, después de lo cual se añadió agua y se continuó la mezcla durante otros cinco minutos.

- 20 Después de mezclar, se pesaron cuatro trozos de masa, que contenían cada uno 10 gramos de harina. Estos se moldearon a pan usando un moldeador a mano. Las barras se pusieron en cazos para hornear y se colocaron en un recipiente sellado (con una tapa) y se dejaron en la mesa durante 10 minutos. Después, se protege el pan a 34°C 85% RH durante 45 minutos, y finalmente se hornea a 230°C durante cinco minutos en una estufa Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca). El pan se enfrió durante 20 minutos antes de la evaluación (pesado, medida del volumen, y evaluación de la miga, corteza y sensorial).

- 25 Ensayos de horneado

Se realizaron los ensayos de horneado a continuación (tabla 29).

Tabla 29. Configuración experimental del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de la masa, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 27. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Extracto de fibra (ml) es la cantidad de fibra solubilizada añadida a la harina en lugar de agua. Agua (ml) es la cantidad de agua añadida a la harina.

30

Horneado	ID	Harina, g	Extracto de fibra, ml
1	Blanco (trigo)	50	0
2	Fibra R enz pared celular (1)	50	30

Horneado	ID	Harina, g	Extracto de fibra, ml
3	Fibra R enz pared celular + lipasa (2)	50	30

Resultados:

Resultados del horneado:

Como puede verse en la tabla 30 y la figura 8 a continuación, la adición de las fibras solubles modificadas no tuvo un efecto negativo sobre el volumen específico del pan, en realidad un efecto positivo con respecto al volumen del pan. Sin embargo, la adición de las fibras solubles modificadas también con la fosfolipasa, que genera lípidos funcionales, tiene un efecto mucho mejor sobre el volumen del pan en comparación con añadir sólo fibras solubles modificadas.

Tab. 30. Resultados del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de la masa, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 27. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Vol. espec. (mg/ml) es el volumen específico absoluto de los panes. Vol rel vs blanco (%) es el volumen relativo de los panes frente al pan 1 (blanco)

Horneado	ID	Vol. espec., ml/g	Vol rel vs blanco
1	Blanco (trigo)	3,40	<b>100</b>
2	Fibra R enz pared celular (1)	4,16	<b>123</b>
3	Fibra R enz pared celular + lipasa (2)	4,54	<b>134</b>

Los panes resultantes pueden verse en la figura 8.

Como puede verse a partir de los resultados anteriores, se obtuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de horneado en este experimento añadiendo fibra soluble y lípidos modificados obtenidos combinando el tratamiento del arroz con enzimas modificadoras de la pared celular, almidón y lípidos antes.

Ejemplo 6. Modificación a escala de laboratorio de fibra de trigo comercial y lípidos de fibra de trigo, usando diferentes lipasas, seguido de evaluación en horneado:

Para evaluar adicionalmente los sorprendentes hallazgos de los autores de la invención con respecto a solubilización de la fibra combinada con modificación de lípidos de la fibra, los autores de la invención quieren ensayar otras lipasas aparte de la fosfogalactolipasa de Danisco, seguido de evaluación de los lípidos modificados generados en los ensayos de horneado.

Fibra:

Se usaron fracciones de fibra de trigo obtenidas de un molino comercial. Las fracciones consistían en una fracción de fibra fina y una fracción de fibra gruesa. Antes del uso, la fracción de fibra gruesa se molió para obtener un tamaño de partícula más pequeño, lo que aumentará la superficie específica de la fibra, aumentará finalmente la eficacia de la solubilización enzimática de la fibra. La molienda se realizó en un molino Retch para obtener un tamaño medio de partícula de 500 µm. Sin embargo, debe apuntarse que podría ser preferible un tamaño de partícula más pequeño, considerando el grado de solubilización.

Enzimas:

Tabla 31. Enzimas usadas para modificación de fibra de trigo

Actividad de enzima	ID de enzima
Xilanasas	Xilanasas bacteriana de Danisco (1223449,4010866762)
Celulasa/glucanasa	Genencor GC220
Amilasa	Genencor, Spezyme Fred (4016101001)
Fosfo-galactolipasa	Danisco Grindamyl Powerbake 4070 (Danisco)
Fosfo-galactolipasa	Novozymes Lipopan F (Lipopan F)
Fosfo-galactolipasa	DSM's Panamore (Panamore)

Protocolo:

Tabla 32: Protocolo usado para modificación de fibra

- Se suspende fibra de trigo en NaPi 50 mM, pH 5 (13% en peso) en un recipiente/reactor con tapa cerrada
- La suspensión de fibra se calienta hasta 100 grados C bajo agitación, y se hierve durante 2 min
- 5 La muestra se pone bajo agitación (con tapa cerrada) a 50 grados C y se deja equilibrar con respecto a temp
- Se añaden las enzimas y se continúa la reacción a 50 grados C durante 24 h (temp y tiempo pueden optimizarse adicionalmente)
- Se separa el sobrenadante de los sólidos residuales
- Se hierve el sobrenadante para inactivar la actividad de enzima adicional
- 10 La muestra se enfría y se almacena para evitar contaminación

Ensayos:

Se hicieron las siguientes modificaciones a la fibra (tabla 33)

Tabla 33. Cantidad de fibra, g, tratada con diferentes enzimas

**gramos de muestra de enzima/10 g de fibra**

Ensayo	Fibra, g	Tampón, g	Xilanasa	GC220	Amilasa	Fosfo-galactolipasa
1	10	66,7				
2	10	66,7	0,19	0,05	0,04	
3	10	66,7	0,19	0,05	0,04	0,0003 (Danisco)
4	10	66,7	0,19	0,05	0,04	0,00013 (Lipopan F)
5	10	66,7	0,19	0,05	0,04	0,0002 (Panamore)

- 15 Evaluación de la modificación de lípidos usando ensayos de horneado:

Receta de horneado:

El rendimiento de horneado de la harina, la fibra solubilizada modificada con harina añadida (+/- lípidos modificados) se evaluó en ensayos de horneado a pequeña escala (mezclas de 50 gramos y barras de 10 g) usando la receta a continuación (tabla 34).

- 20 Tabla 34. Receta usada para evaluar el rendimiento de horneado de la harina, fibra solubilizada con harina añadida y fibra solubilizada con harina añadida y lípidos modificados. Sal/azúcar es una mezcla 1:1 (en peso) de sal y azúcar. Agua es la absorción de agua determinada por análisis con farinógrafo.

Ingredientes	Miniescala
	ml o g
Harina	50
Levadura seca	1
Sal/azúcar	1,6
Agua	400BU - 2%

Preparación y horneado de masa

- 25 La harina e ingredientes secos se mezclan durante un minuto, después de lo cual se añadió agua y se continuó la mezcla durante otros cinco minutos.

Después de mezclar, se pesaron cuatro trozos de masa, que contenían cada uno 10 gramos de harina. Estos se moldearon a pan usando un moldeador a mano. Las barras se pusieron en cazos para hornear y se colocaron en un recipiente sellado (con una tapa) y se dejaron en la mesa durante 10 minutos. Después, se protege el pan a 34°C 85% RH durante 45 minutos, y finalmente se hornea a 230°C durante cinco minutos en una estufa Bago (Bago-line,

Fåborg, Dinamarca). El pan se enfrió durante 20 minutos antes de la evaluación (pesado, medida del volumen, y evaluación de la miga, corteza y sensorial).

Ensayos de horneado

Se realizaron los ensayos de horneado a continuación (tabla 35).

- 5      Tabla 35. Configuración experimental del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de la masa, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 33. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Extracto de fibra (ml) es la cantidad de fibra solubilizada añadida a la harina en lugar de agua. Agua (ml) es la cantidad de agua añadida a la harina.

Horneado	ID	Harina, g	Extracto de fibra, ml	Agua, ml
1	Blanco (trigo)	50	0	29
2	Fibra W enz pared celular (1)	50	30	
3	Fibra W enz pared celular + Danisco (2)	50	30	
4	Fibra W enz pared celular + Lipopan F (3)	50	30	
5	Fibra W enz pared celular + Panamore (4)	50	30	

Resultados:

- 10     Resultados del horneado:

Como puede verse en la tabla 36 y la figura 9, la adición de las fibras solubles tuvo poco a ningún efecto sobre el volumen específico del pan. Sin embargo, combinar la solubilización de la fibra con la fosfolipasa, tiene un efecto significativo sobre el volumen del pan, todo el pan horneado con fibra tratada con las lipasas en combinación con enzimas modificadoras de la pared celular y almidón, tuvo un aumento de volumen en comparación con el control de harina.

15

Tab. 36. Resultados del ensayo de horneado. ID se refiere a composición de la masa, el número entre paréntesis se refiere al tratamiento de la fibra según la tabla 33. Harina (g) es la cantidad de harina en el pan. Vol. espec. (mg/ml) es el volumen específico absoluto de los panes. Vol rel vs blanco (%) es el volumen relativo de los panes frente al pan 1 (blanco)

Horneado	ID	Vol. espec., ml/g	Vol rel vs blanco
1	Blanco (trigo)	3,40	<b>100</b>
2	Fibra W enz pared celular (1)	3,33	<b>98</b>
3	Fibra W enz pared celular + Danisco (2)	3,88	<b>114</b>
4	Fibra W enz pared celular + Lipopan F (3)	3,84	<b>113</b>
5	Fibra W enz pared celular + Panamore (4)	3,91	<b>115</b>

- 20     Los panes resultantes pueden verse en la figura 9.

Como puede verse a partir de los resultados anteriores en el experimento 6, se obtuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de horneado en este experimento combinando el tratamiento de la fibra con enzimas modificadoras de la pared celular, del almidón y de lípidos diferentes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción de un producto alimenticio seleccionado de pan, un cereal de desayuno, una pasta, bizcochos, pastas y aperitivos, en donde dicho método comprende la generación de un extracto de fibra de cereal que comprende lípidos modificados, tales como lípidos funcionales de fibra de cereal que contiene lípidos, y en donde dicho método comprende la etapa de tratar una suspensión líquida de una fibra de cereal que contiene lípidos solubilizada al menos parcialmente que tiene un grado de solubilización más alto que 1% con una fosfolipasa, en donde menos que 20% (en peso) de la suspensión líquida de dicha fibra de cereal que contiene lípidos es almidón o componentes que contienen almidón, y en donde el contenido total de lípidos y lípidos modificados, tales como lípido funcional determinado en materia seca frente a fibra de cereal de materia seca en la fracción soluble obtenida es al menos 0,05%.
2. El método según la reivindicación 1, en donde menos que 10%, tal como menos que 6%, tal como menos que 3%, tal como menos que 1% (en peso) de la suspensión líquida de una fibra de cereal que contiene lípidos solubilizada al menos parcialmente es almidón o componentes que contienen almidón, tales como harina.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el método comprende además una etapa precedente o simultánea de tratar una suspensión líquida de fibra de cereal que contiene lípidos para obtener dicha fibra de cereal solubilizada al menos parcialmente, en donde dicho tratamiento para obtener una fibra de cereal solubilizada al menos parcialmente es un tratamiento con una o más enzimas modificadoras de la pared celular seleccionadas del grupo que consiste en una xilanasa, y una celulasa, tales como celobiohidrolasas, endoglucanasas, y betaglucanasa.
4. El método según la reivindicación 3, en donde dicha fibra de cereal se obtiene de un procedimiento de molienda industrial y se muele adicionalmente para obtener un tamaño medio de partícula por debajo de 500  $\mu\text{m}$ , tal como por debajo de 400  $\mu\text{m}$ , tal como por debajo de 200  $\mu\text{m}$ .
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha fibra de cereal es una corriente secundaria del procesamiento de material vegetal, grano gastado de cerveceras o grano gastado seco de destilerías con solubles (DDGS).
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la composición obtenida que comprende lípidos modificados, tales como lípidos funcionales, se trata adicionalmente para inactivar la actividad enzimática adicional.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el grado de solubilización de dicha fibra de cereal determinado en materia seca frente a fibra de cereal de materia seca obtenida es más alto que 15%, tal como más alto que 25%, tal como más alto que 35%, tal como más alto que 40%, tal como más alto que 50%, tal como en el intervalo de 40%-60%, tal como en el intervalo de 50%-60%.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el contenido total de lípidos y lípidos modificados, tal como lípido funcional determinado en materia seca frente a fibra de cereal de materia seca en la fracción soluble obtenida está en el intervalo de 0,05-5 %, tal como al menos 1%.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho tratamiento con una enzima fosfolipasa convierte más que 5%, tal como más que 10%, tal como más que 25%, tal como más que 50% de fosfatidilinositol a lisofosfatidilinositol (liso-PI).

Figura 1

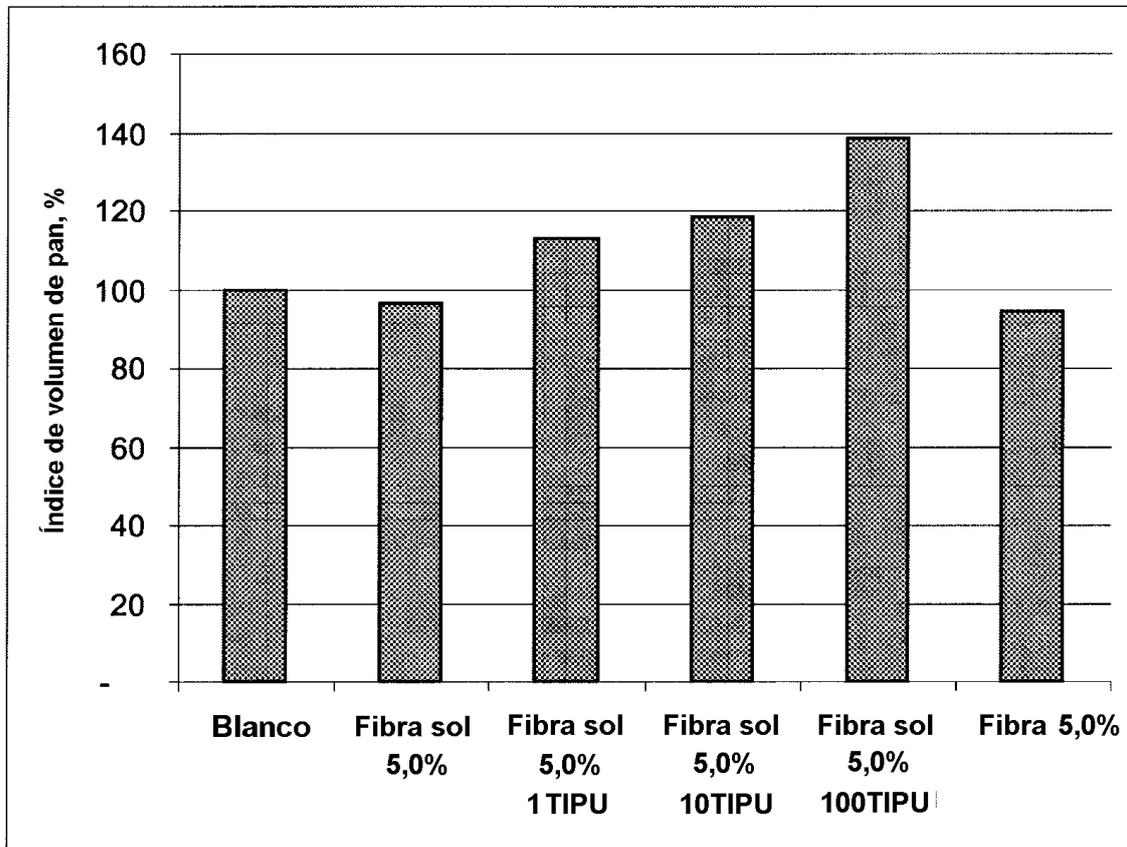


Figura 2

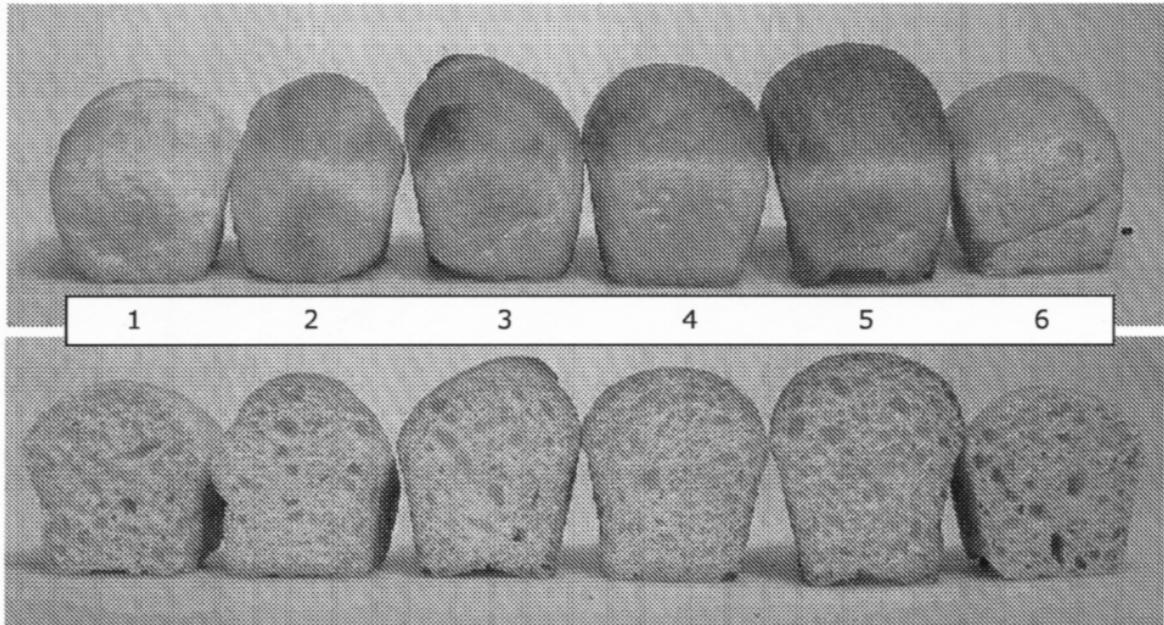


Figura 3

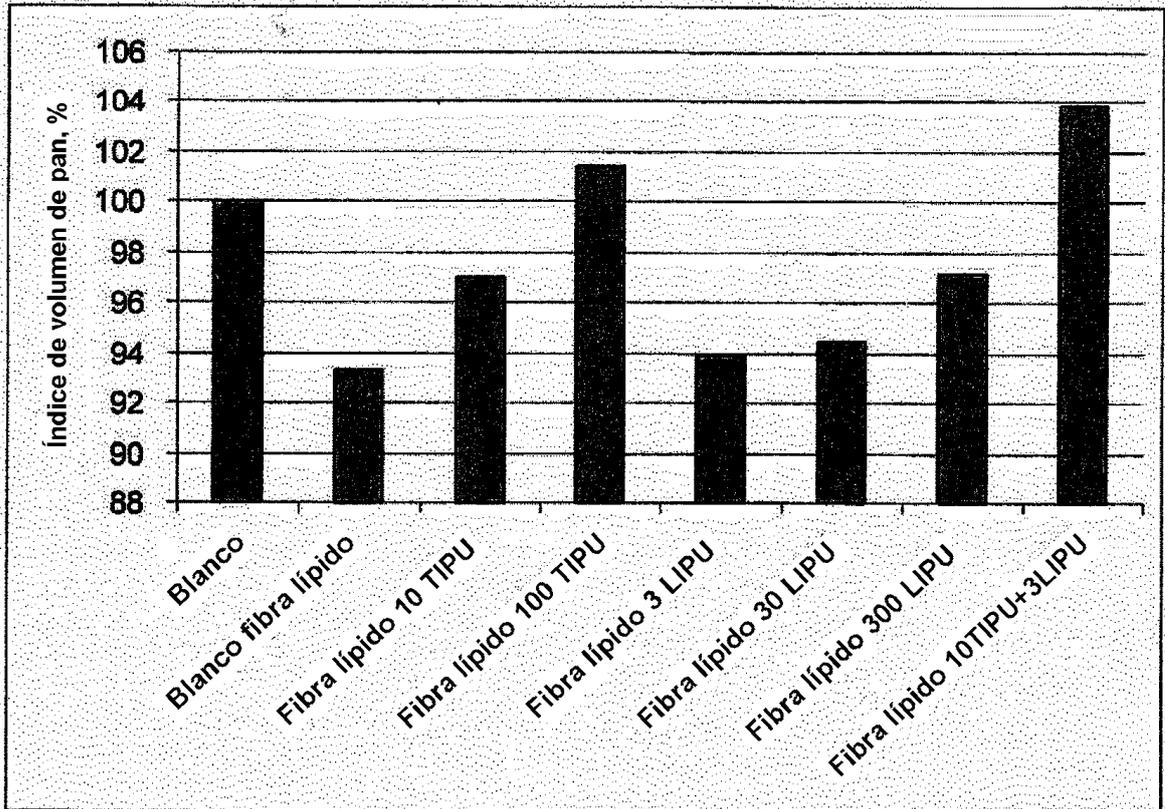


Figura 4

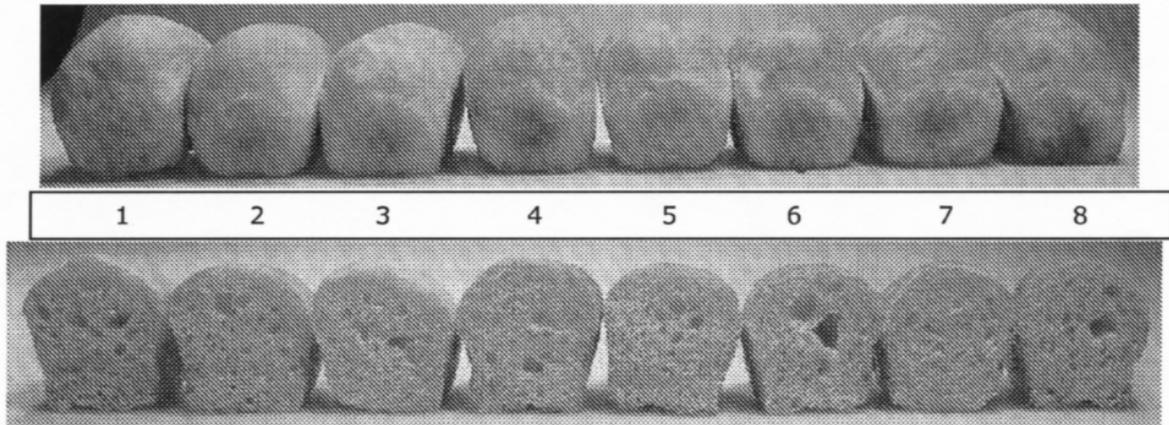


Figura 5

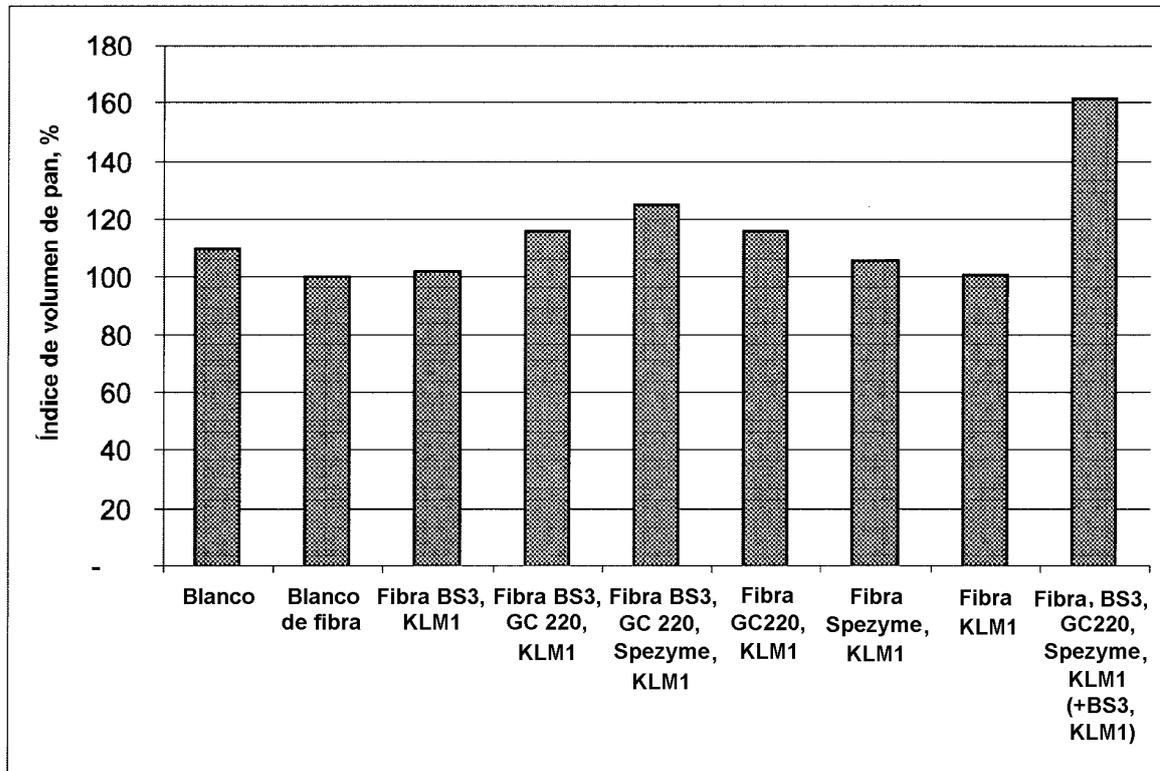


Figura 6

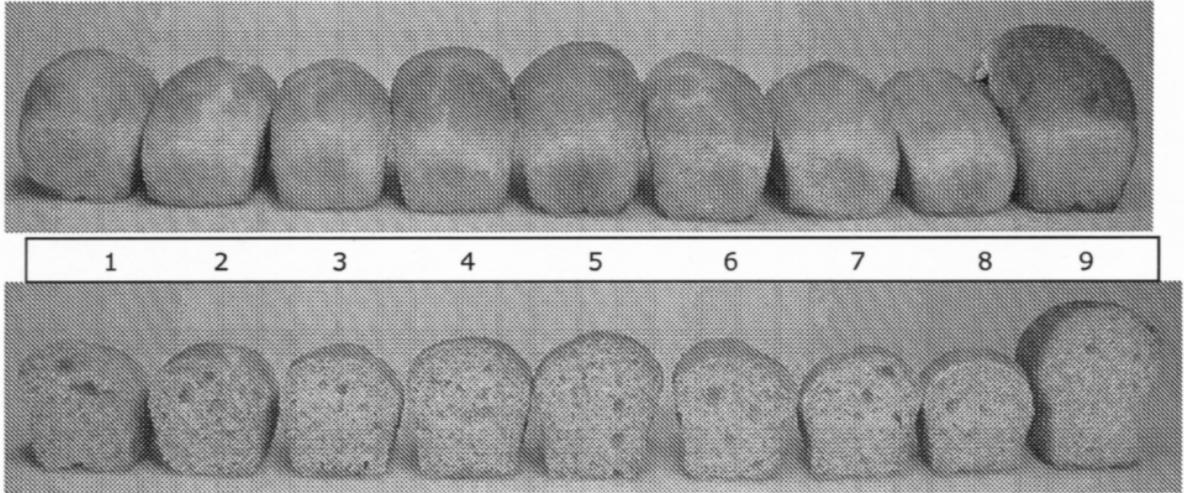
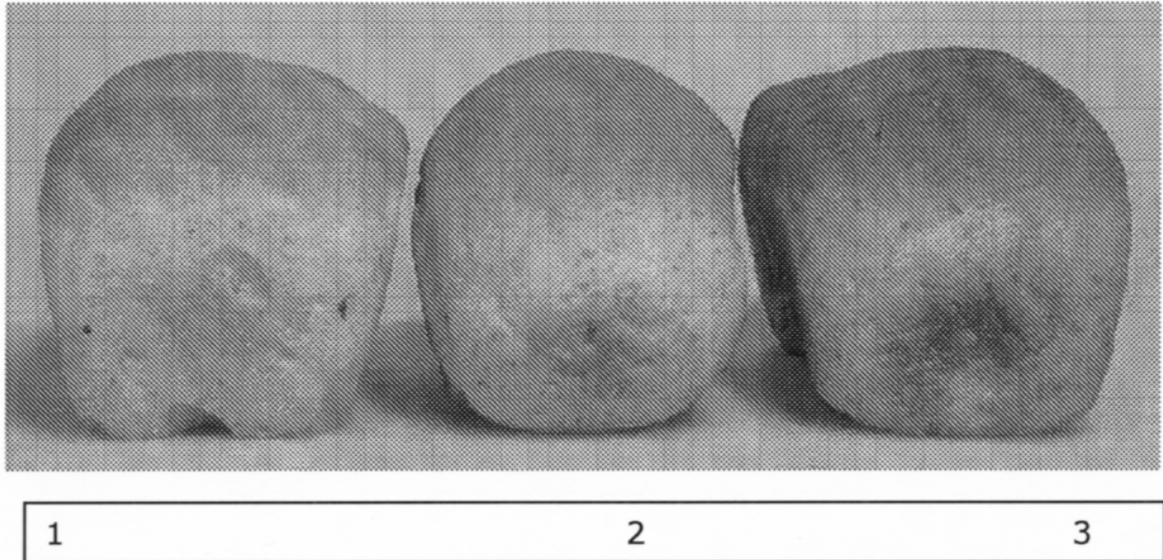


Figura 7



**Figura 8**

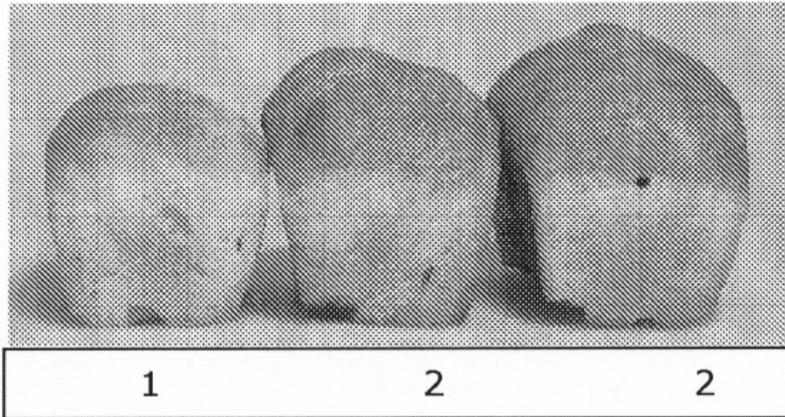


Figura 9

