

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 206**

51 Int. Cl.:

**A21D 8/04** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

**A21D 2/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2005 PCT/BE2005/000104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2006 WO06000066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2005 E 05759987 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 1771073**

54 Título: **Masa que comprende inhibidor de nucleótido pirofosfatasa**

30 Prioridad:

**29.06.2004 EP 04447155**

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

**01.02.2019**

73 Titular/es:

**PURATOS NAAMLOZE VENNOOTSCHAP  
(100.0%)  
Industrialaan 25  
1702 Groot-Bijgaarden, BE**

72 Inventor/es:

**PARMENTIER, SOFIE;  
VANDAMME, ERIC;  
BEAUPREZ, JOERI y  
ARNAUT, FILIP**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 698 206 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**

Masa que comprende inhibidor de nucleótido pirofosfatasa

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para inhibir degradación de coenzimas nicotinamida en productos a base de trigo tales como sistemas de masa.

**Estado de la técnica**

10 Se conoce bien el uso de agentes oxidantes y reductores como mejoradores de pan. Los oxidantes ejercen su efecto positivo mediante la acción oxidante de grupos sulfhidrilo en la red de gluten, dando como resultado una masa más fuerte. Los agentes reductores, por otro lado, tales como cisteína o glutatión reducido, darán como resultado generalmente masas más débiles.

15 En el pasado se usaron agentes químicos, por ejemplo bromato, yodato y azodicarbonamida (ADA). Sin embargo, existe un gran interés por reemplazar estos agentes oxidantes químicos por óxido-reductores biológicos, como ácido L-treoascórbico (vitamina C). Este es ahora el agente oxidante más ampliamente usado. Existe también un interés en enzimas oxidantes, tales como lipoxigenasa, peroxidasa y glucosa oxidasa, por su efecto positivo sobre la calidad del horneado. Se ha considerado que óxido-reductores biológicos de transferencia de electrones naturales, tales como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), y su fosfato (NADP<sup>+</sup>), flavín adenosina nucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN), las ubiquinonas, los citocromos, etc. mejoran la calidad de productos horneados fermentados con levadura (Tomlinson, J.D., Robertson, J.A. & Thomson, W.K. (1988). Novel improvers for flour and yeast raised baked goods; documento WO8803365). Además, se notifica que pueden usarse deshidrogenasas dependientes de NAD(P)<sup>+</sup> e independientes de NAD(P)<sup>+</sup> como mejoradores de pan (Xu & Wagner, 1999; Methods for using dehydrogenases in bread; documento WO9957986). El sistema de tiorredoxina puede mejorar también la calidad de pan y productos horneados, mediante la reducción de gluteninas y gliadinas; este sistema, sin embargo, es dependiente de la presencia de NADPH (Buchanan & Kobrehel, 1998; Use of thiol redox proteins for reducing protein intramolecular disulfide bonds, for improving the quality of cereal products, dough and baked goods; documento EP0863154).

25 La adición de pirofosfato, cisteína o glutatión en sistemas de masa se conoce en la técnica anterior. El documento US 6 291 005 B1 da a conocer un aditivo de horneado que comprende pirofosfato de calcio (y cisteína). Para preparar productos horneados, el aditivo de horneado se mezcla con harina, levadura, sal y agua. El documento RU 2 158 513 C da a conocer un aditivo para fabricar productos horneados que comprende estabilizadores de enzimas y componente de fosfato (ortofosfatos y/o pirofosfatos y/o polifosfatos). El documento US 3 561 974 A da a conocer un pan con alto contenido en proteínas que comprende pirofosfato de sodio. El documento JP 56 051946 A da a conocer una composición para producir rosquillas con levadura que comprende pirofosfato. El documento WO 2004/037003 A da a conocer una composición de masa adecuada para hornear para dar productos de pan fermentado con levadura que comprenden harina y componentes de composición adicionales tales como L-cisteína. El documento JP 04 346745 A da a conocer una preparación de pan de alta calidad añadiendo glutatión a masa y congelando antes de hornear.

**Objetivos de la invención**

40 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un uso potenciado de agentes de transferencia de electrones naturales presentes en harina de cereal o productos a base de trigo tales como sistemas de masa (masas). Más en particular, la presente invención tiene como objetivo mejorar la acción de coenzimas nicotinamida en la calidad de la masa y el horneado.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un método para inhibir la degradación de coenzimas nicotinamida en un producto a base de trigo, según la reivindicación 1.

45 Por una "cantidad eficaz" de inhibidor de NPP quiere decirse una cantidad de inhibidor que da como resultado la inhibición (parcial o completa) de la degradación de coenzimas nicotinamida por dicha NPP. En general el inhibidor se añade en una cantidad de aproximadamente el 0,1-3%, preferiblemente de aproximadamente el 0,2-2,5%, más preferiblemente de aproximadamente el 0,5-1% en peso de harina.

50 Preferiblemente se obtiene al menos una inhibición del 50%, el 60%, más preferiblemente al menos una inhibición del 70%, el 80%, el 90% y lo más preferiblemente una inhibición de completa a casi completa de la NPP en el producto a base de trigo mediante la adición de dicho inhibidor.

Ventajosamente, el inhibidor se añade a un producto a base de trigo, al que se le ha añadido una (des)hidrogenasa, más en particular una hidrogenasa o deshidrogenasa dependiente de NAD(P) o NAD(P)H. Esta hidrogenasa o deshidrogenasa es ventajosamente una (des)hidrogenasa nativa, o una (des)hidrogenasa presente de forma natural

en el producto a base de harina de cereal, tal como un producto a base de trigo.

Preferiblemente, el inhibidor de nucleótido pirofosfatasa es pirofosfato, (por ejemplo pirofosfato de sodio o calcio) pero pueden usarse también otros inhibidores tales como inhibidores a base de tiol. EDTA, glutatión reducido y L-cisteína son ejemplos de inhibidores de calidad alimentaria a base de tiol. También ADP (aproximadamente 1-2 mM por ejemplo), tripolifosfato y metafosfato pueden inhibir dicha NPP en harina de trigo.

En una realización según la invención, se añade pirofosfato al producto a base de trigo, posiblemente en combinación con uno o más inhibidores de NPP distintos (significando "distinto" diferente de un pirofosfato tal como pirofosfato de calcio o de sodio). Se añaden preferiblemente pirofosfato de calcio y de sodio a aproximadamente 10-150 mM, preferiblemente a aproximadamente 20-120 mM, más preferiblemente a aproximadamente 50-100 mM. Una concentración preferida de pirofosfato (de calcio) es el 0,2-2,5%, más preferiblemente el 0,5-1% en peso de harina.

Se añaden preferiblemente L-cisteína y DTT (ditiotreitól) a aproximadamente 2-6 mM, ADP a aproximadamente 0,5-2 mM. Se usa glutatión reducido preferiblemente a 2-20 mM, lo más preferiblemente a aproximadamente 10 mM. Se usa preferiblemente EDTA a 1-20 mM. A partir de una concentración de EDTA 4 mM en adelante, se observó inhibición completa de la NPP de harina de trigo (*in vitro*). Un periodo de preincubación de aproximadamente 1 hora puede ser ventajoso para algunos de los inhibidores.

Un "producto a base de trigo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una masa preparada a partir de harina de trigo. El término "masa" o "sistema de masa" se refiere a una composición que comprende harina (de trigo) y un líquido (por ejemplo agua). La masa puede comprender además otros ingredientes de masa típicos tales como por ejemplo levadura y/o medios de leudado químico. La masa puede ser una masa (de trigo) leudada químicamente o una masa (de trigo) fermentada con levadura. En una realización preferida, el producto a base de trigo es una masa fermentada con levadura, preferiblemente una masa de trigo fermentada con levadura.

El método de la presente invención comprende añadir un sistema de regeneración de coenzimas al producto a base de trigo. Un "sistema de regeneración de coenzimas" o "sistema regenerante de coenzimas" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición que comprende (consiste en) una o más enzimas eficaces en la regeneración de NAD<sup>+</sup> a partir de NADH y viceversa. El sistema de regeneración de coenzimas comprende preferiblemente (consiste en) al menos una (una o más) hidrogenasa o deshidrogenasa dependiente de NAD(P) o NAD(P)H. Una deshidrogenasa preferida es manitol deshidrogenasa (MDH). Ventajosamente dicha MDH se añade junto con fructosa (por ejemplo D-fructosa). En una realización según la invención, se añaden aproximadamente 50-1000 U de MDH, más preferiblemente 100-500 U aproximadamente de MDH obtenida por ejemplo de *Leuconostoc pseudomesenteroides* por 100 g de harina junto con aproximadamente 0,5-1,5 g de fructosa, más preferiblemente 1 g aproximadamente de fructosa.

Dependiendo de qué enzimas (naturales) están ya presentes en la masa, se añaden ventajosamente una hidrogenasa, una deshidrogenasa, o tanto una hidrogenasa como una deshidrogenasa al producto a base de trigo tal como una masa. Una NADH oxidasa en harina de trigo puede por ejemplo formar NAD<sup>+</sup> a partir de NADH. Una alcohol deshidrogenasa de harina de trigo, usando etanol (un producto de reacción de, por ejemplo, la fermentación de levaduras) como sustrato, puede formar NADH a partir de NAD<sup>+</sup>.

En una realización según la invención, se añaden enzimas respectivamente tanto para la reducción como para la oxidación de las coenzimas nicotinamida, para garantizar una circulación de enzimas apropiada (NADH ↔ NAD<sup>+</sup>). Un sistema de regeneración de formiato deshidrogenasa (FDH) (aproximadamente 25-75 U de FDH de *Candida boidinii* (EC 1.2.1.2) + aproximadamente 0,2-0,6 g de formiato de Na por ejemplo por 100 g de harina) demostró ser muy útil para la formación de NADH a partir de NAD<sup>+</sup>. MDH es la enzima preferida para regenerar NAD<sup>+</sup> a partir de NADH.

Dicho inhibidor de nucleótido pirofosfatasa inhibe preferiblemente una nucleótido pirofosfatasa presente en el producto a base de harina de cereal, más en particular el producto a base de trigo y que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal que es (G)IDDRHEVDLPPRP (es decir, que es GIDDRHEVDLPPRP o que es IDDRHEVDLPPRP).

En otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer una masa que comprende un inhibidor de nucleótido pirofosfatasa tal como pirofosfato, y un sistema de regeneración de coenzimas. El sistema de regeneración de coenzimas comprende preferiblemente manitol deshidrogenasa y D-fructosa, y/o hidrogenasa o deshidrogenasa dependiente de NAD(P) o NAD(P)H. El sistema de regeneración de coenzimas comprende preferiblemente (consiste en) al menos una hidrogenasa o deshidrogenasa dependiente de NAD(P) o NAD(P)H. Una deshidrogenasa preferida es manitol deshidrogenasa que se añade ventajosamente junto con (D-)fructosa.

Se prefieren manitol deshidrogenasa de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, manitol y sorbitol deshidrogenasa de *Gluconobacter oxidans* y xilosa reductasa de *Candida tenuis* con respecto a algunas enzimas comerciales como la malato deshidrogenasa de *Thermus flavus*, la alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa la inhibición *in vitro* de nucleótido pirofosfatasa de harina de trigo a diferentes concentraciones de pirofosfato.

La figura 2 representa el efecto de NAD<sup>+</sup> y pirofosfato sobre las concentraciones de coenzima.

5 La figura 3 describe el principio del sistema de enzimas acopladas alcohol deshidrogenasa/manitol deshidrogenasa.

La figura 4 muestra el sistema de regeneración de manitol deshidrogenasa después de un periodo de prefermentación (20 min) y preincubación (30 min) (♦ NAD<sup>+</sup>; □ NADH) (la flecha indica la adición de MDH y D-fructosa).

10 La figura 5 dibuja el efecto del sistema de regeneración de manitol deshidrogenasa sobre las concentraciones de coenzima.

La figura 6 describe el efecto combinado de pirofosfato y manitol deshidrogenasa sobre las concentraciones de coenzima.

**Descripción detallada de la invención**

15 La presente invención aprovecha la capacidad de los agentes de transferencia de electrones naturales presentes en sistemas de masa. Más en particular, las coenzimas nicotinamida, NAD(H), son de importancia para la calidad de la masa y el horneado. Tienen que considerarse dos aspectos. El primer aspecto es la inhibición de degradación de coenzimas, que tiene lugar en harina de trigo. En segundo lugar, puede aplicarse un sistema de regeneración de coenzimas para evitar la acumulación de coenzimas o bien en la forma reducida o bien en la forma oxidada. Puede considerarse también una combinación de ambos enfoques.

20 Se encontró una enzima en harina de trigo, que es responsable de la degradación de las coenzimas nicotinamida NAD(H). Basándose en los productos de degradación, NMN (mononucleótido nicotinamida) y AMP (adenosín monofosfatos), se identificó la enzima como una nucleótido pirofosfatasa (NPP). La enzima NPP presente en harina de trigo se purificó parcialmente a partir de un extracto de harina de trigo (véase el ejemplo 12) aplicando un tratamiento por calor (10', 70°C), una precipitación con sulfato de amonio (el 60% de saturación, 0°C) y una diálisis durante la noche (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5). A partir de un zimograma de una electroforesis en gel nativo (PAGE), se determinó que el peso molecular de la NPP presente en harina de trigo era de aproximadamente 100-104 kDA. Se encontró que la secuencia N-terminal era (G)IDDRHEVDLPPRP (SEQ ID NO: 1 y 2).

30 La nucleótido pirofosfatasa (NPP) presente en harina de trigo mantiene (toda o sustancialmente toda) su actividad de NPP después de una incubación de 10 minutos a 70°C. Un tratamiento térmico de 10 minutos a 80°C es necesario para inactivar el enzima. El pH óptimo para la degradación de NAD<sup>+</sup> se sitúa alrededor de pH 9,5-10,5.

35 Esta enzima no se ha notificado en harina de trigo anteriormente. Se considera que esta enzima es negativa para la calidad de fabricación del pan, dado que obstaculiza el potencial de oxidación-reducción natural de la masa. Por tanto, es de interés inhibir esta nucleótido pirofosfatasa (NPP). Se seleccionó pirofosfato como inhibidor de nucleótido pirofosfatasa, pero también pueden considerarse otros compuestos inhibidores tales como EDTA, L-cisteína, DTT (ditiotreitól) y ADP por ejemplo. L-cisteína y DTT a 4 mM inhibieron la NPP en cierta medida (pruebas *in vitro*). ADP en una concentración de 1 mM puede inhibir la NPP parcialmente. Se usa preferiblemente EDTA a 1-20 mM. A partir de una concentración de EDTA 4 mM en adelante, pudo observarse inhibición completa de la NPP de harina de trigo. Después de la adición de iones divalentes como Mg<sup>+2</sup> y Mn<sup>+2</sup>, la enzima pudo reactivarse sin embargo parcialmente cuando se inhibió por EDTA. Este no es el caso para la inhibición con pirofosfato. Se proporcionan más detalles sobre compuestos y concentraciones sometidas a prueba en el ejemplo 11.

**Ejemplo 1: Inhibición *in vitro* de nucleótido pirofosfatasa por pirofosfato**

45 Como ejemplo de inhibición de nucleótido pirofosfatasa, se sometió a prueba pirofosfato. La enzima nucleótido pirofosfatasa de harina de trigo pudo inhibirse por la adición de pirofosfato (figura 1). Una concentración de pirofosfato de Ca de 50 a 100 mM (CaH<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) pudo inhibir completamente la degradación de NAD<sup>+</sup> mediante un extracto de harina de trigo. Pudo obtenerse una inhibición parcial con pirofosfato 20 y 10 mM.

Un exceso de iones metálicos bivalentes (MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>) no pudo reactivar la enzima. Además el pirofosfato añadido se divide para dar fosfato por el extracto de harina. Esto sugiere que el pirofosfato es un inhibidor competitivo de la nucleótido pirofosfatasa de harina de trigo.

50 Se inhibe también completamente la enzima NPP mediante una concentración 100 mM de pirofosfato de sodio (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

Se proporcionan más detalles sobre las pruebas de inhibición de NPP *in vitro* en el ejemplo 11.

**Ejemplo 2: Sistemas de masa con pirofosfato (no parte de la invención)**

Experimentos *in vitro* (véanse los ejemplos 1 y 11) revelaron que el pirofosfato es un buen inhibidor de la nucleótido pirofosfatasa de harina de trigo. Se sometió a prueba también el efecto del pirofosfato sobre la degradación de coenzimas en sistemas de masa (figura 2). Tanto la forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) como la forma reducida (NADH) se determinaron antes (T0) y después (T1) de 60 minutos de reposo de la masa a 25°C. Con la adición de pirofosfato (por ejemplo 0,3 g pirofosfato de calcio por 100 g de harina), se observaron concentraciones de coenzimas superiores. El perfil de coenzimas fue comparable al perfil cuando se añadió NAD<sup>+</sup> (por ejemplo 0,005 g de NAD<sup>+</sup> por 100 g de harina) a los sistemas de masa. Esto respalda la hipótesis de que el pirofosfato puede reducir la degradación de coenzimas que tiene lugar en sistemas de masa.

Se proporcionan más detalles sobre métodos de extracción y medición de coenzimas en los ejemplos 7-8. Se proporcionan detalles sobre el sistema de pruebas *in panis* con minimasas en el ejemplo 9.

#### Ejemplo 3: Sistema de regeneración de coenzimas

En sistemas de masa, tienen lugar conversiones de coenzimas. La reducción de coenzimas es el resultado de una serie de reacciones (figura 3). Durante el periodo de reposo de la masa, la levadura está fermentando los azúcares, presentes en la harina y que resultan de la descomposición de almidón enzimática, para dar etanol (I). El etanol es un sustrato para la alcohol deshidrogenasa de harina, que reducirá NAD<sup>+</sup> para dar NADH (II). Sin embargo, NADH puede reoxidarse mediante el uso de una deshidrogenasa dependiente de NAD(P)<sup>+</sup>. Para este fin, puede seleccionarse la manitol deshidrogenasa (MDH) de *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Esta enzima oxida NADH para dar NAD<sup>+</sup> con la reducción simultánea de D-fructosa a D-manitol (III).

Puede usarse un extracto enzimático de *L. pseudomesenteroides* en bruto (sonicación en un tampón acetato 0,05 M (pH 6,0), centrifugación (10000 rpm, 15 min., rotor GSA). Alternativamente, este extracto en bruto puede purificarse adicionalmente mediante una etapa de precipitación con sulfato de amonio (el 60% de saturación, 0°C), seguida por centrifugación (7000 rpm, 15 min., rotor GSA), y diálisis durante la noche frente a un tampón acetato 0,05 M (pH 6,0). Esta fracción dializada se usó como extracto enzimático purificado.

Se encontró que *L. pseudomesenteroides* y especialmente las cepas ATCC 12291 y B-512F de *L. pseudomesenteroides* son fuentes muy adecuadas de MDH. MDH puede obtenerse de otras fuentes.

Cuando se usó *Gluconobacter oxidans* como fuente de enzimas (MDH, SDH), se preparó un extracto enzimático en bruto mediante sonicación de células de *Gluconobacter* en tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,0) y los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación (1000 rpm, 15 min, rotor GSA).

#### Ejemplo 4: Sistema de regeneración de coenzimas *in vitro*

Se sometió a prueba el principio de regeneración de coenzimas *in vitro* con la MDH de *L. pseudomesenteroides* (figura 4). Durante la incubación de NAD<sup>+</sup> en presencia de harina de trigo y levadura, se reduce NAD<sup>+</sup> a NADH. Cuando no se añade ningún sistema de regeneración de coenzimas (blanco), NAD<sup>+</sup> se convierte adicionalmente en NADH. Cuando se añade el sistema de manitol deshidrogenasa (manitol deshidrogenasa y fructosa) (prueba), el NADH formado se regenera a NAD<sup>+</sup>. Se proporcionan más detalles sobre el sistema de regeneración con MDH *in vitro* en el ejemplo 10.

#### Ejemplo 5: Sistema de regeneración de coenzimas en sistemas de masa

Se sometió a prueba el sistema de regeneración de manitol deshidrogenasa en sistemas de masa (figura 5). En el blanco, la concentración de NADH aumentó después del reposo de la masa (la hipótesis para la acumulación de NADH se explica en los experimentos *in vitro*). Cuando se añadió un extracto de manitol deshidrogenasa, junto con fructosa, no se detectó ningún aumento en la concentración de NADH. La concentración de NADH disminuyó, mientras que la concentración de NAD<sup>+</sup> aumentó. Esto indica que la manitol deshidrogenasa es eficaz en la regeneración de NAD<sup>+</sup> a partir de NADH. La adición de MDH y fructosa dio como resultado un aumento en el volumen del pan.

Además del sistema de manitol deshidrogenasa, pueden considerarse también otras enzimas de regeneración de coenzimas (deshidrogenasas dependientes de NAD(P)(H)) conocidas en la técnica, como manitol y sorbitol deshidrogenasas (MDH y SDH) de *Gluconobacter oxidans* (por ejemplo LMG 1489), xilosa reductasa (XR) de *Candida tenuis* (por ejemplo CBS 4435).

Véase el ejemplo 9 para detalles sobre las pruebas de horneado realizadas con minimasas (el sistema de masa de este ejemplo) y las concentraciones de todos los compuestos usados en las mismas.

#### Ejemplo 6: Inhibidor de nucleótido pirofosfatasa y sistema de regeneración de coenzimas

Se cree que la degradación de coenzimas afecta al sistema de regeneración de coenzimas negativamente. Por tanto, puede combinarse un sistema de regeneración de coenzimas con un inhibidor de nucleótido pirofosfatasa. Como ejemplo se combinó pirofosfato con el sistema de manitol deshidrogenasa descrito en los ejemplos previos.

La combinación de pirofosfato con el sistema de manitol deshidrogenasa dio como resultado el aumento significativo

en concentración de NAD<sup>+</sup>, mientras que NADH desapareció completamente (figura 6). En esta masa la manitol deshidrogenasa es muy eficaz en la reoxidación del NADH formado por la acción de la deshidrogenasa de harina de trigo para dar NAD<sup>+</sup>.

Ejemplo 7: Método de extracción de coenzimas

- 5 Se extrajeron la forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) y reducida (NADH) de las coenzimas nicotinamida de las masas con un método de extracción con ácido y alcalina respectivamente. En la tabla 1 se proporciona una visión general de los métodos.

Tabla 1. Método de extracción con ácido y alcalina para la determinación de NAD<sup>+</sup> y NADH, respectivamente

Extracción con ácido (NAD <sup>+</sup> )	Extracción alcalina (NADH)
Añadir 2 ml de TCA (0,6 M) a 1 g de masa	Añadir 2 ml de tris-acetato (5 M, pH 9,5 + EDTA 50 mM) a 1 g de masa
30 min de tratamiento con Ultra Turrax, 4°C (agitador magnético)	30 min de tratamiento con Ultra Turrax, 4°C (agitador magnético)
Centrifugación: 15 min, 10000 rpm	Centrifugación: 15 min, 10000 rpm
Extracción con dietil éter (5 veces)	
Filtración	Filtración
Análisis por HPLC	Análisis por HPLC

Ejemplo 8: Método de HPLC para la determinación de coenzimas en masa

- 10 Pueden determinarse las coenzimas, NAD<sup>+</sup> y NADH, con un método de HPLC de fase inversa isocrático en un sistema de HPLC Varian Prostar. Se llevó a cabo la separación de las coenzimas NAD<sup>+</sup> y NADH en una columna Chromsep Microspher 3C18 (tamaño de partícula de 3 µm, 4,6 x 100 mm, Chrompack). La fase móvil fue el 96% de tampón citrato-fosfato de sodio 0,15 M (pH 6,8) que contenía EDTA 1 mM, y el 4% de metanol (30°C). La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min y la detección se consiguió mediante absorción de UV a 260 nm (Varian Prostar UV 320).
- 15 Se filtraron todas las muestras (Sartorius Minisart RC15, 0,45 µm) y la inyección de la muestra (20 µl) se consiguió con un inyector automático Varian Prostar 410. Se midió la concentración de nucleótidos mediante el área de pico del cromatograma con curvas de calibración, que se prepararon usando una cantidad conocida de coenzimas. Se obtuvo una separación completa de los cuatro nucleótidos (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, NADH y NADH) como tal en aproximadamente 20 minutos.

20 Ejemplo 9: Sistemas de prueba *in pano*

Se realizaron pruebas de horneado con minimasas (150 g). La composición básica de la masa de control masa se proporciona en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Composición de masa para masa de control

Harina (Surbi)	100 g
Agua (AD)	58 g <sup>a</sup>
Levadura (Bruggeman)	5 g
Sal (NaCl)	2 g
α-amilasa (Beldem) (75000 SKB/g)	1,1 g <sup>b</sup>
Dextrosa	2 g
<sup>a</sup> 58 g de líquido (agua o parcialmente tampón o disolución de enzimas)	
<sup>b</sup> concentración por 100 kg	

- 25 Se amasaron las masas con un mezclador de varilla durante 4,5 minutos, después de lo cual se incubaron durante 20 minutos a 25°C. Se laminó la masa y se incubó de nuevo a 25°C durante 20 minutos, después de lo cual se laminó e incubó durante 50 minutos a 36°C y a una humedad relativa del 80%. Se realizó el horneado durante 20 minutos a una temperatura del horno de 225°C. Se determinó el volumen del pan después de hornear mediante el método de desplazamiento de semillas de colza.

- 30 Se sometieron a prueba los siguientes compuestos en minimasas a las siguientes concentraciones (por 100 g de harina): fructosa (1 g), formiato de Na (0,4 g), NAD<sup>+</sup> (0,005 g), pirofosfato de calcio (0,3 g), ácido ascórbico (4 g = concentración por 100 kg), tampón acetato 0,005 M pH 6,0 (37 ml<sup>b</sup>), MDH + fructosa (100-500 U de MDH + 1 g de fructosa), FDH + formiato de Na (50 U de FDH + 0,4 g de formiato de Na). Para el tampón y la MDH, se corrigió la cantidad de agua para la adición de tampón o disolución de MDH (b).

- 35 Se sometieron a prueba los compuestos solos o en combinación. Los efectos se muestran por ejemplo en las figuras 2, 5 y 6.

Ejemplo 10: El sistema de regeneración de MDH

La mezcla de reacción para el periodo de prefermentación contenía el 10% (p/v) de harina, disolución de glucosa al 10% y levadura ( $100^* = 100$  veces la razón levadura/harina usada normalmente en masa). Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 25°C. Después de este periodo de prefermentación, se añadió  $\text{NAD}^+$  en una concentración de 0,5 mM (=T0) (periodo de preincubación). Después de otros 30 minutos, se añadieron glucosa (10%), D-fructosa (100 mM) y manitol deshidrogenasa (MDH) (actividad según se especifica) a la mezcla de reacción (=T1). La mayoría de los componentes se disolvieron en un tampón acetato para alcanzar un pH final de 5,5 y una concentración de tampón de 0,1 M. Cuando no se especificó, la MDH era de *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291. Para el blanco, la disolución de MDH se reemplazó por un tampón acetato 0,05 M (pH 6), usado para disolver la MDH. Para la adición de MDH a T0, se añadieron  $\text{NAD}^+$ , glucosa, fructosa y MDH todos al mismo tiempo, es decir después del periodo de prefermentación de 20 minutos. La actividad de MDH se midió espectrofotométricamente. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático de MDH a una mezcla de reacción que contenía 200  $\mu\text{l}$  de glucosa al 10%, 200  $\mu\text{l}$  de disolución de NADH 1,25 mM (preparada en un tampón acetato 0,125 mM a pH 5,5), 100  $\mu\text{l}$  de disolución fisiológica y 50  $\mu\text{l}$  de disolución de D-fructosa 1,2 M (también preparada en tampón acetato 0,2 M a pH 5,5). Se registró el cambio de absorbancia a 340 nm en función del tiempo. Se calculó la disminución lineal inicial en la absorbancia ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) y se usó para determinar la actividad enzimática como U por 1 mezcla de reacción.

$$U/l_{\text{mezcla de reacción}} = (\Delta A_{340} \text{ nm/min}) * (1000/6,22)$$

#### Ejemplo 11: Estudios de inhibición de NPP *in vitro*

Para realizar estudios de inhibición de nucleótido pirofosfatasa (NPP) *in vitro*, se preparó una mezcla de reacción de 5 ml que contenía 2,5 ml de extracto de harina (véase el ejemplo 12), 1,5 ml de disolución de  $\text{NAD}^+$  o NADH y 1 ml de inhibidor potencial. Las coenzimas e inhibidores se disolvieron en un tampón acetato 0,2 M a pH 5,5. La concentración de coenzima final fue de 0,5 mM, a menos que se mencione otra cosa. La concentración final de los diferentes inhibidores sometidos a prueba se proporciona en la tabla 3. Los diferentes fosfatos (fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), metafosfato de sodio ( $(\text{NaPO}_3)_n$ ), tripolifosfato de pentasodio ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ), pirofosfato de tetrasodio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) y pirofosfato de dicalcio ( $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$ )) se sometieron a prueba en una concentración de 10 g/l. Para los experimentos de reactivación con iones metálicos y para someter a prueba un efecto sinérgico de glicina con EDTA, se adaptó la mezcla de reacción: se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de inhibidor junto con 500  $\mu\text{l}$  de catión o glicina en lugar de 1 ml de inhibidor. Para los experimentos de reactivación con iones metálicos, se usaron las formas de cloruro de los cationes, es decir  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{CaCl}_2$ .

Tabla 3. Concentración de los inhibidores potenciales en la mezcla de reacción final

Inhibidor	Concentración (mM)
EDTA	0,003-10
AMP	0,5-10
ADP1	1
Nicotinamida	10
DTT	4
L-cisteína	0,1-40
Glutati6n reducido	10
Mercaptoetanol	16
Pirofosfato de sodio	20-100
Pirofosfato de calcio	10-100
Glicina	5-100

#### Ejemplo 12: Preparación de un extracto de harina de trigo

Se preparó un extracto de harina basándose en el método descrito por Honold *et al.* (1966, Cereal Chemistry 43:517-528). A 5 g de harina, se le añadieron 25 ml de una disolución de sacarosa acuosa al 12,5%. La disolución se homogeneizó con un mezclador UltraTurrax (IKA Werke, Janke & Kunkel GmbH & CoKG, Staufen, Alemania). Esta suspensión de harina homogeneizada se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm (77 g) (centrífuga Sorvall RC 5B, rotor SS34). El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de papel de filtro Whatman n.º 1. El filtrado se usó como extracto de harina en bruto. Todas las etapas se llevaron a cabo entre 0°C y 5°C.

#### **Lista de secuencias**

<110> PURATOS N.V.

<120> Inhibidor de nucleótido pirofosfatasa y sistema de regeneración de coenzimas

<130> BP.PURA.029B/WO

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

ES 2 698 206 T3

<210> 1  
<211> 14  
<212> PRT  
5 <213> *Triticum durum*

<220>  
<221> misc\_feature

10 <223> Parte N-terminal de la nucleótido pirofosfatasa encontrada en harina de trigo

<400> 1  
          Gly Ile Asp Asp Arg His Glu Val Asp Leu Pro Pro Arg Pro  
          1                          5  10

15 <210> 2  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Triticum durum*

20 <220>  
<221> misc\_feature

<223> Parte N-terminal (2) de la nucleótido pirofosfatasa encontrada en harina de trigo

25 <400> 2  
          Ile Asp Asp Arg His Glu Val Asp Leu Pro Pro Arg Pro  
          1                          5  10

**REIVINDICACIONES**

1. Método para inhibir la degradación de coenzimas nicotinamida en un producto a base de trigo, que comprende la adición de una cantidad eficaz de inhibidor de nucleótido pirofosfatasa a dicho producto a base de trigo, y en el que además se añade un sistema de regeneración de coenzimas al producto a base de trigo.  
5
2. Método según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de nucleótido pirofosfatasa es pirofosfato.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el producto a base de trigo es una masa.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la masa se fermenta con levadura.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el sistema de regeneración de coenzimas comprende al menos una hidrogenasa o deshidrogenasa dependiente de NAD(P) o NAD(P)H.  
10
6. Método según la reivindicación 5, en el que el sistema de regeneración de coenzimas comprende manitol deshidrogenasa y D-fructosa.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho inhibidor de nucleótido pirofosfatasa inhibe una nucleótido pirofosfatasa presente en el producto a base de trigo y que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal que es (G)IDDRHEVDLPPRP.  
15
8. Masa que comprende un inhibidor de nucleótido pirofosfatasa tal como pirofosfato, y un sistema de regeneración de coenzimas, que comprende preferiblemente al menos una hidrogenasa o deshidrogenasa dependiente de NAD(P) o NAD(P)H.
9. Masa según la reivindicación 8, en la que el sistema de regeneración de coenzimas comprende manitol deshidrogenasa y D-fructosa.  
20

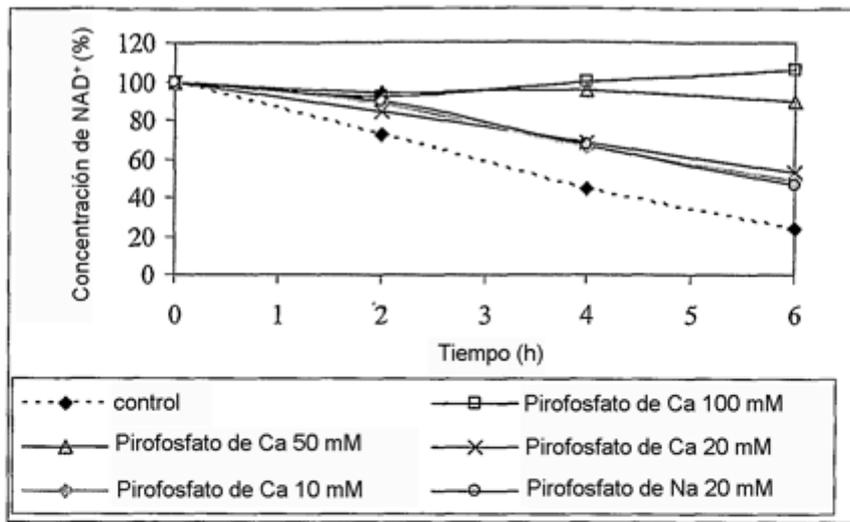


Fig. 1

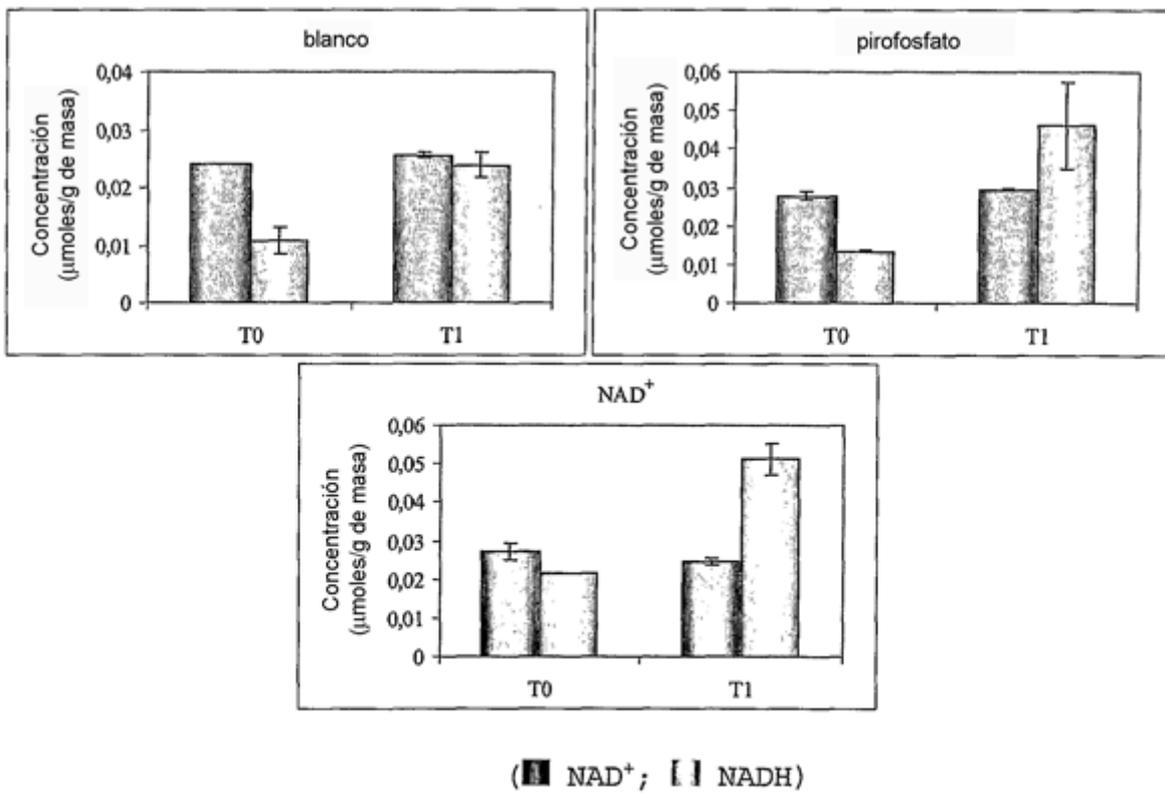


Fig 2

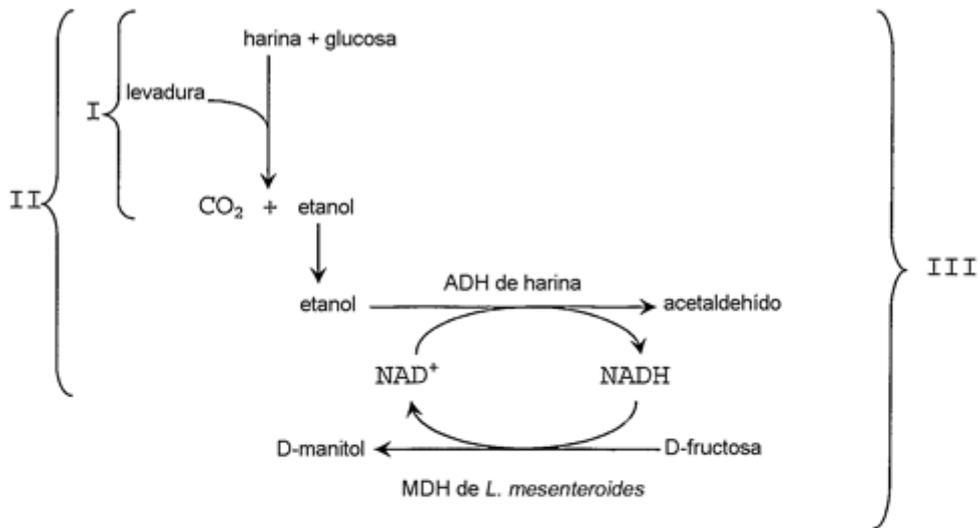


Fig. 3

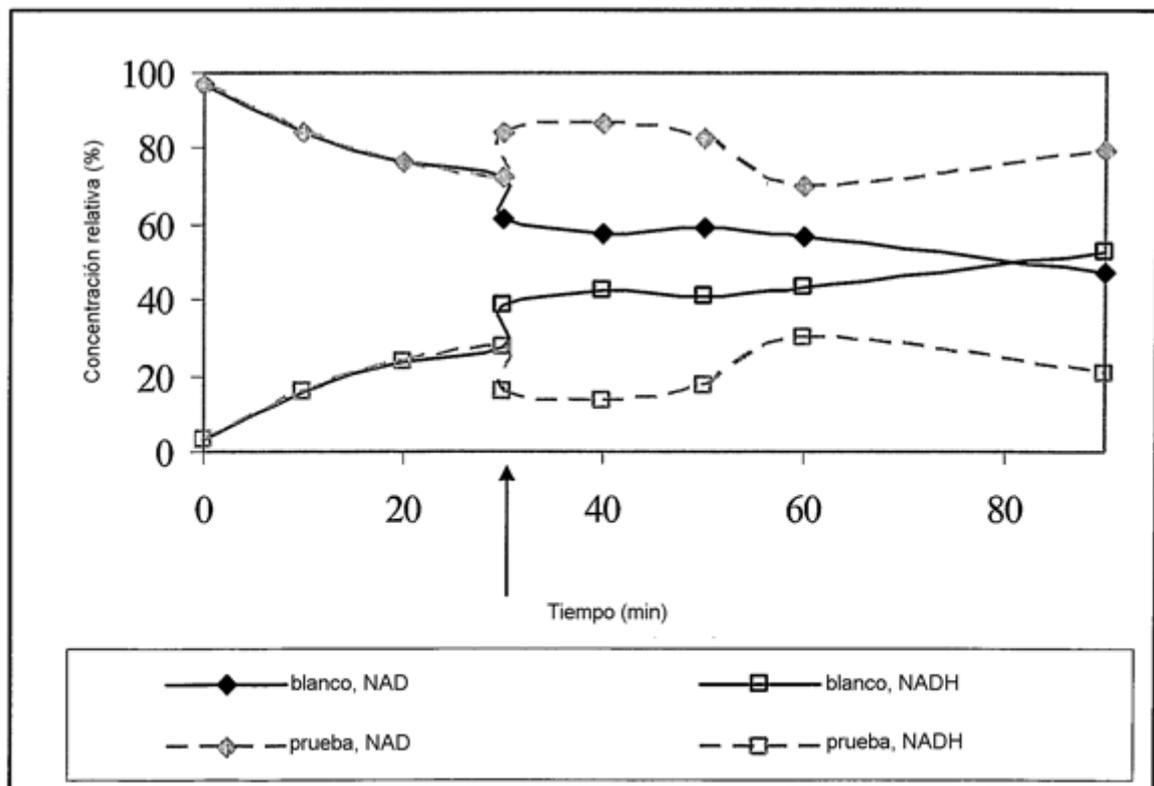


Fig. 4

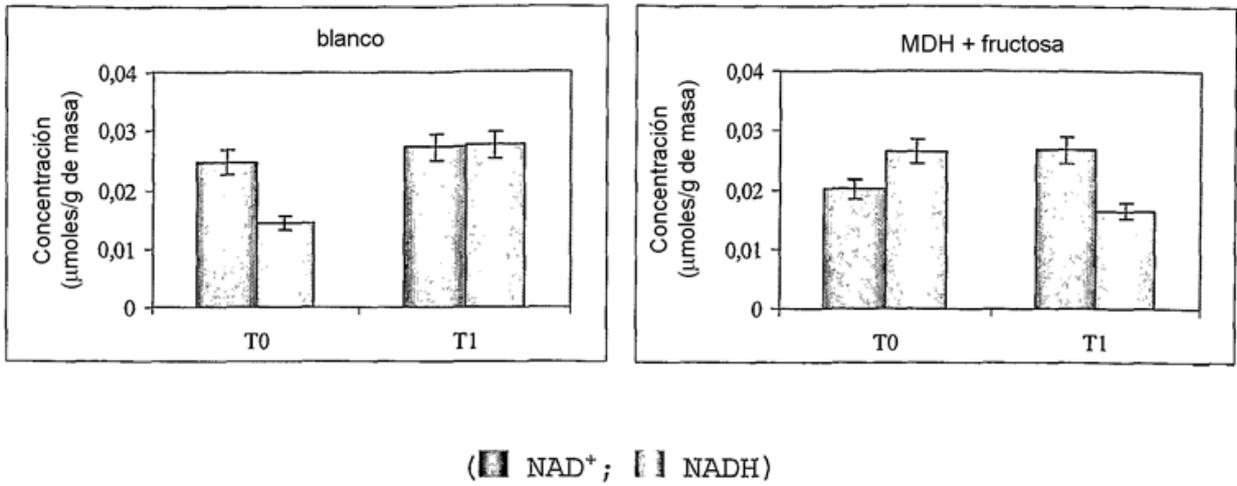


Fig. 5

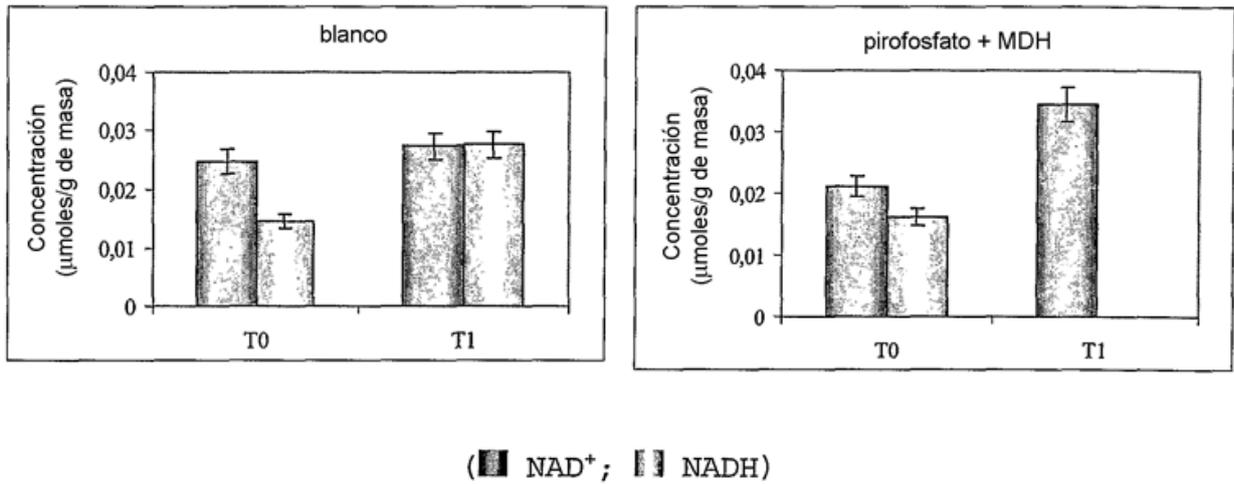


Fig. 6