

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 443**

51 Int. Cl.:

A21D 8/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2016 PCT/EP2016/073383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17060165**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2016 E 16781308 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3358959**

54 Título: **Productos gasificantes líquidos estables**

30 Prioridad:

06.10.2015 BE 201505633

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

23.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LACAZE, GUYLAINE;
GLORIEUX, STEVE y
GENOT, BERNARD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 807 443 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

Productos gasificantes líquidos estables

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para preparar productos gasificantes líquidos estables para aplicaciones alimentarias, más en particular para productos horneados, a su uso y su producción.

10 **Antecedentes de la invención**

El pan y el producto horneado se obtienen habitualmente al hornear una masa obtenida por la fermentación de harina de cereal, tal como harina de trigo, mediante un agente gasificante. El método de gasificación más habitual es añadir levadura de panadería como agente gasificante directamente a la masa antes del mezclado y la fermentación. La levadura más habitual usada para hornear es *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura se puede introducir en la masa como un producto líquido (crema de levadura), como levadura fresca comprimida o como producto seco (levadura seca activa o levadura seca activa instantánea).

La gasificación de una masa puede realizarse por otros medios, más en particular mediante la introducción de otros tipos de agentes gasificantes activos, tales como un prefermento, una masa madre o una masa esponjosa. Un prefermento es una masa obtenida por fermentación espontánea de agua y harina a 30-35 °C por bacterias de ácido láctico y levadura(s). Una masa madre se obtiene en general mediante la fermentación de harina de cereal por bacterias y/o levaduras de ácido láctico, que tiene un sabor ácido característico debido a que las bacterias del ácido láctico producen principalmente ácido láctico, ácido acético y algunos compuestos menores y las habituales notas altas del sabor producidas por la levadura. En general, se obtiene una masa esponjosa mediante la fermentación de harina de cereal por levadura, que tiene un sabor característico debido a dicha fermentación de levadura. Estos agentes gasificantes pueden estar en forma líquida o de pasta. Además o en lugar de la harina de cereal, las materias primas pueden incluir cereales hidrolizados, fracciones de cereales (harina), ... Asimismo, se han identificado muchas especies diferentes de levadura y bacterias, siendo estas responsables de los muchos sabores diferentes que se pueden encontrar en productos horneados (para una revisión véase, por ejemplo, Salim-ur-Rehman, Trends in Food Science and Technology (2006) vol 17, p. 557).

Dichos agentes gasificantes activos deben almacenarse a baja temperatura y tienen una conservación limitada. Los documentos EP0684306B2 y EP0684308B2 describen, por ejemplo, productos gasificantes líquidos estabilizados mediante filtración o centrifugación que son estables durante aproximadamente 21 días.

El documento EP1711062 desvela que la presencia de azúcares o harinas fermentables, incluso a niveles muy bajos, tiene un efecto negativo sobre la estabilidad de las composiciones gasificantes líquidas. El documento EP1711062 desveló, por tanto, que para obtener composiciones gasificantes líquidas estables, el nivel de azúcar residual de la composición gasificante líquida debe mantenerse por debajo de 0,5 % en peso, para evitar la refermentación del producto líquido de levadura durante el almacenamiento, tal como realizando la hidrólisis de harina o almidón, presente en la composición gasificante, y eliminando los azúcares liberados mediante una etapa de fermentación microbiana.

El uso de enzimas para mejorar el rendimiento del proceso de horneado a nivel de masa o producto horneado es bien conocido. Se usa, por ejemplo, amiloglucosidasa para aumentar el nivel de azúcares disponibles responsables del dorado de la corteza.

En la actualidad, la mayoría de los productos gasificantes líquidos a base de cereales o fermentación de hidrolizados de cereales muestran una escasa estabilidad durante el almacenamiento, incluso a baja temperatura. Existe, por lo tanto, la necesidad de productos gasificantes líquidos más estables para la preparación de productos horneados.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para estabilizar un producto gasificante líquido.

Un primer objeto de la presente invención se refiere a un método para estabilizar una composición gasificante líquida activa que comprende células activas de levadura y/o bacterias del ácido láctico, o a un método para obtener dicha composición gasificante líquida activa, en donde dicho método comprende la etapa de añadir una fuente de amilasa a dicha composición gasificante líquida.

En particular, la presente invención se refiere a un método para estabilizar una composición gasificante líquida activa que comprende células de levadura activas y opcionalmente células de bacterias del ácido láctico, en donde dicho método comprende las etapas de

(i) mezclar un sustrato de fermentación, que comprende un cereal, una fracción de cereal y/o un hidrolizado de cereal, con agua para obtener una mezcla de fermentación;

- (ii) añadir a la mezcla de fermentación una o más cepas de levadura y opcionalmente una o más cepas de bacterias del ácido láctico; y
- (iii) fermentar la mezcla de fermentación para obtener una composición gasificante líquida; antes de (iv) la adición de la fuente de amilasa a dicha composición gasificante líquida;

5 en donde la cantidad restante de azúcar fermentable de la composición gasificante líquida es al menos 0,5 % en peso.

10 También se desvela una composición gasificante líquida estable que comprende (i) una composición microbiana líquida que comprende células activas de levadura y/o bacterias del ácido láctico y un sustrato de cereal fermentado, en donde dicho sustrato comprende uno o más cereales, fracciones de cereales y/o hidrolizados de cereales; y (ii) una fuente de amilasa. En realizaciones particulares, dicha composición gasificante líquida estable tiene un nivel de azúcar fermentable de al menos 0,5 % en peso.

15 En particular, se desvela una composición gasificante líquida estable que comprende (i) una composición microbiana líquida que comprende células activas de levadura y opcionalmente células de bacterias del ácido láctico y un sustrato de cereal fermentado, en donde dicho sustrato comprende uno o más cereales, fracciones de cereales y/o hidrolizados de cereales; (ii) una fuente de amilasa y (iii) un nivel de azúcar fermentable de al menos 0,5 % en peso.

20 En realizaciones particulares de la presente invención, la fuente de amilasa es una alfa-amilasa, una amiloglucosidasa o harina de malta activa o cualquier combinación de las mismas, En realizaciones particulares, la fuente de amilasa es:

- una alfa-amilasa en una concentración entre 10 y 80 SKB/g de agente gasificante líquido; y/o
- una amiloglucosidasa en una concentración entre 1 y 30 UAG/g de agente gasificante líquido; y/o
- 25 - harina de malta activa en una concentración entre 1 y 16 UD/g de agente gasificante líquido. En una realización particularmente preferida, la fuente de amilasa es una amiloglucosidasa y/o harina de malta activa, lo más preferentemente es harina de malta activa.

30 En realizaciones particulares de la presente invención, el agente gasificante líquido activo comprende al menos una cepa de *Saccharomyces* o *Kazachstania* como al menos una de las cepas de levadura presentes en el agente gasificante líquido. Más en particular, dicha cepa de levadura comprende al menos una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Kazachstania bulderi*. Lo más preferentemente, dicha cepa de levadura comprende la cepa de *Kazachstania bulderi* MUCL54530.

35 En realizaciones particulares de la presente invención, la composición gasificante líquida comprende una cantidad de células de levadura entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente $5 \cdot 10^9$ ufc/ml y, opcionalmente, una cantidad de bacterias del ácido láctico entre 0 y $1 \cdot 10^9$ ufc/ml.

40 En realizaciones particulares de la presente invención, la composición gasificante líquida tiene un pH entre aproximadamente 3,4 y aproximadamente 6.

En realizaciones particulares de la presente invención, el método para obtener una composición gasificante líquida estable o el método para estabilizar una composición gasificante líquida comprende además las etapas de:

- 45 (i) mezclar un sustrato de fermentación, que comprende un cereal, una fracción de cereal y/o un hidrolizado de cereal, con agua para obtener una mezcla de fermentación;
- (ii) añadir a la mezcla de fermentación una o más cepas de levadura y/o una o más cepas de bacterias del ácido láctico; y
- 50 (iii) fermentar la mezcla de fermentación para obtener una composición gasificante líquida; antes de (iv) la adición de la fuente de amilasa.

En realizaciones particulares, el sustrato de fermentación comprende además una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, vitaminas y/o minerales.

55 En realizaciones particulares, el método de la presente invención comprende además la etapa de (v) añadir una o más cepas de levadura adicionales y/o bacterias del ácido láctico. En realizaciones particulares, el método de la presente invención comprende además la etapa de (vi) añadir agentes estabilizantes adicionales a la composición gasificante líquida obtenida.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un producto horneado que comprende las etapas de (a) preparar una composición gasificante líquida estable mediante las etapas de (i) mezclar un sustrato de fermentación, que comprende un cereal, una fracción de cereal y/o un hidrolizado de cereal, con agua para obtener una mezcla de fermentación; (ii) añadir a la mezcla de fermentación una o más cepas de levadura y opcionalmente una o más cepas de bacterias del ácido láctico; y (iii) fermentar la mezcla de fermentación para obtener una composición gasificante líquida; antes de (iv) la adición de la fuente de amilasa a dicha composición gasificante líquida; en donde la cantidad restante de azúcar fermentable de la composición gasificante líquida es al menos 0,5 % en peso;

y en donde la composición gasificante líquida comprende una cantidad de células de levadura entre aproximadamente 105 y aproximadamente 5.109 ufc/ml; y (b) añadir la composición gasificante líquida estable obtenida a la receta de dicho producto horneado.

- 5 Las anteriores y otras características, elementos y ventajas de los conceptos descritos en el presente documento resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que ilustra, a modo de ejemplo, los principios de la invención.

Descripción detallada de la invención

- 10 Antes describir las presentes composiciones, métodos, usos, productos horneados y cepas usados en la invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a composiciones, métodos, usos, productos horneados y cepas particulares descritos, ya que dichas composiciones, métodos, usos, productos horneados y cepas pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que no se pretende que la terminología usada en el presente documento sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

- 15 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

- 20 En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 25 Las expresiones "que comprende", "comprende" y "compuesto por" como se usan en el presente documento son sinónimas de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene" y son inclusivas o abiertas y no excluyen miembros, elementos o etapas de métodos adicionales, no enumerados. Las expresiones "que comprende", "comprende" y "compuesto por" también incluyen la expresión "que consiste en".

- 30 El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, se entiende que abarca variaciones de +/- 10 % o menos, preferentemente +/- 5 % o menos, más preferentemente +/- 1 % o menos y aún más preferentemente del +/- 0,1 % o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones son adecuadas para realizar en la invención desvelada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se desvela en sí mismo de manera específica y preferente.

- 35 La enumeración de intervalos numéricos por valores extremos incluye todos los números y fracciones abarcados dentro de los intervalos respectivos, así como los valores extremos enumerados.

- 40 Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que era posible estabilizar agentes gasificantes líquidos y obtener una composición gasificante líquida estable que tenga una mayor vida útil que conserve su potencia de fermentación durante el almacenamiento mediante el uso de enzimas que tienen actividad amilasa, es decir, enzimas capaces de hidrolizar los enlaces alfa-1,4-glucosídicos en polímeros de glucosa tales como, p. ej., almidón y dextrinas. De hecho, los inventores descubrieron que, tras la complementación con amilasa, las composiciones gasificantes líquidas presentan una potencia de fermentación o potencia de gasificación más estable o, dicho de otro modo, un nivel de producción de CO₂ más estable durante la fermentación, después del almacenamiento de la composición gasificante líquida durante varias semanas, en comparación con los agentes gasificantes líquidos sin complementar. Sorprendentemente, este efecto estabilizante de las amilasas era independiente del nivel de azúcar fermentable de la composición gasificante líquida y este efecto podría verse incluso a niveles de azúcar superiores a 0,5 % en peso. Provechosamente, en los métodos y las composiciones de la presente invención, no es necesario tomar ninguna medida para eliminar la mayoría de los azúcares fermentables (que normalmente tienen un grado de polimerización de 1 o 2) y para garantizar que el nivel residual de azúcar fermentable de la composición gasificante líquida se mantenga inferior a 0,5 % en peso, 0,4 % en peso, 0,3 % en peso, 0,2 % en peso o 0,1 % en peso.

- 55 En el contexto de la presente invención, las expresiones "agente gasificante líquido", "composición gasificante líquida" y "producto gasificante líquida" se usan en general indistintamente y se refieren a un producto líquido procedente de la fermentación de un cereal, fracciones de cereales, hidrolizados de cereales o subproductos de cereales (fracciones) que contienen levaduras activas y bacterias lácticas opcionalmente activas en una cantidad suficiente para permitir la gasificación de una masa, tal como capaz de producir (todo) el CO₂ necesario para lograr una buena elevación de una masa durante la(s) etapa(s) de fermentación (antes de hornear). En particular, según lo previsto en el presente documento, la expresión "composición gasificante líquida estable" se refiere a un agente gasificante líquido estabilizado u obtenido mediante un método según la presente invención.

- 65 La levadura, según lo previsto en el presente documento, puede ser cualquier cepa de levadura adecuada para la

- gasificación de la masa. Se pueden elegir cepas adecuadas entre cepas de *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kazachstania*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Wieckerhamomyces*, *Lachancea* o *Metschnikowia*; Preferentemente, la cepa de levadura es una cepa de *Saccharomyces* o una cepa de *Kazachstania*. Más preferentemente, la cepa de levadura es cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Kazachstania bulderi*. En realizaciones particulares, la cepa de levadura es *Kazachstania bulderi* depositada con el número de referencia MUCL54530 (véase tabla 1 para información sobre depósitos).

Tabla 1: Indicaciones relacionadas con el microorganismo depositado MUCL54530

Número de referencia proporcionado por la institución depositaria	MUCL 54530
Referencia de identificación proporcionada por el depositante	SE3
Nombre de la institución depositaria	Colecciones coordinadas belgas de microorganismos BCCM/MUCL
Dirección de la institución depositaria	Université Catholique de Louvain (UCL) Laboratorio de micología Place Croix du Sud; 3 B-1348 Lovaina la Nueva Bélgica
Fecha de depósito	8 de enero de 2013
Nombre del depositante	PURATOS NV
Dirección del depositante	Industrialaan 25 B-1702 Groot-Bijgaarden Bélgica

- 10 La cepa bacteriana, si está presente en un producto gasificante líquido preparado según la presente invención, es cualquier cepa de bacterias del ácido láctico, preferentemente una cepa de *Lactobacillus*, más preferentemente una cepa de *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus brevis*. En otra realización, una mezcla de diferentes bacterias del ácido láctico está presente en el agente gasificante, preferentemente una mezcla de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*.

- 15 En el contexto de la presente invención, el término "cereal" se refiere a plantas de la familia botánica de las *Poaceae*, en particular a los componentes comestibles de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, especies tales como trigo, cebada, avena, escanda, centeno, sorgo, maíz, triticale, mijo, tef y arroz. Preferentemente, los cereales se eligen entre el grupo de trigo, maíz, arroz o centeno. El término "cereal" incluye también cereales malteados. "Fracción de cereal", en el contexto de la presente invención, se refiere a todas o parte de las fracciones resultantes de la reducción mecánica del tamaño de los granos de cereales, por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, corte, laminado, aplastamiento, rotura o molienda, con o sin fraccionamiento, que a su vez puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, tamizado, cribado, cernido, soplado, aspirado, cernido centrífugo, cernido por aire, separación electrostática o separación de campo eléctrico. Son ejemplos no limitantes de fracciones de cereales harina, harina integral, salvado, sémola,... Son fracciones de cereales preferidas harinas, harinas integrales, salvados y/o cualquier combinación de los mismos. "Cereal" o "fracción de cereal", en el contexto de la presente invención, también comprende cereales procesados y fracciones de cereales procesados. Son ejemplos de cereales procesados o fracciones de cereales procesados cereales malteados o fracciones de cereales malteados, cereales tostados o fracciones de cereales tostados,... La expresión "hidrolizado de cereal", en el contexto de la presente invención, se refiere a productos que resultan de la hidrólisis enzimática de una dispersión acuosa de un cereal o una fracción de cereal. Las enzimas hidrolíticas son en general amilasas, tales como alfa o beta-amilasas, beta-gluconasas y/o pentosanases y opcionalmente proteasas. Los hidrolizados de cereales pueden estar en forma líquida o de polvo (seca).

- 35 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para estabilizar un agente gasificante líquido o para obtener una composición gasificante líquida estable, preferentemente un método para estabilizar la vida útil del agente gasificante líquido y/o la potencia de fermentación o el nivel de producción de CO₂ de un agente gasificante líquido, que comprende la etapa de añadir una fuente de amilasa a dicho agente/composición gasificante líquido. En realizaciones particulares, la composición gasificante líquida estabilizada de este modo tiene preferentemente una o más de las propiedades que se detallan adicionalmente más adelante.

En particular, la invención se refiere a un método para estabilizar una composición gasificante líquida activa que comprende células de levadura activas y opcionalmente células de bacterias del ácido láctico, en donde dicho método comprende las etapas de

- 45 (i) mezclar un sustrato de fermentación, que comprende un cereal, una fracción de cereal y/o un hidrolizado de

cereal, con agua para obtener una mezcla de fermentación;

(ii) añadir a la mezcla de fermentación una o más cepas de levadura y opcionalmente una o más cepas de bacterias del ácido láctico; y

5 (iii) fermentar la mezcla de fermentación para obtener una composición gasificante líquida; antes de (iv) la adición de la fuente de amilasa a dicha composición gasificante líquida;

en donde la cantidad restante de azúcar fermentable de la composición gasificante líquida es al menos 0,5 % en peso.

10 Según lo previsto en el presente documento, la fuente de amilasa se elige preferentemente del grupo de alfa-amilasas, amiloglucosidasas y/o harina de malta activa. Preferentemente, la fuente de amilasa es harina de malta activa y/o una amiloglucosidasa. Aún más preferentemente, la fuente de amilasa es harina de malta activa. En particular, en el caso de la harina de malta, y aunque la adición de harina de malta como tal al agente gasificante líquido inevitablemente añade harina y azúcares fermentables (es decir, factores que afectan negativamente la estabilidad del producto) al agente gasificante líquido, la complementación con harina de malta promovió sorprendentemente la estabilidad del agente gasificante líquido sin realizar una etapa adicional para eliminar los azúcares fermentables residuales de la composición.

20 La persona experta comprenderá que combinaciones de diferentes enzimas de diferentes tipos, tales como harina de malta activa y la amiloglucosidasa, harina de malta activa y alfa-amilasa, amiloglucosidasa y alfa-amilasa o harina de malta activa, amiloglucosidasa y alfa-amilasa, también son particularmente adecuadas para el fin de la presente invención.

25 La harina de malta activa es un producto seco hecho de cebada germinada, que comprende aproximadamente 80 % de hidratos de carbono, principalmente almidón y productos de degradación del almidón, y aproximadamente 10 % de proteína. Como fuente de amilasa, contiene principalmente alfa y beta-amilasa. En realizaciones particulares, la harina de malta activa se añade al producto gasificante líquido en una cantidad correspondiente a una actividad entre 1 y 16 UD/g, preferentemente entre 2 y 8 UD/g.

30 La actividad amilasa de la harina de malta puede determinarse provechosamente usando el método normalizado 4.13 del Convenio Europeo de Cervecería. En este método, la actividad alfa-amilasa se determina como el tiempo necesario para la dextrinización de una solución de almidón normalizada en presencia de un exceso de beta-amilasa. La alfa-amilasa se extrae primero con una solución de cloruro de sodio de 5 g/litro a 20 °C. Después, el extracto enzimático hidroliza una dextrina límite tamponada (20 g/l en acetato de sodio pH 4,7) en presencia de beta-amilasa. La cantidad de almidón que permanece en solución en el punto final especificado del proceso de dextrinización se estima visualmente después de la adición de yodo y usando un disco convencional de color. Una unidad de UD es la cantidad de harina de malta activa necesaria para dextrinizar un gramo de almidón en una hora a 20 °C en presencia de exceso de beta-amilasa. Una persona experta en la materia comprenderá que pueden usarse métodos alternativos para determinar la actividad enzimática de la harina de malta activa en el contexto de la presente invención.

40 La amiloglucosidasa, también conocida como glucoamilasa o glucano 1,4-alfa-glucosidasa (EC 3.2.1.3), es la enzima que cataliza la hidrólisis de restos terminales de alfa-D-glucosa con enlaces (1,4) sucesivamente desde los extremos no reductores de las cadenas de glucanos con liberación de beta-D-glucosa. En realizaciones particulares de la presente invención, la amiloglucosidasa es una amiloglucosidasa de *Talaromyces emersonii*. En realizaciones particulares, la amiloglucosidasa se añade al agente gasificante líquido en una concentración entre 1 y 30 UAG/g, preferentemente entre 3 y 15 UAG/g, aún más preferentemente 3 y 7,5 UAG/g.

50 La actividad amiloglucosidasa se mide provechosamente en unidades UAG. Una unidad de amiloglucosidasa (UAG) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto en condiciones convencionales (37 °C; tampón de acetato de sodio 100 mM pH 4,3; concentración de sustrato: maltosa 100 mM). La glucosa liberada puede determinarse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo es la fosforilación de la glucosa por ATP, en una reacción catalizada por hexocinasa. El glucosa-6-fosfato formado se oxida después a 6-fosfogluconato por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En esta misma reacción, una cantidad equimolar de NAD⁺ se reduce a NADH con un aumento resultante de la absorbancia a 340 nm. Como alternativa, la glucosa liberada puede convertirse en gluconolactona por glucosa deshidrogenasa en presencia de NAD⁺ que se convierte en NADH. El cambio en la concentración de NAD⁺ también se mide fotométricamente a 340 nm. En ambos casos, se prepara una curva patrón con soluciones de glucosa de concentraciones conocidas. Provechosamente, se puede usar un sistema autoanalizador. Un sistema autoanalizador adecuado es, por ejemplo, el analizador Konelab 20 (Thermo Fisher Scientific). Un experto en la materia entenderá que se pueden usar métodos alternativos adicionales para determinar la actividad amiloglucosidasa en el contexto de la presente invención.

60 La alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) es la enzima que hidroliza los enlaces alfa-(1,4) entre restos de glucosa de polisacáridos de glucosa con enlaces alfa, grandes, tales como almidón y glucógeno, produciendo glucosa, maltosa y dextrinas. En realizaciones particulares de la presente invención, la alfa-amilasa es una amilasa fúngica, preferentemente es una alfa-amilasa de *Aspergillus* sp, más preferentemente es una alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*. En realizaciones particulares, la alfa-amilasa se añade al agente gasificante líquido en una concentración entre 10 y 80 SKB/g, preferentemente entre 20 y 40 SKB/g.

La actividad alfa-amilasa se puede determinar provechosamente usando un ensayo colorimétrico basado en la hidrólisis del sustrato 4,6-etiliden-4-nitrofenil-alfa-D-maltoheptaosa. La hidrólisis de este sustrato por la alfa-amilasa junto con una alfa-glucosidasa añadida libera el compuesto amarillo p-nitrofenol que puede medirse mediante fotometría a 405 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la actividad alfa-amilasa. La reacción enzimática se realiza en un tampón de fosfato de potasio 50 mM pH 7,0. Están disponibles en el mercado kits de reactivos y aparatos adecuados para determinar la actividad de alfa-amilasa. Los ejemplos de dichos kits de reactivos y aparatos incluyen la α -amylase AMYL Liquide (Roche Diagnostics 1.555.963) y el analizador Konelab Arena 20 (Thermo Fisher Scientific). La actividad y concentración de alfa-amilasa se expresa provechosamente en unidades SKB, una unidad de referencia usada habitualmente en los campos de panadería e ingredientes de panadería, obtenida originalmente hidrolizando almidón a un determinado valor de yodo (en donde 1 unidad SKB corresponde a la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 g de almidón solubilizado en 1 hora). En la actualidad, todos los métodos y kits usan métodos alternativos, pero proporcionan un factor de conversión para convertir los valores en unidades SKB. Un experto en la materia entenderá que se pueden usar métodos alternativos adicionales para determinar la actividad alfa-amilasa para realizar la presente invención.

También se proporciona una composición gasificante líquida estable que comprende (i) una composición gasificante microbiana líquida que comprende células activas de levadura y/o bacterias del ácido láctico y un sustrato de cereal fermentado, en donde dicho sustrato de cereal comprende uno o más cereales, fracción o fracciones de cereales y/o hidrolizados de cereales; y (ii) una fuente de amilasa.

En particular, se proporciona una composición gasificante líquida estable que comprende (i) una composición microbiana líquida que comprende células activas de levadura y opcionalmente células de bacterias del ácido láctico y un sustrato de cereal fermentado, en donde dicho sustrato comprende uno o más cereales, fracciones de cereales y/o hidrolizados de cereales; (ii) una fuente de amilasa y (iii) un nivel de azúcar fermentable de al menos 0,5 % en peso.

En realizaciones particulares, dicha composición gasificante líquida estable, en particular según se obtiene por al menos uno de los métodos previstos en el presente documento, comprende una fuente de amilasa, preferentemente elegida del grupo de alfa-amilasas, amiloglucosidasas, harina de malta activa o una combinación de las mismas. Más preferentemente, dicha composición gasificante líquida estable comprende una actividad amilasa de entre 1 y 16 UD/g si la amilasa es harina de malta activa, y/o una actividad amilasa de entre 1 y 30 UAG/g si la amilasa es amiloglucosidasa y/o entre 10 y 80 SKB/g si la amilasa es alfa-amilasa.

En realizaciones particulares, dicha composición o producto gasificante líquido estable, en particular según se obtiene por al menos uno de los métodos previstos en el presente documento, comprende una cantidad de células de levadura entre aproximadamente 10^5 y alrededor de $5 \cdot 10^9$ ufc/ml y, opcionalmente, una cantidad de bacterias del ácido láctico entre 0 y $1 \cdot 10^9$ ufc/ml.

En realizaciones particulares, dicha composición o producto gasificante líquido estable, en particular según se obtiene por al menos uno de los métodos previstos en el presente documento, tiene un pH entre aproximadamente 3,4 y aproximadamente 6.

En realizaciones particulares, dicha composición o producto gasificante líquido estable, en particular según se obtiene por al menos uno de los métodos previstos en el presente documento, tiene una potencia gasificante de (i) entre aproximadamente 600 ml y aproximadamente 1300 ml de CO_2 producido en 2 horas cuando se mide mediante un análisis SJA como se describe en el presente documento o (ii) entre 300 y 500 ml después de 4 h a 35 °C cuando se mide mediante un análisis de risógrafo como se describe en el presente documento con una dosis del agente gasificante en la masa de 10 % en función del peso de la harina.

La potencia gasificante del agente gasificante obtenido según la presente invención se puede medir mediante uno de los siguientes métodos:

- Análisis SJA: se prepara una masa con 280 g de harina de trigo, agente gasificante o levadura en una cantidad correspondiente a 1,37 g de materia seca de levadura, 5,04 g de NaCl y agua hasta un nivel total de hidratación de la masa del 35 %. La masa se mezcla durante 6 minutos en un harinógrafo (SCHMERSAL) a 30 °C. Después se introducen 300 g de masa en una cámara de fermentógrafo SJA (máquina Mekab, Mekab i Nassjö AB) a 37 °C. El análisis dura 2 horas. El resultado del análisis se expresa mediante la adición del volumen de CO_2 producido durante la primera hora y el volumen de CO_2 producido durante la segunda hora.
- análisis de risógrafo: la potencia gasificante se puede medir con un risógrafo (National Manufacturing; Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). El análisis se realiza según el siguiente método: se prepara una masa como en el método SJA. Se coloca un trozo de masa de 100 g en un recipiente de muestra del risógrafo y se incuba a 35 °C. El volumen de CO_2 producido por la masa es medido y compilado por el software (RisoSmart, National Manufacturing; Lincoln, Nebraska, Estados Unidos) durante 4 h.

Según lo previsto en el presente documento, el cereal puede ser cualquier cereal. La fracción de cereal puede ser

cualquier fracción de cereal. El hidrolizado de cereal puede ser cualquier hidrolizado de cereal. Preferentemente la fracción de cereal es harina de trigo, sémola de trigo o sémola de trigo duro, más preferentemente sémola de trigo duro. Preferentemente, el hidrolizado de cereal es un hidrolizado de harina de trigo o un hidrolizado de sémola de trigo, más preferentemente un hidrolizado de sémola de trigo duro. En realizaciones particulares, la cantidad de cereal y/o fracción o fracciones de cereales y/o hidrolizado o hidrolizados de cereales usados como sustrato de fermentación está comprendida preferentemente entre 10 y 50 % (peso/peso de la mezcla antes de la fermentación).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un agente gasificante líquido estabilizado o una composición gasificante líquida estable o un método para estabilizar un agente gasificante que comprende las etapas de:

- (i) mezclar un sustrato de fermentación con agua para obtener una mezcla de fermentación;
- (ii) añadir a la mezcla de fermentación

- o una o más cepas de levadura, o
- o una o más cepas de bacterias del ácido láctico o
- o una o más cepas de levadura y una o más cepas de bacterias del ácido láctico;

- (iii) fermentar la mezcla de fermentación para obtener una composición gasificante líquida;
- (iv) añadir una fuente de amilasa (a la composición gasificante líquida) elegida entre:

- o harina de malta activa, preferentemente en una cantidad para obtener entre 1 y 16 UD/g en el agente gasificante líquido, más preferentemente entre 2 y 8 UD/g; y/o
- o amiloglucosidasa, preferentemente en una cantidad para obtener entre 1 y 30 UAG/g en el agente gasificante líquido, más preferentemente entre 3 y 15 UAG/g, aún más preferentemente 3 y 7,5 UAG/g; y/o
- o alfa-amilasa, preferentemente en una cantidad para obtener entre 10 y 80 SKB/g en el agente gasificante líquido, más preferentemente entre 20 y 40 SKB/g,

para obtener una composición gasificante líquida estable.

En realizaciones particulares, dicho método comprende además las etapas opcionales de

- (v) añadir una o más cepas de levadura adicionales y/o bacterias del ácido láctico, y/o
- (vi) añadir agentes estabilizantes adicionales a la composición gasificante líquida obtenida.

Provechosamente, dicho método no comprende una etapa de eliminar los azúcares fermentables después de la adición de amilasa, aunque la fuente de amilasa (p. ej., harina de malta activa, cualquier composición de amilasa/amiloglucosidasa que comprenda harina o almidón como vehículo o agente de carga) puede comprender niveles importantes de azúcares fermentables.

Según lo previsto en el presente documento, los términos "fermentación" o "fermentar" se refieren a un proceso microbiano en el que microorganismos, tales como, p. ej., bacterias y/o levaduras del ácido láctico, convierten hidratos de carbono en dióxido de carbono, ácidos orgánicos y/o alcoholes.

Según lo previsto en el presente documento, el sustrato de fermentación comprende uno o más cereales, fracción o fracciones de cereales y/o hidrolizados de cereales y, opcionalmente, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, vitaminas y/o minerales. En determinadas realizaciones, se pueden añadir ingredientes adicionales a la mezcla de fermentación antes, durante y/o después de la etapa de fermentación (iii). Estos ingredientes adicionales se pueden elegir entre una fuente de nitrógeno, una fuente de proteínas de fósforo, vitaminas, minerales y/o agente estabilizante distinto de amilasa. En realizaciones particulares, dicho sustrato de fermentación comprende entre 5 y 10 % de cereal o cereales, fracción o fracciones de cereales y/o hidrolizado o hidrolizados de cereales (calculado como el peso de azúcares fermentables (que tienen un grado de polimerización de 1 o 2))/peso de la mezcla al final de la fermentación) y depende de la cantidad final deseada de biomasa.

En determinadas realizaciones, las cepas de levadura y/o bacterias del ácido láctico (de la etapa ii) se añaden a la totalidad de la mezcla de fermentación y se mezclan en una sola etapa. En otras realizaciones, la mezcla de fermentación y las cepas de levadura y/o bacterias del ácido láctico se mezclan gradualmente, con complementación adicional de la mezcla de fermentación durante la fermentación: por ejemplo, el sustrato de fermentación se puede añadir como un cultivo semicontinuo.

La fuente de nitrógeno, que puede estar opcionalmente presente en el sustrato de fermentación, puede ser cualquier fuente de nitrógeno adecuada para la fermentación de microorganismos, tales como levaduras o bacterias del ácido láctico. Son ejemplos de fuentes de nitrógeno hidróxido de amonio (NH_4OH), hidrolizado o hidrolizados de proteínas, extracto o extractos de levadura, urea, aminoácidos,... Una fuente de nitrógeno preferida es NH_4OH . La cantidad total de la fuente de nitrógeno añadida a la mezcla está preferentemente entre 0,13 y 0,75 % (peso de NH_4OH equivalente/peso de la mezcla al final de la fermentación) y depende del contenido de proteína diana de la biomasa de levadura al final de la fermentación, del contenido de proteína del inóculo y del contenido de nitrógeno del sustrato de fermentación. En determinadas realizaciones, la fuente de nitrógeno se mezcla con la totalidad de la mezcla de

fermentación. En otras realizaciones, la mezcla de fermentación y la fuente de nitrógeno se mezclan gradualmente, con complementación adicional de la fuente de nitrógeno durante la fermentación: por ejemplo, el sustrato de fermentación/fuente de nitrógeno se puede añadir como un cultivo semicontinuo.

5 La fuente de fósforo, que puede estar opcionalmente presente en el sustrato de fermentación, puede ser cualquier fuente de fósforo adecuada para la fermentación de microorganismos. Una fuente de fósforo adecuada es, por ejemplo, H_3PO_4 . La cantidad total de la fuente de fósforo añadida a la mezcla está preferentemente entre 0,11 y 0,25 % (peso de H_3PO_4 equivalente/peso de la mezcla al final de la fermentación) y depende del contenido de fósforo diana de la biomasa de levadura al final de la fermentación y el contenido de fósforo inicial de la fermentación.

10 El tipo y las cantidades de vitaminas y minerales, que pueden estar presentes opcionalmente en el sustrato de fermentación, pueden variar dependiendo del sustrato y la cepa de levadura usada. Habitualmente se eligen entre azufre (S), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), sodio (Na), cinc (Zn), hierro (Fe), cobre (Cu), silicio (Si), manganeso (Mn), cobalto (Co), molibdeno (Mo), boro (B), yodo (I), aluminio (Al), biotina (B8), tiamina (B1), pantotenato (B3), inositol, piridoxina (B6), ácido nicotínico (PP),...

15 Antes de mezclarla con/añadirla a la mezcla de fermentación según la etapa (ii), la levadura, según lo previsto en el presente documento, puede prepararse mediante métodos bien conocidos por la persona experta. Por ejemplo, la levadura puede cultivarse en melaza o hidrolizado o hidrolizados de cereales en etapas sucesivas: un precultivo, un cultivo discontinuo seguido de una fermentación de levadura de siembra en cultivo semicontinuo (proceso de aumento de escala). La cantidad de levadura añadida a la mezcla es preferentemente entre 10^7 y $5 \cdot 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC)/g de sustrato de fermentación. En determinadas realizaciones de la presente invención, por ejemplo, cuando se inicia la fermentación en ausencia de levadura (fermentación de bacterias del ácido láctico), se pueden añadir cepa o cepas de levadura durante y/o al final de la etapa de fermentación en una concentración entre 10^6 y 10^9 UFC/ml.

20 La cantidad de bacterias del ácido láctico, según lo previsto en el presente documento, añadidas al sustrato de fermentación es preferentemente entre 10^5 y 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/g de sustrato de fermentación.

30 La etapa de fermentación se realiza usando métodos bien conocidos en la técnica y se ajusta dependiendo del tipo deseado de agente gasificante. El tiempo de fermentación puede ser de 6 a 72 horas. Se puede añadir sustrato de fermentación (cereal, fracción o fracciones de cereales y/o hidrolizado o hidrolizados de cereales, con una fuente opcional de nitrógeno y/o una fuente de fósforo) al principio (fermentación discontinua) o en diferentes etapas durante la fermentación (paso a paso o progresivamente, tal como en una fermentación semicontinua). La adición de sustrato de fermentación se puede controlar mediante la evaluación continua de parámetros específicos de la fermentación (tales como, pero sin limitación, la concentración de sustrato residual, pO_2 o concentración de etanol,...). Otros parámetros de fermentación tales como la temperatura, el pH, pO_2 , la concentración de ácido láctico y/o la concentración de ácido acético se pueden supervisar y mantener en valores específicos según el perfil de fermentación deseado.

40 Al final de la fermentación se añade una fuente de amilasa. En realizaciones particulares, la fuente de amilasa se elige del grupo de harina de malta activa, amiloglucosidasa y/o alfa-amilasa. Más preferentemente, la fuente de amilasa es harina de malta activa o amiloglucosidasa. Aún más preferentemente, la fuente de amilasa es harina activa de malta.

45 Preferentemente, la fuente de amilasa se añade en una cantidad para obtener en la composición gasificante líquida entre:

- 50 ○ 1 y 16 UD/g de composición gasificante líquida de harina de malta activa, preferentemente entre 2 y 8 UD/g; y/o
- 1 y 30 UAG/g de composición gasificante líquida de amiloglucosidasa, preferentemente entre 3 y 15 UAG/g, aún más preferentemente 3 y 7,5 UAG/g; y/o
- 10 y 80 SKB/g de composición gasificante líquida de alfa-amilasa, preferentemente entre 20 y 40 SKB/g

55 La persona experta comprenderá que combinaciones de diferentes enzimas de diferentes tipos, tales como harina de malta activa y la amiloglucosidasa, harina de malta activa y alfa-amilasa, amiloglucosidasa y alfa-amilasa o harina de malta activa, amiloglucosidasa y alfa-amilasa también son particularmente adecuadas para el fin de la presente invención.

60 Opcionalmente, al final de la etapa de fermentación, se pueden añadir estabilizadores adicionales a la composición gasificante líquida. Se pueden elegir estabilizadores adicionales adecuados entre pectina, alginato, carragenina o carrageninas, agar, goma arábiga, goma tragacanto, goma karaya, goma ghatti, goma guar, goma garrofn, goma tara, goma xantana, goma gellan, goma welan. Un estabilizador adicional particularmente adecuado es la goma xantana.

65 Las composiciones gasificantes líquidas estables, según se pueden obtener mediante los métodos de la presente invención, son mucho más estables que los agentes gasificantes líquidos y las composiciones conocidas en la técnica. El nivel de mejora variará dependiendo del tipo de agente/composición gasificante. Las composiciones gasificantes a

base de levadura son en general más estables que las composiciones gasificantes líquidas que contienen bacterias y levadura del ácido láctico. La estabilidad de una composición gasificante líquida se puede evaluar, por ejemplo, midiendo su potencia gasificante usando uno de los métodos descritos anteriormente (análisis SJA o análisis por risógrafo) a intervalos durante el almacenamiento. Provechosamente, la potencia de gasificación de un gasificante líquido según la presente invención mejora después del almacenamiento a 4 °C durante 21 días en al menos 25 %, en comparación con un agente/composición gasificante líquido conocido en la técnica, sin una fuente de amilasa como agente estabilizante. Preferentemente, la composición gasificante líquida estable de la presente invención tiene una potencia de generación de gas después del almacenamiento comparable a la levadura fresca. Como alternativa, la estabilidad de los agentes/composiciones gasificantes líquidos se puede evaluar realizando pruebas de horneado. Se preparan panes usando un método normalizado con agentes gasificantes líquidos según la presente invención o no, y esto a intervalos regulares durante el almacenamiento de los agentes gasificantes líquidos. Se determinan los volúmenes y/o las alturas de los panes horneados. La estabilidad relativa de los agentes gasificantes líquidos está directamente relacionada con la relación entre los valores medidos.

15 En realizaciones particulares, la composición gasificante líquida según la presente invención mantiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos aproximadamente 60 %, 70 % u 80 % de su actividad gasificante después de 7 o 14 días de almacenamiento.

20 Un aspecto adicional proporciona el uso de los agentes gasificantes líquidos estables o composiciones obtenidas como se enseña en el presente documento, como ingrediente para la preparación de un producto alimentario, preferentemente una masa o un producto horneado, preferentemente un producto de panadería o pastelería. Preferentemente, dicho aspecto adicional proporciona el uso de una composición gasificante que comprende una cepa de levadura y/o bacteria del ácido láctico, un cereal fermentado y/o una fracción de cereal, y una fuente de amilasa, preferentemente harina de malta activa, una amiloglucosidasa y/o una alfa-amilasa, como ingrediente para la preparación de un producto alimentario, preferentemente una masa o un producto horneado, más preferentemente un producto de panadería o pastelería.

30 En realizaciones particulares, el producto horneado es un producto horneado gasificado, en donde el ingrediente principal es harina procedente de granos de cereales. Además, el producto horneado puede contener además grasa o sustituto de grasa, azúcar, huevos, gluten, almidón, hidrocoloides, enzimas, emulsionantes, compuestos oxidantes o reductores, compuestos prebióticos y/o una composición mejoradora.

35 Son ejemplos de productos horneados productos de panadería y productos de pastelería. Son ejemplos de productos de panadería y pastelería pan, panes de estilo rústico, *baguettes*, panecillos (belgas), panecillos blandos, rosquillas, bollos, bollos para microondas, pastas danesas, panes de hamburguesa, pizza y pan de pita, pasteles, gofres, *brioches*, panetones, chapatas y *focaccias*. La preparación de los productos horneados con los agentes o composiciones gasificantes líquidos estabilizados de la invención no requiere ningún ingrediente inusual adicional o etapas de proceso especiales. Se pueden usar ingredientes de productos horneados bien conocidos por el experto en la materia.

40 Normalmente, las composiciones gasificantes líquidas se usan en una dosis entre 2 y 50 % en función del peso de la harina en la masa final (véase, por ejemplo, Marco Gobetti y Michael Gänzle, 2013. Handbook on Sourdough Biotechnology. ISBN: 978-1-4614-5424-3). El experto en la materia sabe cómo ajustar el contenido de agua de la masa para obtener una masa adecuada para hornear. Las preparaciones de masa de múltiples etapas son otros métodos habituales conocidos por el experto en la materia.

Ejemplos

Ejemplo 1: agentes gasificantes líquidos

50 Cepas de levadura: *Kazachstania bulderii* (MUCL54530) y *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería normal).

55 Inóculo: las cepas de levadura se almacenan a -70 °C y se mantienen en medio YPD sólido (peptona 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l; agar 20 g/l). Se inocula una colonia aislada de cada cepa en un primer matraz que contiene 25 ml de medio YPD líquido (peptona 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l) y se mantiene 24 h a 100 rpm y 30 °C. Se inoculan 5 ml de este cultivo en dos matraces que contienen 200 ml de medio líquido (peptona bacteriológica 3,5 g/l; extracto de levadura 3 g/l; KH₂PO₄ 2 g/l; MgSO₄·7 H₂O 1,83 g/l; (NH₄)₂SO₄ 1 g/l; D-glucosa 20 g/l; sacarosa 55 g/l; penicilina 0,0004 g/l; pH = 4,8) y se mantuvo 48 horas a temperatura ambiente con agitación.

60 Los agentes gasificantes líquidos se obtienen después de tres etapas de fermentación sucesivas realizadas en un fermentador de 15 l (C10-3K Biostat C-DCU (Sartorius):

65 1. Primera etapa: se inoculan 10 l de medio G3 estéril (extracto de malta 50 g/l; melaza de remolacha azucarera 60 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,0915 g/l, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g/l, pH = 4,7) con los matraces anteriores de levadura a 10⁷ células/ml de medio de fermentación. La fermentación transcurre durante aproximadamente 15 a 20 horas en modo de cultivo discontinuo con un flujo de aire de 17 l/min a pH 4,7 y a 30 °C. La cantidad de biomasa depende de la

cepa de levadura y de sus rendimientos de crecimiento. La cantidad habitual de biomasa de *Kazachstania bulderi* es entre 4 y 10 g de materia seca/l.

Después de la fermentación, el caldo de fermentación se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm en una centrifuga Avanti™ J-20 (Beckman Coulter) y se lava 2 veces con agua fría. El sedimento (levadura fresca ≈30 % de materia seca) se resuspende en un volumen de agua para obtener una composición de levadura en crema con una materia seca de aproximadamente 20 %.

2. Segunda etapa: se usa levadura en crema de la primera etapa de fermentación (cantidad equivalente a aproximadamente 3,7 a 4,6 g de materia seca de levadura por litro) para inocular la siguiente fermentación. La segunda fermentación transcurre durante aproximadamente 15 horas en modo de cultivo semicontinuo con un flujo de aire de 7,5 l/min, a 30 °C y un pH entre 3,9 y 6 elegido según las características de la cepa de levadura. Durante la fermentación, la fuente de azúcar (hidrolizado de cereal), la fuente de nitrógeno NH₄OH (solución al 6,25 %) y la fuente de fósforo H₃PO₄ (solución al 17,8 %) se suministran progresivamente al biorreactor. Las cantidades de vitaminas y minerales se ajustan según los requisitos de las cepas de levadura. Las soluciones de H₂SO₄ (5 %), de NaOH (29 %) y de antiespumante permiten respectivamente la regulación del pH y la prevención de la formación de espuma. La cantidad de biomasa al final de la fermentación depende del tipo de cepa y de su capacidad de crecimiento. La cantidad normal de biomasa de *Kazachstania bulderi* al final de la segunda etapa es entre 25 y 35 g de materia seca de levadura/l. Al final de la fermentación, las células se recuperan y se lavan como se ha descrito anteriormente.

3. Tercera etapa: se usa levadura en crema de la segunda etapa de fermentación (cantidad equivalente a aproximadamente 8,3 g de materia seca de levadura por litro) para inocular la fermentación final. La fermentación transcurre durante aproximadamente 15 horas en modo de cultivo semicontinuo con un flujo de aire de 7,5 l/min, a 30 °C y un pH entre 3,9 y 6 elegido según las características de la cepa de levadura. Durante la fermentación, la fuente de azúcar (hidrolizado de cereal), la fuente de nitrógeno NH₄OH y la fuente de fósforo H₃PO₄ se suministran progresivamente al biorreactor. Las cantidades de vitaminas y minerales se ajustan según los requisitos de las cepas de levadura. Las soluciones de H₂SO₄ (5 %), de NaOH (29 %) y de antiespumante permiten respectivamente la regulación del pH y la prevención de la formación de espuma. La cantidad de biomasa al final de la fermentación depende del tipo de cepa y de su capacidad de crecimiento. La cantidad habitual de biomasa de *Kazachstania bulderi* es entre 40 y 75 g de materia seca de levadura/l.

Al final de la última fermentación, se añade amiloglucosidasa de *Talaromyces emersonii* (Goldcrust 3300 BG Novozymes) al agente gasificante líquido en una cantidad para tener 7,5 UAG/g y el gasificante líquido se enfría a 4 °C. Parte del agente gasificante líquido no tratado con amiloglucosidasa se mantiene como control. Los agentes gasificantes líquidos se almacenan a 4 °C.

La biomasa de levadura del gasificante líquido se determina de la siguiente manera: se centrifuga una masa o volumen conocido de gasificante líquido durante 15 minutos (Avanti™ J-20, BECKMAN COULTER), a 7000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se descarta. La capa de levadura en la superficie del sedimento se recupera raspando y pesando para determinar la biomasa húmeda. La materia seca se determina colocando la levadura recuperada en un horno a 105 °C durante 24 horas.

La potencia gasificante de las muestras se mide mediante el método SJA a diferentes intervalos durante el almacenamiento. En este método, se preparan masas con: 280 g de harina de trigo (DUO, Ceres, Bélgica), agente gasificante o levadura en una cantidad correspondiente a 2,1 g de materia seca de levadura, 5,04 g de NaCl, agua hasta un nivel de hidratación total de la masa de 35 % (tablas 2 y 3).

Las masas se mezclan durante 6 minutos en un harinógrafo (SCHMERSAL) a 30 °C. Se introducen 300 g de masa en una cámara de fermentógrafo SJA (máquina Mekab, Mekab i Nassjö AB) a 37 °C. Se mide la producción de CO₂ durante dos horas con una etapa de mezcla intermedia después de una hora.

El SJA (expresado en ml de CO₂) se calcula según la siguiente fórmula:

$$SJA \text{ (ml de CO}_2\text{)} = \frac{(v_1 + v_2) \times P_r}{1013}$$

en donde V₁ es el volumen de CO₂ producido después de 1 hora, V₂, el volumen de CO₂ producido durante la segunda hora y P_r, la presión de aire real (mb/hPa).

Tabla 2: Resultados de SJA - *Kazachstania bulderi*

ml de CO ₂	Tiempo (semanas)			
	0	4	6	8
Control	799	575	499	366
Gasificante líquido según la invención	838	629	616	591

Tabla 3: Resultados de SJA - *Saccharomyces cerevisiae*

ml de CO ₂	Tiempo (semanas)			
	0	2	4	6
Control	1311	1142	897	
Gasificante líquido según la invención	1311	1271	1132	1003

El agente gasificante líquido tratado con amiloglucosidasa es mucho más estable que el gasificante sin tratar.

5 Ejemplo 2: Agente gasificante líquido

El agente gasificante líquido se ha preparado según el siguiente proceso. Se prepara una masa líquida mezclando 3612 g de agua, 2800 g de sémola de trigo duro (sémola relaminada de trigo duro Rossa, Industria Molitoria Mininini SRL, Italia), 10⁷ células de una cepa de *Lactobacillus plantarum* y 10⁷ células de una cepa de *Lactobacillus brevis*. La mezcla se incuba a 35 °C en un fermentador C10-3K Biostat C-DCU (Sartorius Stedim GmbH) a 500 rpm. Se agregan 600 g de sémola de trigo duro después de 15 h y después de 24 h de incubación. Después de 39 h, se añaden 76 g de levadura en crema (*Saccharomyces cerevisiae*, 10⁹ células/ml) y la incubación se lleva a cabo a 30 °C. Después de 63 h, la mezcla fermentada se enfría a 4 °C y se añaden 304 g de levadura en crema (= gasificante de control).

15 Se añade harina de malta activa (harina de malta especial, C.Thywissen Malz Muhle GmbH) al gasificante líquido a una concentración de 4 UD/g.

La potencia gasificante de las muestras se evalúa mediante el método de risógrafo a diferentes intervalos durante el almacenamiento. En este método, se preparan masas con: 280 g de harina de trigo (DUO, Ceres, Bélgica), 72,4 ml de agua destilada, 63,2 ml de una solución de NaCl al 8,215 % y 28 g de agente gasificante líquido. Para agentes gasificantes líquidos de control, se añadió una cantidad equivalente de enzima justo antes del análisis (masas de control). Las masas se mezclan durante 6 minutos en un harinógrafo (SCHMERSAL) a 30 °C. Se coloca un trozo de masa de 100 g en un recipiente de muestra de un risógrafo (National Manufacturing; Lincoln, Nebraska, Estados Unidos) y se incuba a 35 °C. El volumen de CO₂ producido por la masa se mide y se compila mediante el software (RisoSmart, National Manufacturing; Lincoln, Nebraska, Estados Unidos) durante 4 h (tabla 4).

20
25

Tabla 4: Resultados de risógrafo

ml de CO ₂ ; dosis de 10 %; tiempo de crecida: 4 h 35 °C	T 0 días	T 7 días	T 14 días	T 21 días
Gasificante de control	433	160	36	20
Gasificante líquido según la invención	422	335	213	169
Gasificante de control con adición de harina de malta (4 UD/g) antes de la preparación de la masa	420	156	33	-

30 Las composiciones gasificantes líquidas según la invención muestran una estabilidad mucho mejor que los gasificantes de control. La adición de la amilasa después del almacenamiento pero antes de hornear no estabilizó la potencia de fermentación.

Las composiciones gasificantes líquidas se usaron para preparar panes de trigo a diferentes intervalos durante el almacenamiento. La composición de las masas de pan se muestra en la tabla 5.

35

Tabla 5: composiciones de masas

Ingrediente (% de panadero))	1	2
Harina de trigo (DUO - Ceres, Bélgica)	100	100
Ingrediente (% de panadero))	1	2
Agua	55	57
Sal	2	2
Mejorador de pan**	1	1
Gasificante líquido de control	20	
Harina de malta	1	
Composición gasificante líquida según la invención		20
** El mejorador es un mejorador de pan normal que contiene como ingredientes principales enzima (endo-xilanas), ácido ascórbico y emulsionantes. No contiene amilasa.		

Los ingredientes se mezclaron durante 2 minutos a baja velocidad y 6 minutos a alta velocidad en un mezclador de masa (Diosna SP24). La temperatura en la panadería fue de aproximadamente 25 °C. La temperatura de la masa fue de aproximadamente 26 °C. Después de una fermentación en masa durante 60 minutos, la masa se dividió en trozos de 600 g y se sometió a una etapa de crecida intermedia de 5 minutos a 25 °C.

Se realizó una última etapa de crecida de las masas individuales, colocadas en moldes, en una sala de fermentación Koma (180 min, 29 °C, 70 % de humedad relativa) antes de hornear a 230 °C durante 35 minutos con vapor en un horno Miwe Condo.

Después de hornear, el volumen de los panes se mide mediante el método de desplazamiento de semillas de colza (tabla 6).

Tabla 6: volúmenes de pan

ml/pan	Tiempo de almacenamiento (semanas)		
	0	2	4
Pan con gasificante líquido de control	2550	1350	1000
Pan con gasificante líquido según la invención	2450	2125	2100

La composición gasificante líquida según la invención es mucho más estable que el control.

Ejemplo 3: gasificante líquido

Se ha preparado gasificante líquido como en el ejemplo 2. Al final de la fermentación, se añadieron las siguientes fuentes de amilasa a partes del gasificante líquido:

- (i). Harina de malta (harina de malta especial, C.Thywissen Malz Muhle GmbH) a una concentración de 2,5, 5 y 10 % p/p que corresponde respectivamente a 2, 4, 8 UD/g.
- (ii). Amiloglucosidasa de *Talaromyces emersonii* (Goldcrust 3300 BG, Novozymes) a una concentración de 0,75, 1,5 y 3 % (p/p), que corresponden respectivamente a 4, 8 y 16 UAG/g.
- (iii). Alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* (Fungamyl Ultra BG, Novozymes) a una concentración de 0,05 y 0,1 % (p/p), que corresponden respectivamente a 21 y 42 SKB/g.

La potencia gasificante de las muestras se evalúa mediante el método de risógrafo como en el ejemplo 2 a diferentes intervalos durante el almacenamiento. La potencia residual de gas es el porcentaje de actividad del risógrafo restante en una muestra después del almacenamiento en comparación con la actividad de la muestra original (tabla 7).

La cantidad de azúcares en las composiciones gasificantes líquidas se ha determinado usando el método oficial AOAC 996.04 ICUMSA usando una cromatografía Dionex HPAE-PAD (Detección de Amperometría Pulsada de Intercambio Aniónico de Alto Rendimiento) con una columna CarboPac PA1. El sistema analítico Dionex está compuesto por un muestreador automático AS 50, una bomba de gradiente GS 50, un generador de eluyente EG40 y un detector electroquímico ED 50 con celda amperométrica y electrodo de trabajo de oro (Dionex Corp). El muestreador automático toma 50 µl de la muestra y los inyecta en el eluyente de NaOH 150 mM a un caudal de 1 ml/min.

La cantidad de azúcares se define como la suma de glucosa, fructosa y maltosa presentes en el gasificante líquido (tabla 7).

Tabla 7

Tiempo de almacenamiento (días)	0	7	14	1
	potencia de gas residual (%)			azúcares (% p/p)
control (sin amilasa)	100	37	8	0,15
harina de malta 2 UD/g	100	52	31	0,32
harina de malta 4 UD/g	100	80	57	
harina de malta 8 UD/g	100	69	63	1,13
amiloglucosidasa 4 UAG/g	100	73	61	1,19
amiloglucosidasa 8 UAG/g	100	85	58	
amiloglucosidasa 16 UAG/g	100	76	50	1,43
alfa-amilasa 21 SKB/g	100	67	30	0,46
alfa-amilasa 42 SKB/g	100	44	29	0,19

ES 2 807 443 T3

Esto muestra claramente que se pueden obtener composiciones gasificantes líquidas estables cuando se añade una fuente de amilasa, incluso a niveles de azúcar fermentables superiores a 0,5 % en peso.

REIVINDICACIONES

1. Un método para estabilizar una composición gasificante líquida activa que comprende células de levadura activas y opcionalmente células de bacterias del ácido láctico, en donde dicho método comprende las etapas de
- 5 (i) mezclar un sustrato de fermentación, que comprende un cereal, una fracción de cereal y/o un hidrolizado de cereal, con agua para obtener una mezcla de fermentación;
- (ii) añadir a la mezcla de fermentación una o más cepas de levadura y opcionalmente una o más cepas de bacterias del ácido láctico; y
- 10 (iii) fermentar la mezcla de fermentación para obtener una composición gasificante líquida; antes de (iv) la adición de una fuente de amilasa a dicha composición gasificante líquida;
- en donde la cantidad restante de azúcar fermentable de la composición gasificante líquida es al menos 0,5 % en peso.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde la fuente de amilasa es una alfa-amilasa, una amiloglucosidasa o harina de malta activa o cualquier combinación de las mismas.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la fuente de amilasa es:
- 20 - una alfa-amilasa en una concentración entre 10 y 80 SKB/g de agente gasificante líquido; y/o
- una amiloglucosidasa en una concentración entre 1 y 30 UAG/g de agente gasificante líquido; y/o
- harina de malta activa en una concentración entre 1 y 16 UD/g de agente gasificante líquido.
4. El método según la reivindicación 2 o 3, en donde la fuente de amilasa es una amiloglucosidasa y/o harina de malta activa.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente gasificante líquido comprende al menos una cepa de *Saccharomyces* o *Kazachstania*.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, en donde dicha cepa de levadura comprende al menos una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Kazachstania bulderi*.
7. El método según la reivindicación 6, en donde dicha cepa de levadura comprende la cepa de *Kazachstania bulderi* MUCL54530.
- 35 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición gasificante líquida comprende una cantidad de células de levadura entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente $5 \cdot 10^9$ ufc/ml y, opcionalmente, una cantidad de bacterias del ácido láctico entre 0 y $1 \cdot 10^9$ ufc/ml.
- 40 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición gasificante líquida tiene un pH entre aproximadamente 3,4 y aproximadamente 6.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el sustrato de fermentación comprende además una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, vitaminas y/o minerales.
- 45 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende además la etapa de (v) añadir una o más cepas de levadura y/o bacterias del ácido láctico adicionales.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende además la etapa de (vi) añadir agentes estabilizantes adicionales a la composición gasificante líquida obtenida, en donde los estabilizadores adicionales elegidos son pectina, alginato, carragenina o carrageninas, agar, goma arábiga, goma tragacanto, goma karaya, goma ghatti, goma guar, goma garrofin, goma tara, goma xantana, goma gellan y/o goma welan.
- 50 13. Un método para preparar un producto horneado que comprende las etapas de (a) preparar una composición gasificante líquida estable mediante las etapas de
- 55 (i) mezclar un sustrato de fermentación, que comprende un cereal, una fracción de cereal y/o un hidrolizado de cereal, con agua para obtener una mezcla de fermentación;
- (ii) añadir a la mezcla de fermentación una o más cepas de levadura y opcionalmente una o más cepas de bacterias del ácido láctico; y
- 60 (iii) fermentar la mezcla de fermentación para obtener una composición gasificante líquida; antes de (iv) la adición de una fuente de amilasa a dicha composición gasificante líquida;
- en donde la cantidad restante de azúcar fermentable de la composición gasificante líquida es al menos 0,5 % en peso; y en donde la composición gasificante líquida comprende una cantidad de células de levadura entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente $5 \cdot 10^9$ ufc/ml; y
- 65

(b) añadir la composición gasificante líquida estable obtenida a la receta de dicho producto horneado.