



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 242 504**

② Número de solicitud: 200302033

⑤ Int. Cl.7: **A21D 2/26**

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **28.05.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.11.2005**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá** (Titular al 50 %)  
**Plaza de San Diego, s/n**  
**28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**  
**Emilio Esteban, S.A.** (Titular al 50 %)

⑦ Inventor/es: **Copa Patiño, José Luis;**  
**Soliveri de Carranza, Juan y**  
**Caballero Barrigón, Antonio**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en el proceso de panificación de masas de harinas de trigo.**

⑤ Resumen:

Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en el proceso de panificación de masas de harinas de trigo.

El objetivo de la presente invención es el uso de un complejo rico en feruíl esterasa como adyuvante tecnológico en el proceso de panificación de masas de harinas de trigo. Este complejo permite obtener masas en las que la tenacidad (P) disminuye y la extensibilidad (L) aumenta, obteniéndose relaciones P/L correspondientes a masas con una extensibilidad óptima y sin embargo no se aprecia una disminución en la fuerza o consistencia de la misma. En pruebas industriales el uso de este complejo modifica la maquinabilidad de la masa, resultando ésta menos viscosa y más fluida, optimizándose de esta manera la fase de amasado. En la cocción de la masa se aumenta el volumen de las piezas de pan. El producto final de panificación presenta una corteza lisa, crujiente y dorada, de miga con alveolado uniforme y mostrando un buen comportamiento durante el proceso de conservación.

ES 2 242 504 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en el proceso de panificación de masas de harinas de trigo.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se encuadra en los procesos de panificación, dentro del sector de las industrias de alimentación.

10 **Estado de la técnica**

El almidón y las proteínas son los componentes mayoritarios de la harina de trigo, sin embargo, hay otros constituyentes en menor proporción, como por ejemplo los arabinoxilanos (AX) (hemicelulosas) (Courtin y Delcour, 2002), que también participan muy directamente en las propiedades viscoelásticas (reológicas) de las masas producidas a partir de dicha harina (Gruppen y col., 1989). Los arabinoxilanos se caracterizan por poseer siempre un esqueleto principal de unidades de D-xilosapiranosas unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 al cual se unen distintos sustituyentes, tales como L-arabinosa, D-galactosa, grupos acetilo y residuos de ácidos glucurónico, ferúlico y *p*-cumárico (Wilkie, 1979). Una representación esquemática del xilano y de los diferentes residuos que pueden unirse a su esqueleto principal se muestra en la figura 1. La causa de la gran variabilidad que pueden presentar los xilanos se debe a la presencia de los distintos residuos ya mencionados, además, la presencia de estos sustituyentes determina la solubilidad, viscosidad y otras propiedades físico-químicas de los xilanos (de Vries, 1999).

Los arabinoxilanos presentes en la harina de trigo juegan un papel muy importante en la formación de la masa, como ya se ha mencionado, debido principalmente a su capacidad para unirse con el agua, influyendo por tanto en la calidad final del pan. El grado de ramificación y el número de grupos polares hidroxilo (grupos -OH) influyen en su solubilidad y capacidad de absorción de agua, formando disoluciones viscosas (gelificación), siendo ésta la propiedad más importante desde el punto de vista tecnológico en los procesos de panificación.

En la harina de trigo, el ácido ferúlico [3-(3-metoxi-4-hidroxy fenil)-2-propenoico] (Figura 2) (AF), aunque se puede encontrar libre en pequeñas cantidades, lo normal es que aparezca unido por enlaces éster con los AX, detectándose del orden de 0,3 a 0,5  $\mu$ mol/g de harina. El papel del AF en la obtención de masas es muy importante, ya que interviene en la unión de los AX con otras moléculas de AX, mediante la formación de diferulatos (Smith y Hartley, 1983) (Figura 3), y también interrelaciona las moléculas de AX con la tirosina del gluten de trigo (Hoseney y Faubion, 1981). Estas uniones están catalizadas por peroxidasas y en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En el caso de la unión con el gluten, ésta tiene lugar mediante un mecanismo de acoplamiento oxidativo de los restos hidroxilo del grupo fenol de la tirosina y del ácido ferúlico, a través de radicales fenoxi, formándose dímeros y originando un complejo macromolecular proteína-AX de gran interés funcional para el amasado, y en general para todo el proceso de panificación.

El ácido ferúlico tiene dos formas isoméricas, la forma *cis* y la *trans*, encontrándose presente en los vegetales, fundamentalmente en las paredes celulares, unido a diversos polisacáridos (arabinoxilanos) y proteínas, tal como ya se mencionó anteriormente. Algunos autores sugieren que también puede estar interrelacionando las hemicelulosas con la lignina (Ralph y col., 1997). Biológicamente, el ácido ferúlico juega un importante papel en la biosíntesis de la lignina, ya que es un intermediario en su ruta de síntesis (ruta del ácido siquímico) (Figura 4).

Está demostrado que el ácido ferúlico y los diferulatos de este ácido tienen una notable capacidad antioxidante (García-Conesa y col., 1999). Esta capacidad resulta de gran interés para las industrias de alimentación, cosmética y farmacéutica (Baublis y col., 2000). También, y debido a la conjugación de todos sus dobles enlaces, presenta una gran absorción de luz ultravioleta (284 nm), lo que hace que pueda ser utilizado como protector frente a la misma, y por lo tanto tiene un gran interés para las industrias farmacéutica, textil (Graf, 1992) y cosmética (Saija y col., 1999). Por otro lado, se está desarrollando un proceso biotecnológico que, de forma sencilla y no contaminante, produce vainillina a partir del ácido ferúlico (Bonin y col., 1999). En definitiva, se trata de una molécula con importantes funciones biológicas y con interesantes aplicaciones industriales.

Por todo lo anteriormente expuesto existe un gran interés por el AF y su obtención a partir de residuos vegetales. Para ello, y desde finales de los 80, se conoce una enzima, la feruíl esterasa (E.C. 3.1.1.73) (FAE), que es capaz de liberar el AF a partir de AX y otros compuestos vegetales. Está descrito que esta enzima puede ser producida por diferentes microorganismos, como por ejemplo bacterias (García y col. 1998) y hongos (Faulds y Williamson, 1993). Se ha detectado que esta enzima, en presencia de xilanasas, incrementa la capacidad de liberar AF. Es decir, actuaría de manera sinérgica con las xilanasas para aumentar la degradación microbiana de las paredes celulares vegetales. Este efecto es debido a que en primer lugar actuarían las xilanasas, produciendo fragmentos cortos de AX con AF unido, posteriormente, la actividad FAE liberaría dicho AF. Se ha visto que, además, la actividad FAE presenta mayor afinidad por fragmentos cortos que por las moléculas enteras de AX. Se ha descrito asimismo que la actividad FAE ayuda a las xilanasas a degradar los compuestos de la pared celular, ya que al hidrolizar el enlace éster entre el ácido ferúlico y los arabinoxilanos se obtienen cadenas de AX que presentan una mayor accesibilidad para ser atacadas por las xilanasas. Es decir, el sinergismo entre xilanasas y FAE es recíproco, no sólo se incrementa la liberación de ácido ferúlico al estar presente la xilanasas, sino que esta última también ve aumentada su actividad por la presencia de FAE

(Bartolomé y col., 1995). Se ha descrito sinergismo de FAE, no sólo con xilanasas, sino también con pectinasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas (Tenkanen y col., 1991) y  $\beta$ -xilosidasas (Borneman y col., 1991).

5 Durante el amasado y la fermentación de la masa panaria el papel de las enzimas es tremendamente importante, ya que condicionan la calidad y conservación del pan. Estas enzimas proceden tanto de la propia harina como de los aditivos enzimáticos añadidos, así como de la levadura que se va a utilizar en el proceso de panificación, y van a estar actuando sobre los distintos polisacáridos, lípidos y proteínas de la harina durante el proceso de amasado y fermentación hasta su desnaturalización en el horno. De entre todas las enzimas, las amilasas siempre han sido consideradas como las más importantes en el proceso de panificación, sin embargo, no se debe menospreciar la acción de otro tipo de enzimas como proteanas, lipasas, glucanasas, xilanasas, esterases, glucooxidases, peroxidases, etc. cuya acción determina que el producto final tenga características diferentes. Actualmente, las industrias panificadoras utilizan diversos aditivos y coadyuvantes tecnológicos autorizados para aumentar las propiedades panificables de las harinas, tales como complementos panarios, reguladores del pH, emulgentes, enzimas etc. Las enzimas se emplean para mejorar las propiedades reológicas y fermentativas de las masas. La legislación española (R.D. 285 /1999, de 22 de febrero) regula la utilización de enzimas en panes especiales, en el apartado de coadyuvantes tecnológicos y en cantidad suficiente para obtener el efecto deseado. Las enzimas autorizadas hasta la fecha son: amilasas, proteasas, pentosanases (xilanasas) y glucooxidases. En general, las enzimas se utilizan para optimizar las características reológicas y enzimáticas “*per se*” de las masas.

## 20 Explicación de la invención

Las cualidades plásticas de la harina y la fuerza de la misma se determinan con un alveógrafo de Chopin, que suministra una curva llamada alveograma. Dicha curva tiene dimensiones variables, de acuerdo con las características de la harina ensayada. La *tenacidad* (*P*) es la altura de la curva media en milímetros. Indica la resistencia que la masa opone a la rotura. Es mayor cuanto más consistencia posea la masa. La *extensibilidad* (*L*) es la longitud del alveograma, también medida en milímetros. Refleja la mayor o menor capacidad que en cada caso posee la masa para ser estirada. Los valores de estos dos parámetros: tenacidad (*P*), y extensibilidad (*L*), tienen cierta importancia. Pero lo que tiene una importancia verdaderamente capital es el cociente de dividir ambas magnitudes, al que se llama *equilibrio de la masa* (*P/L*). Efectivamente éste es un valor que diferencia y caracteriza profundamente las harinas, reflejando para qué tipo de trabajo panadero es adecuada cada una. El valor *W* da idea del trabajo de deformación de la masa al ser ensayada en el alveógrafo. Este valor *W* es directamente proporcional a la *fuerza* (capacidad de una harina para producir una pieza de pan bien crecida y de gran volumen) de la harina en cuestión. Se mide en Julios. La fuerza que tenga una harina condiciona la utilización que se haga de la misma.

35 Los resultados obtenidos muestran que el uso de nuestro complejo enzimático con actividad feruíl esterasa permite obtener masas en las que la *P* disminuye y la *L* aumenta, obteniéndose relaciones *P/L* óptimas y equilibradas para diferentes procesos de panificación y bollería, no apreciándose disminución en la fuerza (*W*) o consistencia de la masa. Estos resultados son muy sorprendentes, ya que lo normal es que utilizando las enzimas hidrolasas disponibles actualmente en el mercado disminuya la capacidad de absorción de agua y la *W*, con pérdida de la consistencia y aumento del debilitamiento de la masa. El uso de nuestro complejo no modifica la capacidad de absorción de agua por la masa, algo que es muy apreciado en las industrias de panificación. En el proceso de panificación se desea optimizar el amasado pero sin disminuir la cantidad de agua añadida, ya que eso significaría una pérdida de la rentabilidad del mismo. al disminuir la cantidad de masa obtenida, por lo tanto no aceptable para dichas industrias.

45 Las anteriores afirmaciones se basan en los datos que se han obtenido utilizando la actividad FAE en harinas y estudiando el comportamiento de la misma durante el amasado. Se han utilizado pruebas alveográficas y consistográficas.

Los resultados alveográficos obtenidos con una masa de harina de gran fuerza ( $W= 351 \text{ J } 10^{-4}$ ), que se deja reposar 28 minutos, y a la que se le adicionan dosis crecientes de FAE, se muestran en la tabla 1. Tal como se observa en la tabla, a medida que aumenta la cantidad de FAE añadida en la masa, ésta se hace más extensible (*L*), comenzando a aumentar significativamente ( $\alpha= 0.05$ ) a partir de la adición del 0,14% de FAE. En cuanto a la tenacidad (*P*), ésta disminuye significativamente de 102 a 88 milímetros (mm) con dosis del 0,16% de FAE, pero con niveles menores no se observan cambios significativos en la misma. A pesar del aumento de “*L*” y de la disminución de “*P*”. los valores de “*W*”, en relación al control, y en todo el rango de dosis de FAE, no experimentaron cambios significativos (Figura 5). Los resultados obtenidos cuando la masa se deja reposar 120 minutos y se realizan de nuevo los ensayos, siguieron la misma tendencia (Tabla 1).

60

65

# ES 2 242 504 A1

TABLA 1

Resultados alveográficos. Ensayos alveográficos de masas a las que se les añade porcentajes diferentes del complejo enzimático conteniendo la enzima feruñl esterasa (FAE)

%	Reposo de la masa 28 min				Reposo de la masa 120 min			
	P	L	W	P/L	P	L	W	P/L
FAE	(mm)	(mm)	(10 <sup>-4</sup> J)		(mm)	(mm)	(10 <sup>-4</sup> J)	
0,00	102	100	351	1.02	81	123	334	0.66
0,02	101	101	349	1.00	83	122	329	0.69
0,04	106	88	333	1.20	85	115	324	0.66
0,08	100	110	364	0.91	79	132	325	0.60
0,12	95	113	351	0.84	74	136	309	0.55
0,14	94	126	374	0.75	71	140	309	0.51
0,16	88	133	359	0.66	68	149	307	0.46
0,20	81	130	320	0.62	63	145	268	0.44

% FAE: porcentaje del complejo enzimático presente en las masas. Las unidades de FAE en dicho complejo son de 1,8 Unidades/gramo de complejo. Una unidad enzimática la definimos como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de producto por minuto a partir del sustrato utilizado en las condiciones de reacción.

P: Es la tenacidad de la masa. Se mide en milímetros (mm) y se determina mediante un alveógrafo.

L: Es la extensibilidad de la masa. Se mide en milímetros (mm) y se determina mediante un alveógrafo.

W: Es la fuerza de la masa. Se determina a partir del área de la curva alveográfica y se mide en Julios (J. 10<sup>-4</sup>).

P/L: Es el equilibrio de la masa.

Se ha realizado el mismo estudio con harinas más débiles (W= 120 J. 10<sup>-4</sup>) obteniéndose los mismos resultados. es decir disminución de "P". aumento de "L" y no detectándose cambios significativos en la "W" de la masa (datos no mostrados).

Debido a que está descrito el efecto sinérgico de xilanasas con la actividad FAE se han realizado ensayos alveográficos de obtención de masas en los que se han mezclado nuestro complejo enzimático con actividad FAE y una xilanasas comercial que se usa rutinariamente en procesos de panificación. Se utilizaron en una proporción de 0,16% para nuestro complejo. y de 0,016% y 0,035% del complejo comercial con actividad xilanasas en las masas. Nuestro complejo, en este ensayo, tiene 1,8 Unidades de FAE/gramo de complejo enzimático, mientras que la xilanasas comercial utilizada tiene 2500 Unidades xilanasas/gramo de complejo enzimático. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Cuando añadimos sólo la actividad FAE, de nuevo se repiten los resultados explicados anteriormente, es decir disminución de "P", aumento de "L", sin alterar el "W" de la masa. El uso solamente de actividad xilanasas (XIL) producía una disminución de "P", un aumento de "L", pero en este caso sí se observaba una ligera disminución de la "W". que era más patente después de un reposo de 120 minutos de la masa. Cuando se emplean ambas actividades juntas se observa que de nuevo disminuye la "P" y aumenta la "L", disminuyendo notablemente la "W" (un 36% a los 28 minutos y un 44% después de un reposo de 2 horas con respecto al control sin actividad enzimática añadida). Comparando la acción combinada de ambas enzimas sobre la masa con respecto a la que se obtiene cuando se añade solamente la actividad xilanasas al doble de concentración (0,035%), se observa que los efectos son mayores al combinarlas. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito en la bibliografía sobre la acción sinérgica de ambas actividades. Nuestros resultados sugieren que las xilanasas dividen la cadena de arabinoxilanos en fragmentos más pequeños sobre los que actúa la FAE con más efectividad, al haber menos impedimentos estéricos para su acción. En cualquier caso, nuestro complejo por sí solo demuestra tener unos efectos más interesantes que el uso de las xilanasas

## ES 2 242 504 A1

comerciales, ya que, aunque ambos complejos disminuyen la “P” y aumentan la “L”, nuestro complejo no conlleva una disminución de la “W” ni de la capacidad de absorción de agua. al contrario de lo que se observa con las xilanasas comerciales que sí la producen.

5

TABLA 2

*Resultados alveográficos. Efecto de la utilización de complejos enzimáticos con actividad FAE y actividad xilanasas sobre las propiedades alveográficas de la masa*

10

% Actividad Enzimática	Reposo de la masa 28 min				Reposo de la masa 120 min			
	P (mm)	L (mm)	W (10 <sup>-4</sup> J)	P/L	P (mm)	L (mm)	W (10 <sup>-4</sup> J)	P/L
control	102	100	351	1.02	81	123	334	0.66
0,16 FAE	88	133	359	0.66	68	149	307	0.46
0,16 FAE+0,016 XIL	51	120	223	0.43	37	141	187	0.27
0,035 XIL	60	144	327	0.42	43	152	260	0.29

15

20

25

30

% Actividad Enzimática: porcentaje del complejo enzimático presente en las masas. Las unidades de FAE en dicho complejo son de 1.8 Unidades/gramo de complejo, mientras que las de xilanasas comerciales fueron de 2500 Unidades/gramo de complejo enzimático. Una unidad enzimática la definimos como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de producto por minuto a partir del sustrato utilizado en las condiciones de reacción.

35

Los resultados anteriores se realizan en masas con un reposo de 28 minutos y 2 horas. Sin embargo, también es muy interesante conocer el comportamiento de la masa durante el amasado a tiempo real con la actividad enzimática FAE presente. Para ello se utilizó el consistógrafo de Chopin. En este ensayo se han utilizado dos concentraciones diferentes de actividad enzimática FAE (1,8 y 5,2 Unidades/gramos de complejo enzimático). También se ha realizado el ensayo mezclando la actividad enzimática FAE y la actividad enzimática xilanasas de origen comercial. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3 y 4.

40

TABLA 3

*Resultados consistográficos. Datos sobre el comportamiento de la masa durante el amasado a tiempo real, a la que se le añade la actividad enzimática FAE, y obtenidos con el consistógrafo de Chopin*

45

% Actividad enzimática	Lote	Pr Max (mb)	WA (%)	TPrMax (s)	Tol (s)	D250 (mb)	D450 (mb)
0,00	0	3576	59,8	152	270	191	782
0,16	1	3341	58,8	187	276	75	807
0,16	2	3666	60,2	172	238	165	815

50

55

60

% Actividad Enzimática: porcentaje del complejo enzimático presente en las masas. Las unidades de FAE en dicho complejo son de 1.8 Unidades/gramo de complejo para el lote 1, y de 5,2 para el lote 2. Una unidad enzimática la definimos como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de producto por minuto a partir del sustrato utilizado en las condiciones de reacción.

65

PrMax: Es la presión máxima de la masa. Se mide en milibares (mb).

WA: Es la capacidad de absorción de agua de la harina. Se dan los valores en porcentaje.

## ES 2 242 504 A1

TPrMax: Es el tiempo que tarda la masa en alcanzar la presión máxima. Se dan los valores en segundos (s).

Tol: Es la tolerancia de la masa. Los valores se dan en segundos (s).

5 D250 y D450: Es el debilitamiento de la masa a los 250 y 450 segundos, respectivamente. Se dan los valores en milibares (mb).

TABLA 4

10 *Resultados consistográficos. Datos sobre el comportamiento de la masa durante el amasado a tiempo real, a la que se le añade la actividad enzimática FAE junto con la actividad xilanasa comercial. Los datos se han obtenido utilizando el consistógrafo de Chopin*

15

% Actividad enzimática	Pr Max (mb)	WA (%)	TPrMax (s)	Tol (s)	D250 (mb)	D450 (mb)
control	3576	59,8	152	270	191	782
0,16 FAE	3341	58,8	187	276	75	807
0,16 FAE+0,016 XIL	2932	56,3	132	218	336	1080

25

30 % Actividad Enzimática: porcentaje del complejo enzimático presente en las masas. Las unidades de FAE en dicho complejo son de 1.8 Unidades/gramo de complejo. mientras que las de xilanasa comercial fueron de 2500 Unidades/gramo de complejo enzimático. Una unidad enzimática la definimos como la cantidad de enzima necesaria para liberar  $1 \mu\text{mol}$  de producto por minuto a partir del sustrato utilizado en las condiciones de reacción.

35 Como se observa en la tabla 3, el uso de lotes con distinta cantidad de actividad enzimática FAE no parece alterar características importantes durante el amasado a tiempo real de la harina. Como ya hemos visto anteriormente, el uso de FAE optimiza las propiedades reológicas de la masa, ya que disminuye la "P", aumenta la "L" y no varía la "W". Con las pruebas del consistógrafo de Chopin. además se constata que parámetros tan importantes como son la capacidad de absorción de agua (WA) o los debilitamientos de la masa a 250 (D250) y 450 segundos (D450) no varían significativamente, siendo todo ello de gran interés para las industrias de panificación. Cuando se utilizan conjuntamente nuestro complejo con actividad FAE y un complejo comercial con actividad xilanasa (XIL) se observan cambios en los datos consistográfico, debido a la acción sinérgica de ambas enzimas, que no son aceptables en procesos de panificación (Tabla 4). Los cambios más importantes se producen en el debilitamiento de la masa: D250 y D450 que aumentan, lo que indica que la masa se debilita. y en el WA que disminuye (del 59,8% del control al 56,3% de la harina dosificada con FAE y XIL). lo que indica que la masa pierde capacidad de absorción de agua. Los datos muestran claramente que los dos complejos actúan conjuntamente sobre los componentes de la harina, obteniéndose una masa que no sería óptima para panificación. Nuestro complejo por sí solo hace que se produzca un amasado óptimo al variar las características reológicas de la masa, sin que disminuya la capacidad de la masa de absorber agua.

50 Se han realizado pruebas industriales de procesos de panificación con nuestro complejo enzimático. comparando el efecto de dicho complejo con el de otras enzimas comerciales. Los resultados obtenidos demuestran que la utilización de FAE añadida a la harina durante el amasado modifica la maquinabilidad de la masa, resultando ésta menos viscosa y más fluida, aumentando por este motivo su extensibilidad y sin pérdida apreciable de la fuerza (W). como ya habíamos comprobado en el laboratorio. En definitiva, se logra optimizar la fase de amasado, que es la etapa crítica en cualquier proceso de panificación, obteniéndose una masa firme y nada pegajosa. A la salida de la formadora de barras, las que estaban dosificadas con la actividad enzimática FAE permanecieron con su forma inicial, sin mostrar la masa indicios de relajación, presentando muy buena tolerancia durante la fermentación. En la cocción aumentó el volumen de todas las piezas, mostrando un buen greñado. El producto final presentó una corteza lisa, crujiente y dorada, y una miga de alveolado uniforme. Además, la barra de pan presentó un comportamiento mejor que el obtenido cuando se utilizan enzimas comerciales. ya que nuestro complejo enzimático con actividad ferufl esterasa ralentizaba el endurecimiento del pan.

60 De los resultados obtenidos en el laboratorio y en las pruebas industriales se deduce que nuestro complejo enzimático con actividad ferufl esterasa puede utilizarse para optimizar diversos procesos de panificación, automáticos y semiautomáticos, obteniéndose una buena calidad del producto terminado y con un tiempo de conservación mejorado.

### 65 Descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática del arabinoxilano.

## ES 2 242 504 A1

Figura 2. Representación del ácido ferúlico (3-(3-metoxi-4-hidroxy fenil)-2-propenoico).

Figura 3. Representación esquemática de la interrelación de dos cadenas de arabinoxilano. Dentro del cuadro punteado, se muestra el diferulato que permite la interrelación de dichas moléculas de arabinoxilano.

Figura 4. Ruta del ácido siquímico. Se muestran en el recuadro punteado, los precursores de la lignina. El ácido ferúlico participa en la producción del alcohol coniferílico y del alcohol sinapínico. este último a través del ácido sinápico.

Figura 5. Efecto de distintas cantidades de la actividad FAE presente en la masa sobre la fuerza de la misma (W).

### Modo de realización

#### *Características de las harinas empleadas en los ensayos*

Las harinas empleadas en los ensayos reológicos y en las pruebas industriales de panificación contenían: 13,91% de proteínas, 11,02% de gluten seco, 0,61% de cenizas, 2,90 de índice de maltosa. La masa obtenida tenía una fuerza  $W = 351 \cdot 10^{-4}$  J, y a las dos horas de reposo  $W_{2h} = 334 \cdot 10^{-4}$  J. La capacidad de absorción de agua por la masa era del 60%.

#### *Complejos enzimáticos utilizados*

Nuestro complejo enzimático con actividad ferúlica esterasa (FAE) se obtuvo en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá. La producción se realiza a partir de caldos de cultivo con salvado de trigo como fuente de carbono y utilizando una cepa de *Streptomyces thermocarboxydus*, perteneciente a la colección del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá. Los cultivos se incuban en agitación a 37°C durante dos días. Al final del período de incubación los caldos de cultivo se centrifugan y filtran a través de filtros con un poro de 0,45 micras, y el caldo obtenido se liofiliza. Una vez liofilizado, se valora la actividad FAE mediante HPLC. utilizando metil-ferúlico como sustrato y las proteínas presentes.

En los ensayos se utilizaron dos lotes diferentes. Uno tenía una actividad de 1,8 Unidades por gramos de complejo enzimático y el otro 5,2 Unidades por gramo de complejo enzimático.

La xilanasa utilizada en los ensayos procedía de cultivos de cepas *Aspergillus oryzae* modificadas genéticamente, conteniendo un gen de xilanasa procedente de *Thermomyces lanuginosus*, y comercializada por APLIENA S.A. (PentopanNovo® endo 1,4-D-xylanase JUB: 3.2.1.8, CAS: 9025-57-4, EINECS: 232-800-2). Su actividad enzimática era de 2500 Unidades por gramo de complejo comercial (ver definición de unidad en el párrafo anterior).

#### *Ensayos reológicos*

Se desarrollaron en el laboratorio de la fábrica de harinas “Emilio Esteban S.A.” (Valladolid).

Se usó el alveo-consistógrafo de Chopin (modelo NG), siguiendo para los ensayos alveográficos el método de la AACC (American Association of Cereal Chemist) nº 5430-A 1194, y para las pruebas consistográficas el método nº 54-50 de la AACC. Se valoraron:

- La tenacidad de la masa en milímetros (P).
- La extensibilidad de la masa en milímetros (L).
- El equilibrio de la masa (P/L).
- La fuerza de la masa a los 8 minutos y a las 2 horas de reposo en  $10^{-4}$  J (W y W 2h).
- La presión máxima en milibares (mb) (PrMax).
- El % de absorción de agua (WA) durante el amasado para una hidratación equivalente a 1.700 mb (base 15% de humedad), y comparable a 500 unidades medidas en el farinógrafo de Brabender.
- El tiempo para la formación de la masa en segundos (TprMax).
- La tolerancia al amasado en segundos (s) (Tol).
- El debilitamiento de la masa a los 250 y 450 segundos (D250, D450, respectivamente).

Se siguió el protocolo Chopin, que mantiene una consistencia objetiva fijada en 2.200 milibares.

Todos los resultados de este estudio fueron la media aritmética de cuatro repeticiones del ensayo en las mismas condiciones analíticas.

#### Pruebas industriales

Se realizaron en el Centro Tecnológico de Cereales de Castilla y León (Palencia). El proceso de elaboración fue directo, sin masa madre. Se amasó la mezcla durante 13 minutos en una amasadora de brazos. La temperatura final de la masa fue de 23°C. Se bolearon a mano piezas de 350 gramos y se colocaron sobre unas telas de algodón. Después de un reposo de 15 minutos las masas se introdujeron en la formadora. A continuación se fermentaron las masas durante 80 minutos a 29°C y 78% de humedad. Por último, las piezas fermentadas se pasaron a un horno eléctrico. La temperatura de cocción fue de 210°C, durante 30 minutos, inyectándose vapor al iniciarse la cocción.

Se realizaron varias pruebas comparativas con harinas sin dosificar y dosificadas con ferufl esterasa y xilanasas.

#### Aplicación industrial

La presente invención tiene su aplicación en los procesos de panificación de masas de harinas de cereales, dotando tanto a la masa como al producto final de las características explicadas.

#### Bibliografía citada

**Bartolomé B, Faulds CB, Tuohy M, Hazlewood GP, Gilbert HJ and Williamson G (1995).** Influence of different xylanases on the activity of ferulic acid esterase on wheat brand. *Biotechnology und Applied Biochemistry* 22:65-73.

**Baublis A, Decker EA and Clydesdale FM (2000).** Antioxidant effects of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. *Food Chemistry*. 68:1-6.

**Bonnin E, Lesage-Meessen L, Asther M and Thibault J-F (1999).** Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of "natural" cellobiose. *Journal of The Science Food and Agriculture* 79(3):484-486.

**Borneman WS, Ljungdahl LG, Hartley RD and Akin DE (1991).** Isolation and Characterization of *p*-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8):2337-2344.

**Courtin CM and Delcour JA (2002).** Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science* 35:225-243.

**Faulds CB and Williamson G (1993).** Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17:49-359.

**García BL, Ball AS, Rodríguez J, Perez-Leblic MI, Arias ME and Copa-Patiño JL (1998).** Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. *FEMS Microbiology Letters* 158:95-99.

**García-Conesa MT, Wilson PD, Plumb GW, Ralph J and Williamson G (1999).** Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- $\beta$ - $\beta'$ -bicycinnamic acid (8-8-diferulic acid, non cyclic form) (Antioxidant properties of 8-8-diferulic acid). *Journal of The Science Food and Agriculture* 79(3):379-384.

**Graf E (1992).** Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 13:435-448.

**Gruppen H, Marseille JP, Voragen AGJ, Hamer RJ and Pilnik W (1989).** Mild isolation of water-insoluble cell-wall material from wheat-flour: Composition of fractions obtained with emphasis on non-starch polysaccharides. *Journal of Cereal Science* 9:247-260.

**Hoseney R and Faubion JM (1981).** Mechanism of the oxidative gelation of wheat flour water-soluble pentosans. *Cereal Chemistry* 58:421-424.

**Ralph J, Hatfield R and Grabber JH (1997).** Ferulates and diferulates as nucleation sites for lignification in grasses. *Polyphenols actualités* 17:4-6.

**Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Trombetta D, Proteggente A, De Pasquale A, Uccella N and Bonina F (1999).** Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *Journal of The Science Food and Agriculture* 79(3):476-480.

**Smith MM and Hartley RD (1983).** Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharide in graminaceous plants. *Carbohydrate Research* 118:65-80.

## ES 2 242 504 A1

**Tenkanen M. Schuseil J, Puls J and Poutanen K (1991).** Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. *Journal of Biotechnology* 18:69-84.

5 **Vries RP de. (1999).** Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Thesis Landbouwniversiteit Wageningen ISBN 90-5808-108-7. Chapter 1. pp. 1-49.

**Wilkie KCB (1979).** The hemicelluloses of grasses and cereals. *Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry* 36:215-264.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 242 504 A1

## REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un complejo enzimático como coadyuvante tecnológico en los procesos de obtención de masas de harinas de trigo, **caracterizado** porque dicho complejo enzimático es rico en actividad feruíl esterasa.

10 2. Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en los procesos de obtención de masas de harinas de trigo, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el coadyuvante tecnológico está producido por una cepa seleccionada de *Streptomyces*.

15 3. Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en los procesos de obtención de masas de harinas de trigo, según las reivindicaciones 1 y 2, que consiste en la utilización del coadyuvante tecnológico en combinación con otros ingredientes y aditivos enzimáticos autorizados en sus múltiples combinaciones.

20 4. Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en los procesos de obtención de masas de harinas de trigo, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado** porque puede ser utilizado en harinas de trigo de gran fuerza.

25 5. Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en los procesos de obtención de masas de harinas de trigo, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado** porque puede ser utilizado en harinas de trigo de fuerza débil.

30 6. Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en los procesos de obtención de masas de harinas de trigo, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 5, **caracterizado** porque en la panificación industrial se obtiene una masa de harina de trigo que en máquinas resulta ser no viscosa, fluida, extensible, firme y no pegajosa.

35 7. Uso de un complejo enzimático rico en feruíl esterasa como coadyuvante tecnológico en los procesos de obtención de masas de harinas de trigo, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, **caracterizado** por la obtención de barras de pan con buen greñado, corteza crujiente y dorada, con una miga de alveolado uniforme y buena conservación.

40

45

50

55

60

65

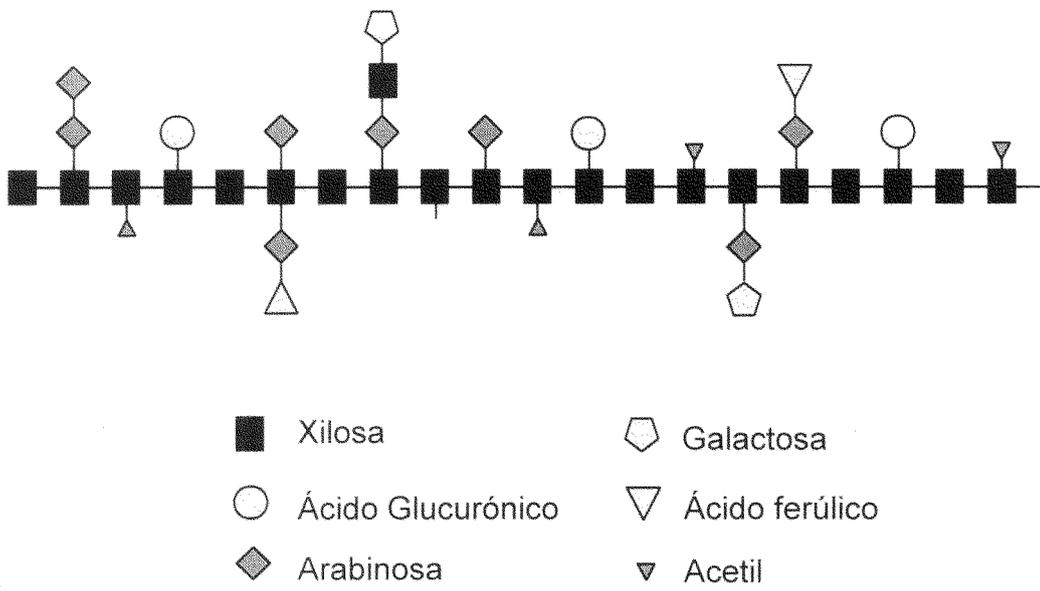


Figura 1

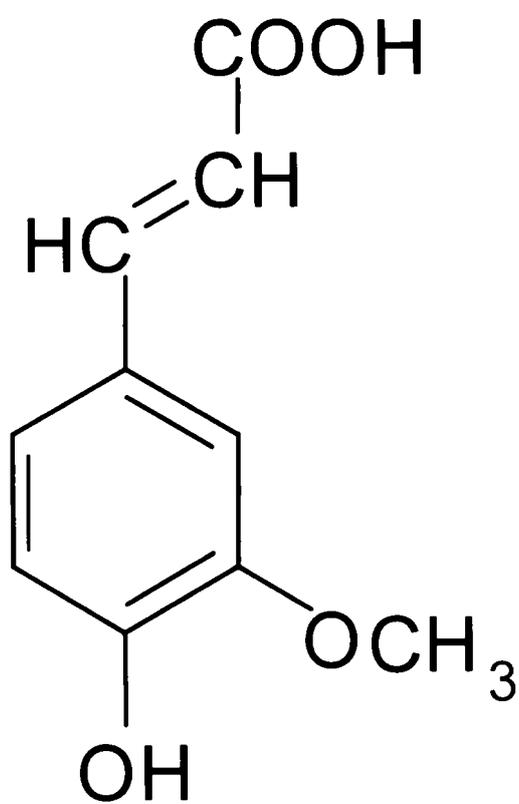


Figura 2

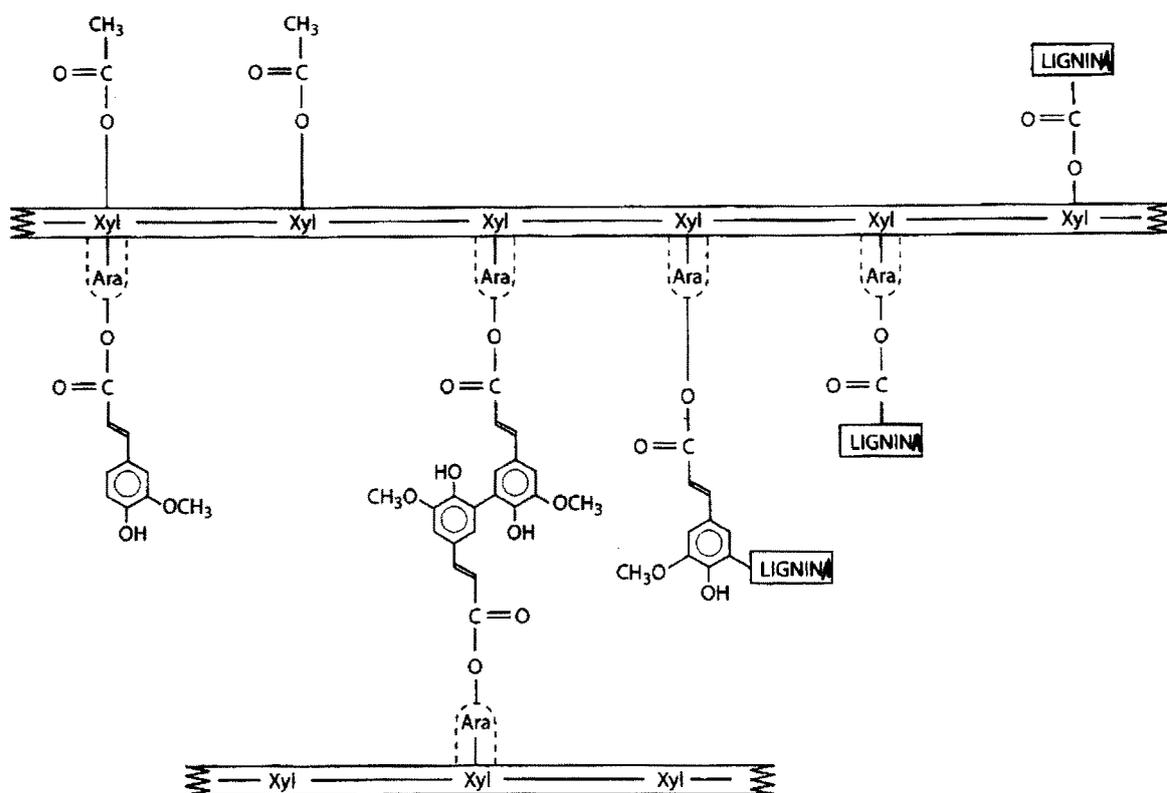


Figura 3

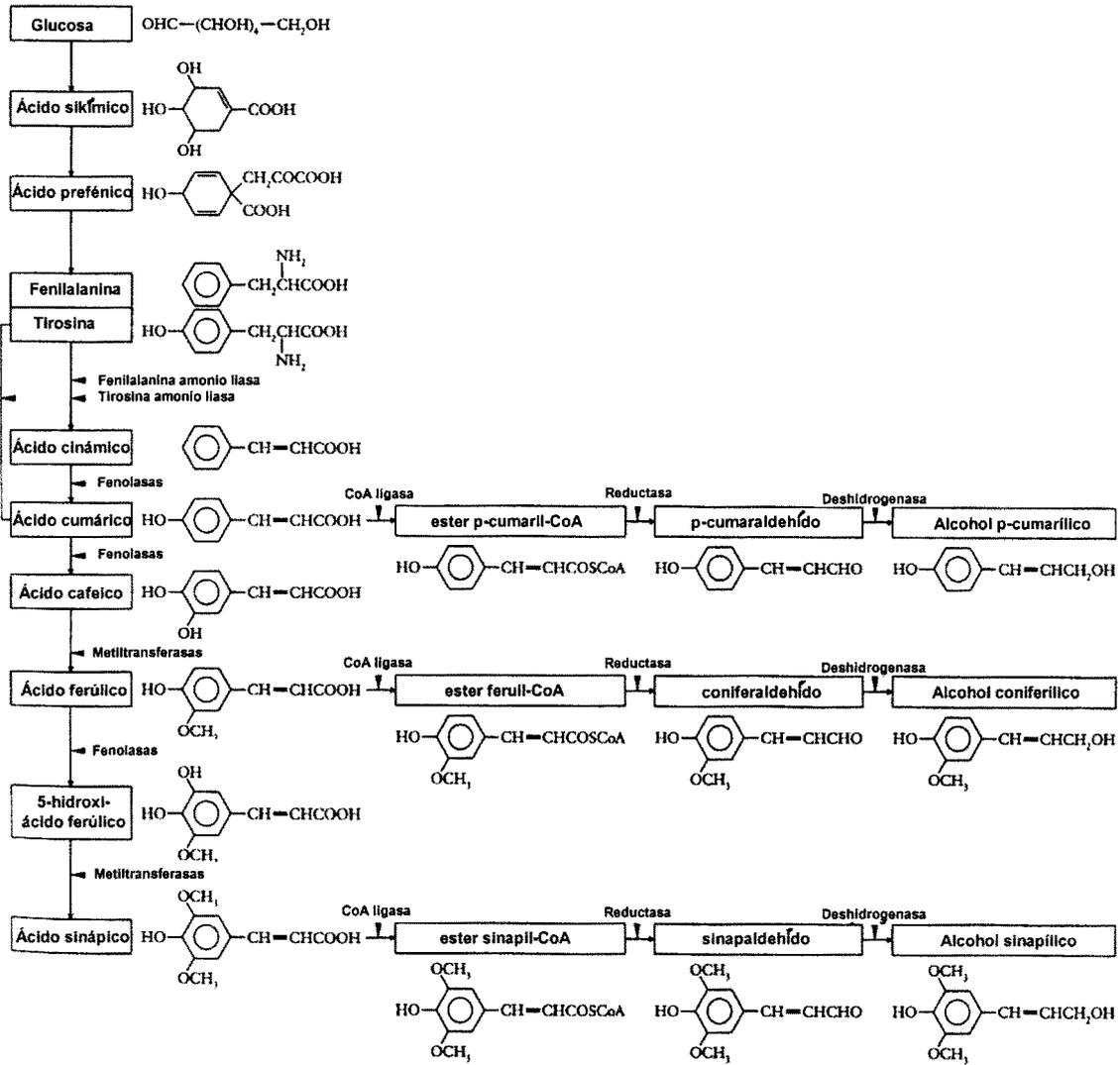


Figura 4

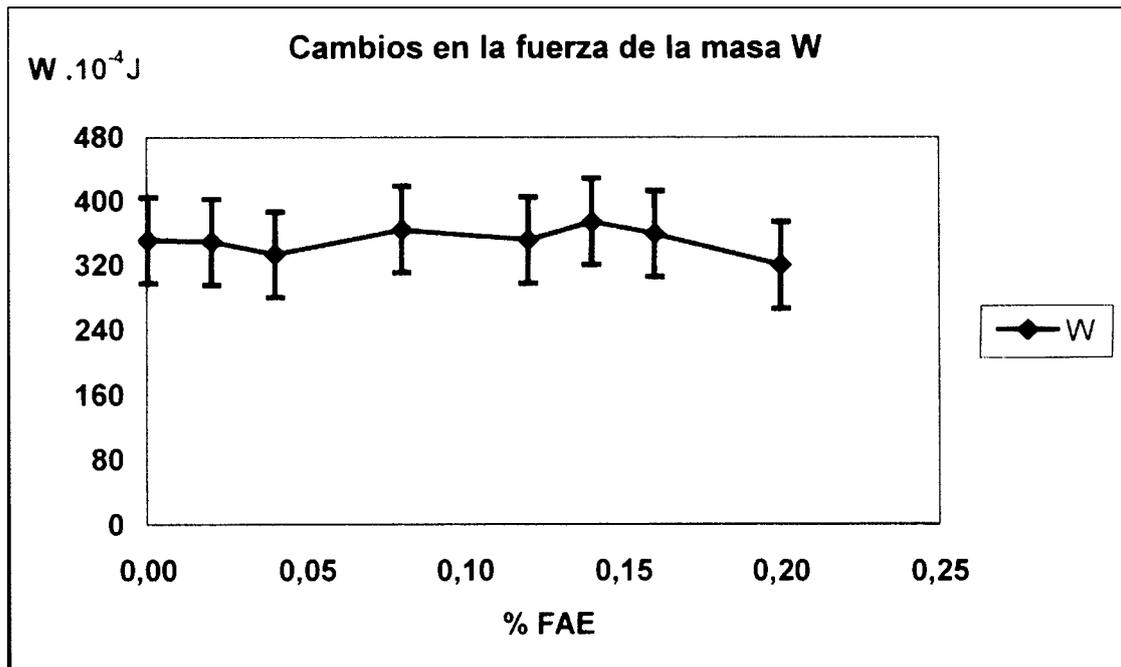


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 242 504

② Nº de solicitud: 200302033

③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A21D 2/26

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BARTOLOMÉ, B. et al. "Growth and release of hydroxycinnamic acids from brewer's spent grain by <i>Streptomyces avermitilis</i> CECT 3339". <i>Enzyme and Microbial Technology</i> (02.01.2003) 32 (1) 140-144. Todo el documento.	1-3
A	US 6143543 A (MICHELSEN, B. et al.) 07.11.2000, columna 27, líneas 5-11; columna 28, líneas 26-27; reivindicaciones 1-2,5.	1
A	FAULDS, C.B. et al. "Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases". <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> (2002) 60: 489-493.	1

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
29.09.2005

Examinador  
I. Galíndez Labrador

Página  
1/1