



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 039**

51 Int. Cl.:

A21D 8/04 (2006.01)

A21D 10/00 (2006.01)

A21D 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05769177 .6**

86 Fecha de presentación : **22.07.2005**

87 Número de publicación de la solicitud: **1773129**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Utilización de aminopeptidasa en la masa como mejorador del pan.**

30 Prioridad: **23.07.2004 EP 04077129**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **CSM Nederland B.V.**
Nienoord 13
1112 XE Diemen, NL

72 Inventor/es: **Scharf, Udo;**
Stolz, Peter;
Huscroft, Simon, Christopher y
Schmidt-Hahn, Kerstin

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 300 039 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

Utilización de aminopeptidasa en la masa como mejorador del pan.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a la aplicación de enzimas en la masa. Más particularmente la presente invención se refiere al uso de enzimas en la masa para mejorar la blandura de las migas de productos horneados.

10 **Antecedentes de la invención**

El pan caliente recién horneado y sacado del horno tiene un aspecto, sabor, olor y textura muy atractivo. Muchos consumidores prefieren el pan con las características típicas del pan recién horneado, tal como una textura blanda de la miga interior y una corteza exterior crujiente. Además, en muchos países los productos de pan con una estructura de miga abierta son populares entre los consumidores. Los panaderos y panaderías se enfrentan al desafío de suministrar productos de pan que presentan estas propiedades favorables, mientras que aseguran al mismo tiempo que estas propiedades sean conservadas durante al menos unos cuantos días. Además, los panaderos y las panaderías particularmente industriales han de producir productos de pan de este tipo con la ayuda de una maquinaria altamente automatizada y con un alto rendimiento.

Muchos panes comercialmente preparados son vendidos frescos, es decir completamente horneados y a temperatura ambiente, y dicho pan normalmente es horneado localmente, de modo que la distribución de la panadería al consumidor puede ser completada dentro del primer día o dentro de dos días para proporcionar una frescura máxima. El pan, no obstante, empieza a endurecerse inmediatamente después del horneado, debido principalmente a la retrogradación del almidón y pierde rápidamente su sensación inicial. El término "endurecimiento" se utiliza para describir un tiempo dependiente de cambios indeseables en las propiedades del pan tales como un aumento de la solidez de la miga, una reducción de la elasticidad de la miga, al igual que los cambios en la corteza que se vuelve dura y correosa.

Mientras que los problemas de mantener la frescura de todos los panes son difíciles, los panes crujientes o de corteza dura del estilo del pan francés tienen vidas útiles más cortas. Entre los panes de corteza dura, los panes se deterioran no solamente debido a una retrogradación del almidón, sino también a la pérdida de la textura crujiente de la corteza a causa de la migración de humedad. Por tanto, los panes de corteza crujiente como el pan francés son idealmente consumidos el mismo día que se hornean.

La enzima alfa-amilasa es muy usada en el pan para mejorar la blandura de la miga y para retardar el endurecimiento. La alfa-amilasa degrada parcialmente la fracción de almidón en la masa y aumenta la blandura de la miga.

Es también conocido en la técnica de la panadería aplicar enzimas, tales como hemicelulasas, en la masa de pan para aumentar el volumen de la rebanada. Las hemicelulasas rompen la fracción de hemicelulosa de la harina de trigo, liberando así el agua normalmente unido a esta fracción en la masa. El uso de hemicelulasas en la masa resulta en una mejor subida de la masa en el horno durante el horneado y en un mejor volumen de la rebanada del producto horneado.

Además, se ha sugerido aplicar enzimas en la masa para mejorar la maquinabilidad de la masa, especialmente de la masa de alto valor de gluten. Es bien conocido que el gluten es necesario en la masa para obtener un volumen específico deseado y una estabilidad de la masa. Con este fin se prefiere preparar la masa de una harina que sea rica en gluten. No obstante, una masa rica en gluten habitualmente será relativamente dura e inflexible, y es difícil de procesar a máquina el horneado de rebanadas de pan u otros productos de masa. Ha sido informado que la maquinabilidad, p. ej. la extensibilidad de dichas masas puede ser mejorada significativamente añadiendo proteasas a la masa.

La US 5,914,259 se refiere a aminopeptidasas de *Aspergilli niger*. Estas aminopeptidasas son conocidas por tener diferentes aplicaciones comerciales, incluyendo la preparación de productos horneados tales como el pan. Se había constatado que la aplicación de estas aminopeptidasas en 1 a 100 unidades de fenilalanina aminopeptidasa por kg de masa resulta en un sabor y aroma mejorado del producto horneado.

La US 5,994,113 se refiere a una enzima que presenta actividad aminopeptidasa y el uso de las mismas para varios objetivos industriales. Esta aminopeptidasa particular proviene de *Aspergillus oryzae*. Se ha observado en la patente que la enzima puede ser usada ventajosamente para mejorar el sabor, el color de la corteza, la estructura de la miga y la pegajosidad de la masa de productos horneados. En la columna 12, líneas 21 - 45 se dice que la enzima puede utilizarse para debilitar los componentes de gluten de la harina para obtener un reblandecimiento de la harina denominada dura. Según los inventores, la aminopeptidasa no degrada la red del gluten y concluyen que consecuentemente las propiedades de la masa y la estructura de la miga no se ven afectadas.

Resumen de la invención

Los inventores han descubierto de forma imprevista que la aminopeptidasa puede ser aplicada ventajosamente en la masa antes del horneado para aumentar y preservar la blandura de la miga del producto de masa horneada. Una vez proporcionada la aminopeptidasa, ésta es añadida previamente al horneado, la actividad enzimática provoca cambios en la masa que favorece a la formación de una miga muy blanda. Después del horneado, la blandura de la miga será

conservada durante un periodo temporal relativamente largo. Como resultado, la incidencia de atributos negativos asociados con el endurecimiento es eficazmente retardada. Aunque los inventores no desean ceñirse a la teoría, se cree que cuando se usa conforme a la presente invención, la aminopeptidasa hidrolizará los enlaces peptídicos en el gluten de la masa, cambiando de ese modo las propiedades del gluten, de manera que resulte en una maquinabilidad de la masa mejorada y en un producto horneado con aumento de blandura de la miga, en un volumen específico aumentado y una resistencia al endurecimiento mejorada.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere al uso de una aminopeptidasa para aumentar y preservar la blandura de la miga de un producto de masa horneado, comprendiendo dicho uso la incorporación de una aminopeptidasa en la masa previamente al horneado.

El término “masa” como se utiliza en este caso incluye varios tipos de masa, incluyendo la masa para el pan, donuts, pasteles, pizzas, donuts y tortas de arroz. La masa normalmente es preparada para combinar un polvo farináceo, tal como la harina de trigo, como el componente principal con agua y otros materiales opcionales, tales como aceites y grasas, azúcares, productos lácteos, huevos, nutrientes de levadura, enzimas, agentes emulsionantes, en presencia o ausencia de cultivos de levadura, seguidos por el amasamiento.

El término “pan” como se utiliza en este caso se refiere a productos obtenidos por cocción al vapor, horneado o fritura de los distintos tipos de masa arriba definidos.

Conforme a la presente invención, la aminopeptidasa es incorporada adecuadamente en la masa en una concentración de al menos 2 mg por kg de harina. Preferiblemente, la aminopeptidasa es incorporada en una concentración de al menos 5 mg por kg de harina. Normalmente, la cantidad de enzimas aplicadas en la masa no excede 300 mg por kg, no excediendo preferiblemente 100 mg por kg de harina. Se ha de entender que las concentraciones de enzimas mencionadas se refieren a la enzima como tal y no a otros componentes que son normalmente contenidos en las preparaciones enzimáticas, p. ej. productos de relleno.

Para permitir que la aminopeptidasa genere un efecto significativo beneficioso, no es solamente importante emplear una dosificación adecuada, sino también controlar el tiempo y la temperatura, permitiendo así que la enzima ejerza su efecto sobre la masa. La actividad enzimática es dependiente de la temperatura y tendrá normalmente su valor máximo entre 40 y 70°C. Consecuentemente, la preparación de la masa incluye ventajosamente una fase de solidificación a una temperatura elevada (p. ej. al menos 32°C).

En el caso de que la preparación de la masa no incluyese una fase de solidificación, puede ser aconsejable emplear una dosificación relativamente alta de aminopeptidasas o permitir que la masa repose algún tiempo antes del horneado. Otra posibilidad adicional es emplear un programa de temperatura del horno que cause una inactivación relativamente tardía de la enzima.

Los beneficios de la presente invención pueden ser realizados con una variedad de aminopeptidasas. Los mejores resultados, no obstante, han sido obtenidos con la leucina aminopeptidasa. Normalmente, la aminopeptidasa empleada conforme a la presente invención muestra una actividad de leucina aminopeptidasa de al menos 5 unidades de LAP (leucina aminopeptidasa) por g, preferiblemente de al menos 10 unidades de LAP por g y más preferiblemente de al menos 30 unidades de LAP por g. Una unidad de LAP es la cantidad de enzimas que hidroliza la leucina-p-nitroanilida para producir 1 mol de p-nitroanilina por minuto a un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C.

Conforme a la presente invención, la aminopeptidasa es ventajosamente aplicada en la masa en una cantidad correspondiente con una actividad aminopeptidasa añadida de al menos 5 unidades de LAP por kg de harina, más preferiblemente de al menos 10 unidades de LAP por kg de harina y más preferiblemente de al menos 15 unidades de LAP por kg de harina. Normalmente, la cantidad de aminopeptidasa aplicada no excede el equivalente de 2000 unidades de LAP por kg de harina, más preferiblemente no excede el equivalente de 1000 unidades de LAP por kg de harina.

En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención emplea una aminopeptidasa derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae* o de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente o de un organismo huésped transformado que lleva una secuencia de ADN que codifica una aminopeptidasa, donde dicha secuencia de ADN es derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae* o de *Rhizopus oryzae*. Según una forma de realización aún más preferida, la aminopeptidasa es derivada de una cepa de *Rhizopus* o de *Aspergillus* no modificada genéticamente. Más preferiblemente, la aminopeptidasa es derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente.

Los ejemplos de preparaciones comerciales de enzimas que contienen una aminopeptidasa no modificada genéticamente originaria de *Rhizopus oryzae* incluyen la Peptidase 433PTM, la Peptidase RTM y Promod 433PTM. Los ejemplos de preparaciones comerciales de enzimas que contienen una aminopeptidasa originaria de *Aspergillus oryzae* u originaria de un organismo huésped transformado que lleva una secuencia de ADN derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae* cuya secuencia de ADN codifica para una aminopeptidasa incluyen: Corolase LAPTM, Bioprotease FVTM y Debitrase DBP 20TM.

Según una forma de realización particularmente preferida de la invención, el presente uso de la aminopeptidasa incluye la incorporación en la masa de la aminopeptidasa de una preparación comercial de aminopeptidasa seleccionada del grupo que consiste en Corolase LAPTM, Peptidase 433PTM, Peptidase RTM, Promod 446PTM, Flavourzyme 500MGTM, Bioprotease FVTM y Debitrase DBP 20TM, más preferiblemente la aminopeptidasa de una preparación comercial de aminopeptidasa seleccionada del grupo que consiste en Peptidase 433PTM, Peptidase RTM, Promod 446PTM y Flavourzyme 500MGTM. Se observa que las diferentes aminopeptidasas contenidas en los productos comerciales mencionados se comercializan en diferentes formulaciones y productos bajo diferentes nombres. Debe ser entendido que la presente invención abarca el uso de las aminopeptidasas que constituyen el componente activo principal de la aminopeptidasa de los productos comerciales mencionados sin tener en cuenta la forma en la cual y/o la marca bajo la cual estas aminopeptidasas están disponibles. La aminopeptidasa contenida en Corolase LAPTM está descrita en la US 6,228,623. La aminopeptidasa contenida en Corolase LAPTM está definida adecuadamente según la reivindicación 15 de la US 6,228,623.

En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, la aminopeptidasa empleada es la aminopeptidasa contenida en Peptidase 433PTM, Peptidase RTM o en Promod 446PTM. Más preferiblemente, el presente uso implica incorporar en la masa la aminopeptidasa contenida en Promod 446PTM.

Conforme a la presente invención, la aminopeptidasa contenida en Corolase LAPTM es ventajosamente incorporada en la masa en una concentración equivalente a 40-5000 mg de Corolase LAPTM por kg de harina, más preferiblemente equivalente a 100-2000 mg de Corolase LAPTM por kg de harina. La aminopeptidasa contenida en Peptidase 433PTM es preferiblemente incorporada en la masa en una concentración equivalente a 20-2500 mg de Peptidase 433PTM por kg de harina, más preferiblemente de 50-1000 mg de Peptidase 433PTM por kg de harina. La aminopeptidasa contenida en la Peptidase RTM es preferiblemente incorporada en la masa en una concentración equivalente a 4-800 mg de peptidasa RTM por kg de harina, más preferiblemente de 10-300 mg peptidase RTM por kg de harina. La aminopeptidasa de Bioprotease FVTM es ventajosamente incorporada en una concentración equivalente a 10-1200 mg de Bioprotease FVTM por kg de harina, más preferiblemente de 40-800 mg de Bioprotease FVTM por kg de harina. La aminopeptidasa contenida en Promod 446PTM es incorporada adecuadamente en la masa en una concentración equivalente a 4-800 mg de Promod 446PTM por kg de harina, más preferiblemente de 10-300 mg de Promod 446PTM por kg de harina. La aminopeptidasa contenida en Flavourzyme 500MGTM es preferiblemente incorporada en la masa en una concentración equivalente a 10-1200 mg de Flavourzyme 500MGTM por kg de harina, más preferiblemente de 40-800 mg de Flavourzyme 500MGTM por kg de harina. La aminopeptidasa contenida en Debitrase DPB 20TM es preferiblemente incorporada en una concentración equivalente a 10-1200 mg de Debitrase DPB 20TM por kg de harina, más preferiblemente en una concentración equivalente a 40-800 mg de Debitrase DPB 20TM por kg de harina. Aquí la terminología "una concentración equivalente a x mg/kg del producto Y" se refiere a la concentración en la que la aminopeptidasa es eficazmente añadida, cuando el producto Y es incorporado en una masa en una concentración de x mg/kg.

Por lo que respecta al uso de aminopeptidasa para aumentar y preservar la blandura de la miga de productos de masa horneada se prefiere incorporar en la masa la aminopeptidasa de una preparación comercial de aminopeptidasa seleccionada del grupo que consiste en Corolase LAPTM, Peptidase 433PTM, Peptidase RTM, Bioprotease FVTM, Promod 446PTM, Flavourzyme 500MGTM y Debitrase DBP 20TM, aún más preferida del grupo que consiste en Bioprotease FVTM, Corolase LAPTM, Peptidase 433PTM, Peptidase RTM y Flavourzyme 500MGTM. Se ha encontrado que estas aminopeptidasas tienen un impacto positivo pronunciado en la blandura de la miga y la resistencia de la miga contra el endurecimiento.

Se descubrió que el uso combinado de aminopeptidasa y ácido ascórbico tenía un impacto inesperado beneficioso particularmente en la blandura y en el endurecimiento de la miga resultante de una interacción sinérgica de estos dos componentes. Así, una forma de realización preferida de la invención se refiere al uso combinado de aminopeptidasa y ácido ascórbico. Normalmente, la aminopeptidasa es añadida a la masa previamente al horneado en una cantidad de al menos 5 mg por kg de harina. Preferiblemente se emplea el ácido ascórbico en una cantidad de al menos 10 mg por kg de harina. Generalmente, la cantidad de ácido ascórbico usada conforme a la presente invención no excede 500 mg por kg de harina.

Los inventores han descubierto que la aminopeptidasa, especialmente la aminopeptidasa de Corolase LAPTM, puede ser usada adecuadamente en la masa como un sustituto de amilasa. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el uso según la presente invención implica la adición de la aminopeptidasa de Corolase LAPTM a la masa, pero no incluye la incorporación de amilasa, particularmente alfa-amilasa, en la masa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición mejoradora del pan que contiene al menos 100 mg/kg de una aminopeptidasa derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente o de un organismo huésped transformado, que lleva una secuencia de ADN que codifica para una aminopeptidasa, siendo dicha secuencia de ADN derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae*. Los inventores han observado que las preparaciones enzimáticas que contienen cantidades adecuadas de la aminopeptidasa mencionada producen resultados muy favorables en cuanto a la blandura de la miga, la extensibilidad de la masa y el volumen específico. Unos ejemplos de preparaciones comerciales de enzimas que contienen una aminopeptidasa no modificada genéticamente originaria de *Rhizopus oryzae* incluyen Peptidase 433PTM, Peptidase RTM y Promod 433PTM. Más preferiblemente, la aminopeptidasa incorporada en la presente composición mejoradora del pan es derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente.

Según otra forma de realización preferida, la composición mejoradora del pan contiene una preparación comercial de aminopeptidasa seleccionada del grupo que consiste en Peptidase 433PTM, Peptidase RTM y Promod 446PTM. Preferiblemente, la composición mejoradora del pan contiene al menos 500 mg/kg, más preferiblemente al menos 1000 mg/kg de dicha aminopeptidasa. Normalmente la cantidad de aminopeptidasa contenida en la composición mejoradora del pan no excede de 100 g/kg, preferiblemente no excede de 30 g/kg.

En una forma de realización particularmente ventajosa de la invención, la composición mejoradora del pan adicionalmente contiene al menos 100 mg/kg de ácido ascórbico. Preferiblemente, el ácido ascórbico está presente en la composición mejoradora del pan en una cantidad de al menos 300 mg/kg, normalmente, la cantidad de ácido ascórbico no excede de 10 g/kg.

La presente composición mejoradora del pan puede contener adecuadamente cualquier ingrediente de panadería que es comúnmente aplicado en las composiciones mejoradoras del pan. En particular, la composición puede ventajosamente contener al menos el 0,1% en peso de un ingrediente de panadería seleccionado del grupo que consiste en emulsionantes, levadura, polvo de hornear, harina, grasa, agentes redox, ácidos y preparaciones enzimáticas que contienen actividad α -amilasa y/o hemicelulasa, especialmente los ingredientes seleccionados del grupo que consiste en emulsionantes, levadura, polvo de hornear, harina, grasa y preparaciones enzimáticas que contienen actividad α -amilasa y/o hemicelulasa.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a una masa que contiene al menos 5 mg por kg de harina de una aminopeptidasa derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente o de un organismo huésped transformado, que lleva una secuencia de ADN que codifica una aminopeptidasa, siendo dicha secuencia de ADN derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae*. Más preferiblemente, la aminopeptidasa incorporada en la presente composición mejoradora del pan es derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente.

En otra forma de realización preferida, la masa contiene una preparación comercial de aminopeptidasa seleccionada del grupo que consiste en Peptidase 433PTM, Peptidase RTM y Promod 446PTM. Más preferiblemente, la masa contiene al menos 5 mg de la aminopeptidasa contenida en Promod 446PTM.

Finalmente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un producto horneado, especialmente un pan parcial o completamente horneado, obtenido (u obtenible) por horneado de una masa según ha sido descrito anteriormente.

La invención está ilustrada adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

El pan de molde blanco fue preparado en base a la siguiente receta:

Ingrediente de la masa	Partes en peso			
Harina de trigo	3000			
Agua	1800			
Levadura	120			
Sal	60			
Ácido ascórbico	0,3			
Aminopeptidasa (Peptidase 433P TM)#	0	0,3	1,0	3,0
# Actividad 250 unidades de LAP/g				

Los ingredientes de la masa fueron mezclados en un mezclador de espiral DiosnaTM y amasados durante 2 + 5 minutos. Se dejó reposar la masa durante 5 minutos antes de ser dividida en pedazos de aproximadamente 600 gramos que fueron puestos en moldes. A continuación, los pedazos de masa fueron solidificados a 33°C y una humedad relativa del 80% durante 75 minutos. Después de la solidificación, se pusieron los moldes en un horno precalentado y se hornearon durante 35 minutos a una temperatura inicial de 240°C que se reduce a 210°C durante el ciclo de horneado.

ES 2 300 039 T3

Una vez solidificada la masa, ésta fue evaluada por varios panaderos experimentados. Los mismos panaderos evaluaron también el pan brevemente después de haber sido sacado del horno. Se descubrió que las masas preparadas con Peptidase 433P™ fueron más blandas y más extensibles que la masa que no contenía aminopeptidasa añadida (control). Además, se descubrió que los panes horneados que contenían aminopeptidasa añadida tenían una miga más blanda que el control. Los panes que contenían 0,3 y 1,0 partes en peso de Peptidase 433P™ tenían volúmenes específicos que fueron un 12% y 15% mayores que aquel del control. El producto que contenía 3,0 partes en peso de la preparación de aminopeptidasa tuvo un volumen específico ligeramente inferior al control. Los panaderos acordaron que los mejores resultados fueron obtenidos con los productos que contenían 0,3 y 1,0 partes en peso de Peptidase 433P™.

Ejemplo 2

El Ejemplo 1 fue repetido, con la excepción de que esta vez la aminopeptidasa fue incorporada en la masa en forma de Promod 446P™ (actividad 900 unidades de LAP/g). Las dosificaciones empleadas fueron 0,03, 0,1 y 0,3 partes en peso.

Se descubrió que las masas preparadas con Promod 446P™ fueron más extensibles y mas blandas que la masa que no contenía aminopeptidasa añadida (control). Además, se descubrió que los panes horneados que contenían 0,1 y 0,3 partes en peso de aminopeptidasa añadida tenían un volumen específico que fue un 9% más alto que aquel del control y aquel del producto que contenía el 0,03% en peso de aminopeptidasa añadida. Los panaderos acordaron que los mejores resultados se obtuvieron con los productos que contenían 0,1 y 0,3 partes en peso de Promod 446P™.

Ejemplo 3

El Ejemplo 2 fue repetido con la excepción de que el ácido ascórbico no fue añadido a la masa. Los resultados obtenidos fueron similares a los presentados en el Ejemplo 2, con la excepción de que la masa que no contenía ácido ascórbico añadido resultó ser menos extensible que la misma masa que contenía ácido ascórbico añadido. Además, se observó que el volumen y la elasticidad de los panes en este experimento fue inferior a la de los panes que contenían adicionalmente ácido ascórbico añadido.

Ejemplo 4

El Ejemplo 2 fue repetido con la excepción de que se añadieron adicionalmente 0,06 partes en peso de amilasa (Fermizym™ ex DSM) a la masa. Se descubrió que los panes que contenían la combinación de Promod 446P™ y amilasa se endurecían a un nivel sustancialmente más lento que los panes idénticos que contenían solamente Promod 446P™ añadido o solamente amilasa añadida.

Ejemplo 5

Un pan de molde blanco fue preparado según viene descrito en el Ejemplo 1, aplicando como aminopeptidasa 0,1 partes de PROMOD 446P™. Además, 0,12 partes de una hemicelulasa (Veron Spezial™ ex AB Enzymes) fueron incorporadas en la masa. Se descubrió que la adición de hemicelulasa producía una masa más blanda y resultaba en mayores volúmenes de la rebanada y propiedades más suaves de la miga.

Ejemplo 6

El Ejemplo 1 fue repetido, con la excepción de que esta vez la aminopeptidasa fue incorporada en la masa en forma de Corolase LAP™ (actividad 350 unidades de LAP/g). Las dosificaciones empleadas fueron 0,06, 0,6 y 3 partes en peso.

Se descubrió que las masas preparadas con Corolase LAP™ fueron más blandas y más extensibles que la masa que no contenía aminopeptidasa añadida (control). Se descubrió que los panes horneados que contenían aminopeptidasa añadida tenían una miga más blanda que el control. Además, se descubrió que los panes que contenían 0,6 y 3 partes en peso de Corolase LAP™ añadida se endurecieron a un nivel mucho más lento que el producto de control.

Se descubrió que los panes horneados que contenían aminopeptidasa añadida tenían un volumen específico significativamente más alto que el producto de control. Para ser más precisos, los volúmenes específicos de los panes que contenían 0,06, 0,6 y 3 partes en peso de aminopeptidasa fueron respectivamente un 4%, 19% y 22% más altos que el producto de control. Los panaderos acordaron que los mejores resultados fueron obtenidos con los productos que contenían 0,6 y 3 partes en peso de Corolase LAP™.

Ejemplo 7

El Ejemplo 6 fue repetido con la excepción de que el ácido ascórbico no fue añadido a la masa. Los resultados obtenidos fueron similares a los presentados en el Ejemplo 3 con la excepción de que la miga de los panes resultó ser menos blanda. Además, se descubrió que los panes en este experimento se endurecieron más rápidamente que los panes obtenidos de una composición de masa idéntica que contenía ácido ascórbico añadido. De los resultados obtenidos en los experimentos 6 y 7 puede extraerse la conclusión de que el efecto antiendurecimiento de la Corolase LAP™ y

ES 2 300 039 T3

del ácido ascórbico excede claramente el efecto que podría haberse anticipado en base a los efectos observados con el ácido ascórbico y la Corolase LAP™ solos.

Ejemplo 8

Un pan de molde blanco fue preparado según está descrito en el Ejemplo 1, aplicando como aminopeptidasa 3 partes de Corolase LAP™. Además, se incorporaron 0,36 partes de una hemicelulasa (Veron Spezial™ ex AB Enzymes) en la masa. Las masas hechas con estos 3 ingredientes fueron más extensibles que las masas que contenían solamente peptidasa y ácido ascórbico. Además, los panes obtenidos tuvieron un volumen más alto y una blandura mayor de la miga que los panes que no contenían hemicelulasa. También en cuanto a la conservación en fresco, los panes que contenían los 3 ingredientes mencionados tuvieron un mejor rendimiento que los panes que contenían solamente aminopeptidasa y ácido ascórbico añadidos.

Ejemplo 9

El Ejemplo 1 fue repetido, con la excepción de que esta vez la aminopeptidasa fue incorporada en la masa en forma de Bioprotease FV™ (actividad 1000 unidades LAP/g). Las dosificaciones empleadas fueron 0,3, 0,5 y 0,7 partes en peso.

Se descubrió que los panes preparados con Bioprotease™ tuvieron una miga más blanda que el control. Además, se descubrió que los panes que contenían 0,3 y 0,5 partes en peso de Bioprotease FV™ añadida se endurecieron a un nivel mucho más lento que el producto de control.

Se descubrió que los panes horneados que contenían aminopeptidasa añadida tenían un volumen específico significativamente más alto que el control. Para ser más precisos, los volúmenes específicos de los panes que contenían 0,3, 0,5 y 0,7 partes en peso de aminopeptidasa fueron respectivamente un 6%, 13% y 12% más altos que el control.

Ejemplo 10

El Ejemplo 1 fue repetido, con la excepción de que esta vez la aminopeptidasa fue incorporada en la masa en forma de Peptidase R™. Además, la concentración de ácido ascórbico fue reducida a 0,15 partes en peso. Las dosificaciones de Peptidase R™ empleadas fueron 0,09, 0,15 y 0,24 partes en peso.

Se descubrió que las masas preparadas con Peptidase R™ fueron más blandas y más extensibles que la masa que no contenía aminopeptidasa añadida (control). Se descubrió que los panes horneados que contenían aminopeptidasa añadida tenían una miga más blanda que el control. Además, se descubrió que los panes que contenían Peptidase R™ se endurecieron a un nivel mucho más lento que el producto de control.

Se descubrió que los panes horneados que contenían Peptidase R™ añadida tenían un volumen específico significativamente más alto que los productos de control. Para ser más precisos, los volúmenes específicos de los panes que contenían 0,09, 0,15 y 0,24 partes en peso de aminopeptidasa fueron respectivamente un 8%, 18% y 21% más altos que los del producto de control.

Ejemplo 11

El Ejemplo 10 fue repetido con la excepción de que el ácido ascórbico no fue añadido a la masa. Los resultados obtenidos fueron similares a aquellos representados en el Ejemplo 10, con la excepción de que la masa de control que no contenía ácido ascórbico añadido resultó ser menos extensible y con un volumen específico mucho inferior que la misma masa que contenía ácido ascórbico añadido.

Ejemplo 12

El Ejemplo 10 fue repetido con la excepción de que se añadieron adicionalmente 0,06 partes en peso de amilasa (Fermizyme™ ex DSM) a la masa. Se descubrió que los panes que contenían la combinación de Peptidase R™ y amilasa se endurecían a un nivel sustancialmente más lento que los panes idénticos que contenían solamente Peptidase R™ añadida o solamente amilasa añadida. Además, el volumen específico de los panes obtenidos con la combinación de Peptidase R™ y amilasa resultó ser significativamente más alto que aquel de los panes obtenidos sin enzima añadida o solamente Peptidase R™ o solamente amilasa.

Ejemplo 13

El Ejemplo 1 fue repetido, con la excepción de que esta vez la aminopeptidasa fue incorporada en la masa en forma de Flavourzyme 500MG™ (actividad 500 unidades de LAP/g). Además, la concentración de ácido ascórbico fue reducida a 0,15 partes en peso. Las dosificaciones de Flavourzyme 500MG™ empleadas fueron 0,075, 0,15 y 0,3 partes en peso.

Se descubrió que las masas preparadas con Flavourzyme 500MG™ fueron más blandas y más extensibles que la masa que no contenía aminopeptidasa añadida (control). Se descubrió que los panes horneados que contenían

aminopeptidasa añadida tenían una miga más blanda que los productos de control. Además, se descubrió que los panes que contenían Flavourzyme 500MGTM fueron endurecidos a un nivel más lento que el producto de control.

Se descubrió que los panes horneados que contenían 0,15 o 0,3 partes en peso de Flavourzyme 500MGTM tenían un volumen específico significativamente más alto que el producto de control. Para ser más precisos, los volúmenes específicos de los panes que contenían 0,15 y 0,3 partes en peso de aminopeptidasa fueron respectivamente un 6% y 11% más altos que el producto de control.

Ejemplo 14

El Ejemplo 13 fue repetido con la excepción de que el ácido ascórbico no fue añadido a la masa. Los resultados obtenidos fueron similares a aquellos representados en el Ejemplo 13, con la excepción de que se descubrió que las masas sin ácido ascórbico añadido eran menos extensibles que las masas correspondientes descritas en el Ejemplo 12.

De los experimentos arriba descritos se extrajo la conclusión de que los mejores resultados globales en cuanto a la blandura de la miga (recién horneada y 4 días de almacenamiento), la elasticidad de la masa y el volumen específico se obtienen con las enzimas Peptidase RTM, Promod 446PTM y la Peptidase 433PTM.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citadas en la descripción

- US 5914259 A [0008]
- US 5994113 A [0009]
- US 6228623 B [0021] [0021].

REIVINDICACIONES

1. Uso de una aminopeptidasa para aumentar y preservar la blandura de la miga de un producto de masa horneado, dicho uso comprendiendo la incorporación de una aminopeptidasa en la masa previamente al horneado.

2. Uso según la reivindicación 1, donde la aminopeptidasa es incorporada en la masa en una cantidad correspondiente a una actividad de al menos 5 unidades de LAP por kg de harina, donde una unidad de LAP es la cantidad de enzimas que hidroliza la leucina- p-nitroanilida para producir 1 μ mol de p-nitroanilina por minuto a un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C.

3. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde la aminopeptidasa es una leucina aminopeptidasa.

4. Uso según la reivindicación 3, donde la aminopeptidasa muestra una actividad de leucina aminopeptidasa de al menos 5 unidades de LAP por g, donde una unidad de LAP es la cantidad de enzimas que hidroliza la leucina-p-nitroanilida para producir 1 μ mol de p-nitroanilina por minuto a un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la aminopeptidasa es derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae* o *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente o de un organismo huésped transformado que lleva una secuencia de ADN que codifica la aminopeptidasa, siendo dicha secuencia de ADN derivada de cualquiera de las cepas de *Aspergillus* o *Rhizopus* mencionadas.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la aminopeptidasa es derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente.

7. Composición mejoradora del pan que contiene al menos 100 mg/kg de una aminopeptidasa derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente o de un organismo huésped transformado que lleva una secuencia de ADN que codifica una aminopeptidasa, siendo dicha secuencia de ADN derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae*.

8. Composición mejoradora del pan según la reivindicación 7, donde la aminopeptidasa es derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente.

9. Composición mejoradora del pan según la reivindicación 7 o 8, donde la aminopeptidasa muestra una actividad de leucina aminopeptidasa de al menos 5 unidades de LAP por g, donde una unidad de LAP es la cantidad de enzimas que hidroliza la leucina-p-nitroanilida para producir 1 μ mol de p-nitroanilina por minuto a un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C.

10. Composición mejoradora del pan según cualquiera de las reivindicaciones 7 - 9, donde dicha composición contiene adicionalmente al menos 100 mg/kg de ácido ascórbico.

11. Composición mejoradora del pan según cualquiera de las reivindicaciones 7 - 10, donde la composición contiene adicionalmente al menos un 0,1% en peso de un ingrediente de panadería seleccionado del grupo que consiste en emulsionantes, levadura, polvo de hornear, harina, grasa, agentes redox, ácidos y preparaciones enzimáticas que contienen una actividad α -amilasa o hemicelulasa.

12. Masa que contiene al menos 5 mg por kg de harina de una aminopeptidasa derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente o de un organismo huésped transformado que lleva una secuencia de ADN que codifica una aminopeptidasa, siendo dicha secuencia de ADN derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae*.

13. Masa según la reivindicación 12, donde la aminopeptidasa es derivada de una cepa de *Rhizopus oryzae* no modificada genéticamente.

14. Masa según la reivindicación 12 o 13, donde la aminopeptidasa muestra una actividad leucina aminopeptidasa de al menos 5 unidades de LAP por g, donde una unidad de LAP es la cantidad de enzimas que hidroliza la leucina-p-nitroanilida para producir 1 μ mol de p-nitroanilina por minuto a un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C.

15. Producto horneado obtenible por horneado de una masa según cualquiera de las reivindicaciones 12 - 14.