



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 429**

51 Int. Cl.:  
**A21D 6/00** (2006.01)  
**A21D 2/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01902584 .0**  
96 Fecha de presentación : **17.01.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1248523**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54 Título: **Proceso de preparación de una masa refrigerada.**

30 Prioridad: **18.01.2000 GB 0001136**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **DANISCO A/S**  
**Langebrogade 1, P.O. Box 17**  
**1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es: **Poulsen, Charlotte, Horsmans y**  
**Sørensen, Jens, Frisbaek**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 316 429 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

Proceso de preparación de una masa refrigerada.

### 5 Antecedentes de la presente invención

La presente invención se refiere a un procedimiento. Particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una masa. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una masa refrigerada.

### 10 Antecedentes de la técnica

Típicamente, las masas refrigeradas comprenden harina de trigo y agua. En este sentido, son similares a otras masas de pan blanco. En la masa refrigerada, la harina de trigo contiene de 2 a 5% de arabinosilano (AX) (Fincher y Stone, 1986) que se origina en las paredes celulares del endospermo. El AX es un polímero no de almidón complejo que presenta una capacidad única para enlazar agua. Girhammer (1992) da a conocer que los AX son capaces de enlazar agua en cantidades de hasta aproximadamente 10 veces su propio peso.

Las masas refrigeradas constituyen un mercado del pan en rápida expansión. En este sentido, la masa prefabricada preparada por panaderías industriales se puede almacenar durante un período prolongado, y el consumidor final puede preparar fácil y rápidamente pan recién hecho. El concepto de masa refrigerada se adapta bien a las demandas crecientes de los consumidores, es decir, poder disponer de pan recién hecho independientemente de los horarios de apertura, la distancia hasta la panadería, etc.

Sin embargo, la masa refrigerada presenta un problema. En este sentido, se conoce el hecho de que las masas refrigeradas exhiben tendencia a adoptar consistencia de jarabe. Este fenómeno es una consecuencia de la ruptura muy negativa del AX, y en consecuencia de la disminución en la capacidad de retención de agua de la masa. En otras palabras, la adopción de una consistencia de jarabe o jarabización es una ausencia de capacidad de retención de agua en función del tiempo, de tal manera que es capaz de provocar la precipitación de líquido en la superficie de la masa.

Se cree que la ruptura del AX es debida a la actividad de xilanasas endógenas en la harina de trigo. La harina de trigo contiene diversas actividades enzimáticas capaces de modificar el AX (Cleemput, G. y otros (1997), Bonnin, E y otros (1998)), lo que provoca una disminución del peso molecular y, en consecuencia, de la capacidad de retención de agua del AX en la masa.

Se ha intentado solucionar el problema de la jarabización añadiendo hidrocoloides a la masa. Estos hidrocoloides enlazan agua y, hasta cierto punto, retrasan dicho fenómeno de jarabización. A título de ejemplo, se debe hacer referencia al documento US-A-5792499, que describe la adición de xilano a la masa.

Sin embargo, existen problemas asociados con la adición de hidrocoloides a la masa. A título de ejemplo, afectan a la capacidad de la masa de ser procesada en máquinas, a las propiedades viscoelásticas de la masa y a la distribución de agua dentro de la misma.

La presente invención pretende dar a conocer una masa que presenta un nivel reducido o incluso nulo de jarabización.

### Aspectos del sumario de la presente invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que es posible reducir, e incluso eliminar, la jarabización en masas refrigeradas utilizando una proteína. Este descubrimiento contrasta con la propuesta de la técnica anterior de utilizar hidrocoloides. Dicho descubrimiento resulta sorprendente, ya que, en algunos casos, se ha esperado que la adición de proteínas adicionales tuviera un efecto negativo sobre la masa. Particularmente, se esperaba que, en algunos casos, la utilización de un inhibidor de una de las enzimas presentes en la masa -particularmente cantidades adicionales de inhibidores enzimáticos endógenos- tuviera un efecto muy negativo sobre la masa resultante. Sin embargo, sorprendentemente, hemos descubierto que éste no es el caso, y que es posible utilizar proteínas a efectos de reducir o impedir la degradación enzimática del arabinosilano presente en la harina de cereal, particularmente en la harina de trigo. En un aspecto preferente, la presente invención se refiere a la utilización de un inhibidor de la xilanasas endógeno en masas refrigeradas a efectos de impedir la jarabización. En una forma de realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización de un inhibidor de la xilanasas endógeno en masas refrigeradas a efectos de impedir la jarabización.

### Descripción detallada de la presente invención

Según un aspecto de la presente invención, se da a conocer un procedimiento para preparar una masa refrigerada, comprendiendo dicho procedimiento el mezclado de harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) y agua con una proteína que puede reducir o impedir la degradación enzimática del arabinosilano presente en la harina de cereal, siendo dicha proteína un inhibidor de la xilanasas.

## ES 2 316 429 T3

La masa se puede preparar mezclando la harina de cereal con el agua inicialmente y añadiendo posteriormente la proteína. Alternativamente, la masa se puede preparar mezclando la harina de cereal y la proteína inicialmente y añadiendo posteriormente agua. Alternativamente, la masa se puede preparar mezclando el agua con la proteína inicialmente y añadiendo posteriormente la harina de cereal. Las combinaciones de estas etapas del procedimiento entran dentro del alcance de la presente invención.

La masa resultante puede comprender ingredientes distintos de la harina de cereal, el agua y la proteína. Por ejemplo, la masa puede comprender cantidades añadidas de uno o más de entre: sal, azúcar, frutas, especia o especias, enzimas tales como la xilanasas o xilanasas, amilasa o amilasas, proteasa o proteasas, oxidasa u oxidasas, lipasa o lipasas, mejorador o mejoradores de pan, etc.

Según un aspecto de la presente invención, se da a conocer la utilización de un inhibidor de la xilanasas endógeno a cereal (por ejemplo, trigo) en masas refrigeradas a efectos de impedir la jarabización.

Una masa refrigerada preparada mediante el procedimiento según la presente invención; un producto de panadería preparado a partir del procedimiento según la presente invención o la masa refrigerada según la presente invención; y una masa refrigerada que comprende harina de cereal, agua y una proteína que puede reducir o impedir la degradación enzimática del arabinoxilano presente en la harina de cereal, se exponen también en el presente documento como referencia.

Para mayor facilidad de referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se describen a continuación bajo los títulos apropiados para cada sección. Sin embargo, las descripciones expuestas en cada sección no están limitadas necesariamente a cada sección en particular.

### Aspectos preferidos

La proteína es un inhibidor de la xilanasas.

Preferentemente, el inhibidor de la xilanasas es un inhibidor de la xilanasas endógeno del cereal.

El inhibidor de la xilanasas endógeno del cereal se puede obtener a partir de cereales adecuados, tales como trigo, centeno, etc.

Preferentemente, el inhibidor de la xilanasas es un inhibidor de la xilanasas endógeno del trigo.

Preferentemente, la harina de cereal es harina de trigo.

### Algunas ventajas

Una ventaja clave de la masa refrigerada preparada mediante el procedimiento según la presente invención consiste en que la misma presenta un nivel reducido, o nulo, de jarabización.

Otra ventaja de la masa refrigerada preparada mediante el procedimiento según la presente invención consiste en que la misma es fácil de preparar.

Otra ventaja de la masa refrigerada preparada mediante el procedimiento según la presente invención consiste en que dicha masa se puede adaptar fácilmente para ajustarse a requisitos específicos, simplemente añadiendo proteínas específicas de acuerdo con la presente invención o combinaciones de proteínas específicas.

Otra ventaja de la masa refrigerada preparada mediante el procedimiento según la presente invención consiste en que la adición de proteína, particularmente inhibidor de la xilanasas endógeno del cereal, puede no afectar a uno o más de entre la absorción de la harina, las propiedades del estado de la masa, las propiedades de manejo de la masa, el procesamiento en máquinas de la masa, o la distribución de agua dentro de la misma.

### Harina de trigo

La expresión “harina de trigo”, tal como se utiliza en el presente documento, es un sinónimo para la harina de grano fino de trigo. Preferentemente, sin embargo, el término se refiere a harina obtenida a partir de trigo en sí y no a partir de otro grano. Así, y a menos que se indique lo contrario, las referencias a “harina de trigo”, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren preferentemente a referencias a la harina de trigo en sí, así como a la harina de trigo cuando está presente en un medio, como por ejemplo una masa.

### Proteína

Una característica esencial de una masa refrigerada preparada mediante el procedimiento según la presente invención es la presencia de una proteína que puede reducir o impedir la degradación enzimática del arabinoxilano presente en la harina de cereal.

## ES 2 316 429 T3

La proteína puede ser cualquier proteína adecuada capaz de reducir o impedir la degradación enzimática del arabinosilano presente en la harina de cereal.

5 La proteína puede ser una proteína que se ha aislado de una fuente adecuada, o se puede haber preparado sintéticamente o utilizando técnicas de ADN recombinante. La proteína también puede ser un mutante o variante de dichas proteínas.

### *Xilanasas*

10 Las xilanasas se han utilizado en panadería durante diversos años.

Entre otras cosas, las xilanasas son capaces de catalizar la despolimerización del arabinosilano que puede estar presente en un cereal (por ejemplo, trigo), por ejemplo una enzima que, entre otras cosas, es capaz de catalizar la solubilización de pentosano insoluble en agua (WIP) y catalizar la despolimerización de pentosano soluble en agua (WSP) que pueden estar presentes en un cereal (por ejemplo, trigo).

En este sentido, se conoce el hecho de que la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) contiene arabinosilano que se origina en las paredes celulares del endospermo. La cantidad de arabinosilano en la harina varía en función del origen de dicha harina; por ejemplo, véase Rouau y otros, *Journal of Cereal Science* (1994), 19, 259-272 *Effect of an Enzyme Preparation Containing Pentosanases on the Bread-making Quality of Flour in Relation to Changes in Pentosan Properties*; Fincher y Stone, (1986) *Advances in Cereal Technology*, Vol. VII (Y Pomeranz, Ed.) AACC, St Paul, Minnesota, 207-295; y Meuser y Suckow (1986), *Chemistry and Physics of Baking* (J. M. V. Blanchard, P J Frasier y T Gillard, Eds.) Royal Society of Chemistry, Londres, 42-61. Típicamente, la cantidad de arabinosilano puede variar de 2 a 5% ((p/p) en base al peso seco del harina). En *J. of Cereal Sci.* (1999), 30, 39-43 "Triticum Zestivum Xylanase Inhibitor (TAXI), a new Class of Enzyme Inhibitor Affecting Breadmaking", Debyser W. y otros exponen que se puede alcanzar el volumen del pan seleccionando variedades de trigo que tengan niveles bajos de inhibidor de la xilanasas o variedades que no contengan inhibidor de la xilanasas.

Fincher y Stone (1986) recogen que el 70% de los polisacáridos en la pared celular del endospermo son arabinosilano. Una característica del arabinosilano es su capacidad de enlazar agua. Parte del arabinosilano es pentosano insoluble en agua (WIP), y parte del mismo es pentosano soluble en agua (WSP). Los resultados experimentales han puesto de manifiesto una correlación entre la degradación de WIP a polímeros solubles en agua de peso molecular alto (HMW) y el volumen del pan.

35 Durante la preparación de un producto de panadería, se conoce el hecho de que la utilización de una xilanasas con una dosificación adecuada puede dar lugar a un sistema de masa más estable (que típicamente comprenderá sal, harina, levadura y agua) y un mejor volumen, por ejemplo, de pan subido.

En este sentido, una buena xilanasas para aumentar el volumen del pan debe disolver el WIP, confiriendo una mayor viscosidad al líquido de masa sin una degradación adicional del WSP en oligómeros de xilosa. Se cree que esta degradación del WIP en WSP de peso molecular bajo (LMW) es perjudicial para las propiedades de la masa y puede dar lugar a pegajosidad (Rouau y otros y McCleary (1986) *International Journal of Biological Macro Molecules*, 8, 349-354).

45 El documento US-A-5306633 da a conocer una xilanasas obtenida a partir de una cepa de *Bacillus subtilis*. Apparently, esta xilanasas puede mejorar la consistencia y aumentar el volumen del pan y los productos de panadería que la contienen.

Se ha aislado y secuenciado otra xilanasas a partir de *Bacillus subtilis* (véase Paice, M. G., Bourbonnais, R., Desrochers, M., Jurasek, L. y Yaguchi, M. A xylanase gene from *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence and comparison with *B. pumilus* gene, *Arch. Microbiol.* 144, 201-206 (1986)).

Hasta el presente, en el sector de la panadería se han utilizado típicamente xilanasas fúngicas. Por ejemplo, J Maat y otros. (Xylans y Xylanases, editado por J. Visser y otros, 349-360, *Xylanases and their application in bakery*) dan a conocer una  $\beta$ -1,4-xilanasas producida por una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori*. Según estos autores, la xilanasas fúngica es efectiva para aumentar el volumen específico de los panes, sin por ello dar lugar a un efecto secundario negativo sobre el manejo de la masa (pegajosidad de la misma), tal como se puede observar en xilanasas derivadas de otras fuentes fúngicas o bacterianas.

60 A pesar de los efectos beneficiosos documentados de las xilanasas, ahora hemos descubierto que se pueden obtener otros efectos beneficiosos utilizando inhibidores de las xilanasas.

En la presente invención, el inhibidor es un inhibidor de la xilanasas que puede reducir o impedir la degradación enzimática del arabinosilano presente en la harina de cereal.

65 A continuación, se describe un ensayo para determinar la actividad de la endo- $\beta$ -1,4-xilanasas.

## ES 2 316 429 T3

### *Ensayo de xilanasa (endo- $\beta$ -1,4-xilanasa)*

Se diluyen muestras de xilanasa en tampón de ácido cítrico (0,1 M)-hidrogenofosfato disódico (0,2 M), a pH 5,0, a efectos de obtener aproximadamente una densidad óptica (OD) = 0,7 en el ensayo final. Tres diluciones de la muestra y un estándar interno con una actividad definida se mantienen a temperatura constante durante 5 minutos a 40°C. Cuando tiempo = 5 minutos, se añade 1 lengüeta de xilazima (substrato de xilano reticulado teñido) a la solución de enzima. Cuando tiempo = 15 minutos (o en algunos casos mayor, dependiendo de la actividad de xilanasa presente en la muestra), la reacción se termina añadiendo 10 ml de TRIS 2%. La mezcla de reacción se centrifuga y se mide la OD del sobrenadante a 590 nm. Teniendo en cuenta las diluciones y la cantidad de xilanasa, la actividad (TXU, unidades totales de xilanasa) de la muestra se puede calcular en relación a un estándar.

### *Inhibidor de la xilanasa*

Tal como se ha indicado anteriormente, en un aspecto preferente de la presente invención el agente que puede reducir o impedir la degradación enzimática del arabinoxilano presente en la harina de cereal es un inhibidor de la xilanasa.

El inhibidor de la xilanasa puede ser cualquier inhibidor de la xilanasa adecuado. En una sección posterior se indica un ensayo adecuado para seleccionar inhibidores de la xilanasa adecuados.

A título de ejemplo, el inhibidor de la xilanasa puede ser el inhibidor descrito en el documento WO-A98/49278 y/o el inhibidor de la xilanasa descrito en Rouau, X. y Surget, A. (1998), McLauchlan, R., y otros. (1999) y/o el inhibidor de la xilanasa descrito en la solicitud de patente UK número 9828599.2 (presentada el 23 de diciembre de 1998), la solicitud de patente UK número 9907805.7 (presentada el 6 de abril de 1999) y la solicitud de patente UK número 9908645.6 (presentada el 15 de abril de 1999).

### *Ensayo de inhibidor de la xilanasa*

Se mezclan 100  $\mu$ l de fracción de inhibidor candidato, 250  $\mu$ l de solución de xilanasa (conteniendo 12 TXU de xilanasa microbiana/ml) y 650  $\mu$ l de tampón (tampón de ácido cítrico 0,1 M - hidrogenofosfato disódico 0,2 M, pH 5,0). La mezcla se mantiene a temperatura constante durante 5 minutos a 40,0°C. Cuando tiempo = 5 minutos, se añade 1 lengüeta de xilazima. Cuando tiempo = 15 minutos, la reacción se termina añadiendo 10 ml de TRIS 2%. La mezcla de reacción se centrifuga (3.500 g, 10 minutos, temperatura ambiente) y se mide el sobrenadante a 590 nm. La inhibición se calcula como actividad residual comparada con el blanco. El blanco se prepara del mismo modo, excepto que se sustituyen los 100  $\mu$ l de inhibidor por 100  $\mu$ l de tampón (tampón de ácido cítrico 0,1 M - hidrogenofosfato disódico 0,2 M, pH 5,0).

### *Inhibidor de la xilanasa específico*

Tal como se ha indicado, un inhibidor de la xilanasa que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención es el inhibidor de la xilanasa descrito en la solicitud de patente UK número 9828599.2 (presentada el 23 de diciembre de 1998), la solicitud de patente UK número 9907805.7 (presentada el 6 de abril de 1999) y la solicitud de patente UK número 9908645.6 (presentada el 15 de abril de 1999).

Este inhibidor endógeno de endo- $\beta$ -1,4-xilanasa se puede obtener a partir de harina de trigo. El inhibidor es un dipéptido con un PM de aproximadamente 40 kDa (medido por SDS o MS) y con un pI de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 9,5.

Hasta ahora, el análisis secuencial ha revelado que el inhibidor presenta, por lo menos, una o más de las secuencias indicadas como SEC ID n° 1, SEC ID n° 2, SEQ ID No 3, SEC ID n° 4, SEC ID n° 5, SEC ID n° 6 y/o SEC ID n° 7.

De este modo, la presente invención incluye un inhibidor de endo- $\beta$ -1,4-xilanasa que comprende, por lo menos, una o más de las secuencias indicadas como SEC ID n° 1, SEC ID n° 2, SEQ ID No 3, SEC ID n° 4, SEC ID n° 5, SEC ID n° 6 y/o SEC ID n° 7 o una variante, un homólogo o un fragmento de las mismas.

Los términos “variante” u “homólogo” son sinónimos con variaciones alélicas de las secuencias.

Los términos “variante”, “homólogo” o “fragmento” en relación con el inhibidor según la presente invención incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, eliminación o adición de uno (o más) aminoácidos de la secuencia, siempre y cuando la secuencia de aminoácidos resultante presente acción inhibitoria de la xilanasa, preferentemente presentando, por lo menos, la misma actividad que un inhibidor que tiene, por lo menos, una o más de las secuencias indicadas como SEC ID n° 1, SEC ID n° 2, SEQ ID No 3, SEC ID n° 4, SEC ID n° 5, SEC ID n° 6 y/o SEC ID n° 7. Particularmente, el término “homólogo” incluye homología con respecto a la estructura y/o la función, siempre y cuando el inhibidor resultante presente acción inhibitoria de la xilanasa, preferentemente presentando, por lo menos, la misma actividad que un inhibidor que tiene, por lo menos, una o más de las secuencias indicadas como

## ES 2 316 429 T3

SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEQ ID Nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y/o SEC ID nº 7. Con respecto a la homología de secuencia (es decir, la similitud de secuencia o identidad de secuencia), preferentemente existe, por lo menos, un 75%, más preferentemente, por lo menos, un 80%, más preferentemente, por lo menos, un 85%, más preferentemente, por lo menos, un 90% de homología con respecto a la secuencia mostrada en las listas de secuencia adjuntas. Más preferentemente, existe, por lo menos, un 95%, más preferentemente, por lo menos, un 98% de homología con respecto a la secuencia mostrada en las listas de secuencia adjuntas.

Particularmente, el término “homología”, tal como se utiliza en el presente documento, se puede igualar al término “identidad”. En este caso, la homología de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de la presente invención y la secuencia de aminoácidos de la presente invención se puede determinar mediante una sencilla comparación de “globo ocular” (es decir, una comparación estricta) de cualquiera una o más de las secuencias con otra secuencia para comprobar si esa otra secuencia presenta, por lo menos, un 75% de identidad con respecto a la secuencia o secuencias. La homología relativa de secuencia (es decir, la identidad de secuencia) también se puede determinar mediante programas informáticos comercialmente disponibles, que pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias. Un ejemplo típico de un programa informático de este tipo es CLUSTAL.

En consecuencia, las comparaciones de homología se pueden llevar a cabo a ojo. Sin embargo, más habitualmente se llevan a cabo con la ayuda de programas de comparación de secuencia fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular a lo largo de secuencias contiguas, es decir, que una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido de la otra secuencia, residuo a residuo. Esto se designa alineación “sin huecos”. Típicamente, estas alineaciones sin huecos se llevan a cabo únicamente a lo largo de un número relativamente corto de residuos (por ejemplo, menos de 50 aminoácidos contiguos).

Aunque esto constituye un método muy sencillo y consistente, no tiene en cuenta, por ejemplo, que en un par de secuencias, por lo demás idénticas, una inserción o eliminación provocará que los siguientes residuos aminoácidos estén desalineados, lo que potencialmente dará lugar a una gran reducción en el % de homología cuando se lleva a cabo una alineación global. En consecuencia, muchos métodos de comparación secuencial se diseñan para que realicen alineaciones óptimas que toman en consideración posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar por ello indebidamente el índice de homología global. Esto se consigue insertando “huecos” en la alineación de secuencia a efectos de intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan “penalizaciones de hueco” a cada hueco que aparece en la alineación, de tal modo que, por ejemplo, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con tan pocos huecos como sea posible -que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas- alcanzará una puntuación más alta que otra con muchos huecos. Se utilizan típicamente “costes de huecos afines”, que cargan un coste relativamente elevado por la existencia de un hueco y una penalización menor para cada residuo posterior del hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente utilizado. Evidentemente, penalizaciones elevadas de hueco producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de programas de alineación permite modificar las penalizaciones de hueco. Sin embargo, resulta preferente utilizar los valores por defecto cuando se utiliza software de este tipo para la comparación de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación), la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

En consecuencia, el cálculo del % máximo de homología requiere en primer lugar la realización de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE.UU.; Devereux y otros, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Otros ejemplos de software que puede llevar a cabo comparaciones de secuencias incluyen, sin limitarse a los mismos, el paquete BLAST (véase Ausubel y otros., 1999 *ibid*, capítulo 18), FASTA (Atschul y otros., 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) y el conjunto GENWORKS de herramientas de comparación. BLAST y FASTA están disponibles para una búsqueda offline y online (véase Ausubel y otros., 1999 *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, resulta preferente utilizar el programa GCG Bestfit.

Aunque el % final de homología se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineación en sí mismo típicamente no se basa en una comparación por pares de “todo o nada”. En lugar de ello, generalmente se utiliza una escala de matriz de puntuación de similitud que asigna puntuaciones a cada comparación por pares en base a la similitud química o a la distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo comúnmente utilizada es la matriz BLOSUM62 -matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST-. Generalmente, los programas GCG Wisconsin utilizan los valores por defecto públicos o una tabla de comparación simbólica a medida si la misma se suministra (véase manual del usuario para más detalles). Resulta preferente utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. Típicamente, el software lleva esto a cabo como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

## ES 2 316 429 T3

Preferentemente, las comparaciones secuenciales se llevan a cabo utilizando el sencillo algoritmo de búsqueda BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, que utiliza los parámetros por defecto.

La presente invención también incluye fragmentos de la secuencia de aminoácidos presentada y variantes de la misma presentes en el presente documento. Los fragmentos adecuados tendrán un tamaño, por lo menos, de 5 aminoácidos, por ejemplo, por lo menos, de 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos.

Las secuencias presentadas en el presente documento también se pueden modificar a efectos de que contengan una o más (por ejemplo, por lo menos, 2, 3, 5 ó 10) sustituciones, eliminaciones o inserciones, incluyendo sustituciones conservadas.

Las sustituciones conservadas se pueden realizar de acuerdo con la siguiente tabla, que indica sustituciones conservativas, en las que aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y, preferentemente, en la misma línea de la tercera columna, se pueden sustituir entre sí:

Alifática	No polar	G A P
		I L V
	Polar no cargada	C S T M
		N Q
	Polar - cargada	D E
		K R
Aromática		H F W Y
Otros		N Q D E

### *Producto de panadería*

Se puede preparar un alimento (particularmente un producto de panadería) a partir de masa refrigerada. Los típicos productos de panadería (horneados) de acuerdo con la presente invención incluyen pan (tal como hogazas, panecillos, bollitos, bases de pizza, etc.), bretzels, tortillas, pasteles, galletas, pastas, galletas saladas, etc.

### **Introducción a la sección de ejemplos**

A continuación se describe la presente invención, únicamente a título de ejemplo, y haciendo referencia a:

la figura 1 - que muestra un gráfico; y

la figura 2 - que ilustra masas.

Mas detalladamente:

La figura 1 es un gráfico que muestra el aumento de OD en el ensayo de xilanasas en función del extracto xilanólico endógeno de trigo añadido; y

La figura 2 ilustra cuatro masas preparadas según el ejemplo 3.

### Ejemplo 1

#### *Purificación de inhibidor de la xilanasas endógeno de trigo*

Se extrajeron 2 kg de harina de trigo (reforma danesa, lote 99056) con agua, utilizando una relación harina:agua de 1:2, durante 10 minutos de agitación. El inhibidor de la xilanasas endógeno soluble se separó de la suspensión harina-agua por centrifugación. La extracción y centrifugación se llevaron a cabo a 4°C. El inhibidor se purificó a partir del extracto de agua mediante las siguientes técnicas cromatográficas y de concentración: HPLC-SEC, HPLC-CIEC, evaporación rotativa, HPLC-HIC, HPLC-SEC y evaporación rotativa. El inhibidor de la xilanasas se pudo controlar durante la purificación utilizando el ensayo de inhibidor de la xilanasas descrito anteriormente. Para determinar la cantidad de inhibidor obtenida, se utilizó el siguiente método de cuantificación de inhibidor.

## ES 2 316 429 T3

### *Método de cuantificación de inhibidor*

Se define 1 XIU (unidad de inhibidor de la xilanasa) como la cantidad de inhibidor que hace disminuir 1 TXU a 0,5 TXU en las condiciones descritas a continuación.

250  $\mu$ l de solución de xilanasa que contiene 12 TXU/ml, aproximadamente 100  $\mu$ l de solución de inhibidor de la xilanasa y tampón de ácido cítrico (0,1 M)-hidrogenofosfato disódico (0,2 M), a pH 5,0, para hacer reaccionar un volumen de reacción de 1.000  $\mu$ l, se preincuban durante 5 minutos a 40°C. Cuando t = 5 minutos, se añade un comprimido de 1 xilazima (Megazyme, Irlanda) a la mezcla de reacción. Cuando t = 15 minutos, la reacción se termina añadiendo 10 ml de TRIS/NaOH 2%, pH 12. La solución se filtra y se mide la absorbancia del sobrenadante a 590 nm. Seleccionando diversas concentraciones diferentes de inhibidor en el ensayo anterior es posible generar un gráfico de OD frente a la concentración de inhibidor. Utilizando el pendiente (a) y la intersección (b) de dicho gráfico, y la concentración de xilanasa, es posible calcular la cantidad de XIU en una determinada solución de inhibidor (ecuación 1).

$$((b/2)/-a)/TXU \text{ en ensayo} \qquad \text{Ecuación 1}$$

A partir de la purificación de inhibidor de la xilanasa endógeno, se recuperó el siguiente rendimiento de inhibidor (tabla 1). La muestra de inhibidor era pura y libre de actividades xilanolíticas endógenas de trigo.

TABLA 1

*Recuperación de inhibidor de la xilanasa endógeno de trigo tras la purificación*

Muestra	Cantidad	XIU	XIU, total	Recuperación, %
Harina	2.000 g	590/g	1.180.000	100
Inhibidor purificado	90 ml	4.658/ml	419.220	35,5

### Ejemplo 2

*Inhibición de actividades xilanolíticas endógenas de trigo, utilizando inhibidor de la xilanasa endógeno de trigo purificado*

Se extrajeron 5 g de harina (lote 99056 que contiene 590 XIU/g) con 15 ml de agua fría durante 10 minutos con agitación. Las enzimas xilanolíticas solubles se separaron de la suspensión de harina-agua por centrifugación (10 minutos, 4°C, 10.000 g). El sobrenadante contenía las enzimas xilanolíticas extraíbles. Se obtuvieron 12 ml de extracto xilanolítico.

Una cantidad diferente del extracto xilanolítico se incubó con sustrato de xilazima (Megazyme, Irlanda) con y sin inhibidor de la xilanasa endógeno de trigo purificado adicional. Véanse las condiciones experimentales detalladas a continuación (tabla 2). El inhibidor purificado contenía 1.200 XIU/ml. En todos los ensayos, el volumen de reacción de 1.000  $\mu$ l se alcanzó añadiendo tampón de ácido cítrico (0,1 M)-hidrogenofosfato disódico (0,2 M), a pH 5,0. La incubación se terminó mediante la adición de 5 ml de TRIS/NaOH 2%, pH 12, tras 6 horas y 30 minutos.

TABLA 2

*Condiciones experimentales para mostrar la inhibición de las actividades xilanolíticas endógenas de trigo mediante la adición de inhibidor de la xilanasa endógeno de trigo purificado*

Ensayo	Extracto xilanolítico, $\mu$ l	Inhibidor purificado, $\mu$ l	Tampón, $\mu$ l	OD
1	100	0	900	0,8
2	100	100	800	0,277
3	250	0	750	0,867
4	250	100	650	0,275
5	500	0	500	1,031
6	500	100	400	0,414

## ES 2 316 429 T3

El inhibidor de la xilanasa endógeno de trigo purificado puede inhibir las enzimas xilanolíticas extraíbles de trigo con mucha eficacia. Las enzimas xilanolíticas extraídas pueden producir un aumento lineal de la OD en el ensayo (véase figura 1).

5

### Ejemplo 3

#### *Preparación y evaluación de masa utilizando inhibidor de la xilanasa endógeno*

10 Se preparan masas utilizando la siguiente receta (tabla 3) y harina 2000063.

TABLA 3

15 *Receta para preparar masa. Se añadió agua hasta obtener 500 unidades Brabender (BU). El xilano es xilano de madera de abedul (Sigma)*

Masa	Harina, g	NaCl, g	Xilano, g	Agua, g	XIU añadido	XIU total
A	50	1	0	28	0	30.000
B	50	1	0	28	30.000	60.000
C	50	1	0	28	270.000	300.000
D	50	1	1	30	0	30.000

30

El mezclado de las masas anteriores dio lugar a los siguientes datos de mezclado.

35

TABLA 4

*Datos de farinógrafo obtenidos al mezclar las masas descritas en la tabla 3*

40

Masa	Absorción de agua, % a 500 BU	Tiempo de desarrollo, min	Estabilidad, min
A	56,1	1,4	9,4
B	56,0	1,5	9,6
C	56,1	1,5	9,3
D	60,2	9,2	17,5

45

50

55 Las masas anteriores (tabla 3) se prepararon mezclando durante 5 minutos en un mezclador farinógrafo.

Las masas se mantuvieron en un recipiente cerrado herméticamente (se aplicó atmósfera de CO<sub>2</sub>) durante 10 días a 10°C. Las masas se evaluaron visualmente en el día 0 y en el día 10. En la tabla 5, se indican los resultados. Además, los resultados también se visualizan en la figura 2. La figura 2 muestra claramente que el jarabe marronoso está ausente en la masa que contiene 10 veces la cantidad de inhibidor de la xilanasa, y sólo estará ligeramente presente en la masa que contiene 2 veces la cantidad de inhibidor de la xilanasa, en comparación con las masas A y D.

60

65

## ES 2 316 429 T3

TABLA 5

*Resultados de la evaluación de las masas A a D de la tabla 3. Una puntuación de 1 representa una superficie de masa seca, y una puntuación de 10 representa una superficie de masa húmeda y con aspecto de jarabe*

	Día 0	Día 10
Masa	Puntuación de jarabización	Puntuación de jarabización
A	2	10
B	2	4
C	2	2
D	2	9

### 20 Referencias

- Atwell, W. A.** (1996). *Method for reducing syruping in refrigerated doughs*. US 5792499.
- Bonnin, E., Goff, A., Saulnier, L., Chaurand, M y Thibault, J.F.** (1998). Preliminary characterisation of endogenous wheat arabinoxylan-degrading enzymic extracts. *Journal of cereal science*. 28. vol. 1. 53-62.
- Cleemput, G., Van Laere, K., Hessing, M., Van Leuven, F., Torrekens, S. y Delcour, J.A.** (1997). Identification and characterization of a novel arabinoxylanase from wheat flour. *Plant Physiol*. 115. vol. 4. 1619-1627.
- Debyser, W. y Delcour, J.A.** (1998). Inhibitors of cellolytic, xylanolytic y beta-glucanolytic enzymes. WO 98/49278.
- Fincher, G.B. y Stone, B.A.** (1986). Cell walls and their components in cereal grain processing. pp 207-295. In: *Advances in cereal science and technology*. Vol. VIII. Pomeranz, Y. ed. *Am. Assoc. Cereal. Chem.*, St. Paul. Minnesota, EE.UU.
- Girhammer, U.** (1992). Water-soluble non-starch polysaccharides from cereals. PhD dissertation, Lund, Suecia.
- McLauchlan, R, Garcia-Conesa, M.T., Williamson, G., Roza, M., Ravestein, P., y MacGregor, A.W.** (1999). A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochem. J.* 338. pp 441-446.
- Rouau, X. y Surget, A.** (1998). Evidence for the presence of a pentosanase inhibitor in wheat flour. *Journal of cereal science*. 28. pp 63-70.
- Soerensen, J.F. y Sibbesen, O.** (1999). *Bacterial xylanase*. UK A 9828599.2.

### Listados de secuencia

#### 50 CADENA A de inhibidor

Fuente de la secuencia: inhibidor de la xilanasas de harina de trigo

55 N-terminal:

GAPVARAVEAVAPFGVCYDTKTLGNNLGGYAVPNV (35aa) SEC ID nº 1

60 C-terminal:

KRLGFSRLPHFTGCGGL (17aa) SEC ID nº 2

#### 65 CADENA B de inhibidor

Fuente de la secuencia: inhibidor de la xilanasas de harina de trigo

## ES 2 316 429 T3

N-terminal:

LPVPAPVTKDPATSLYTIPFH (21aa) SEC ID n° 3

5

Cadena B digerida con Lys-C:

LLASLPRGSTGVAGLANSEGLALPAQVASAQK (31aa) SEC ID n° 4

10

GGSPAHYISARFIEVGDTRVPSVE (24aa) SEC ID n° 5

VNVGVLAACAPSK (13aa) SEC ID n° 6

15

VANRFLCLPTGGPGVAIFGGPVPWPQFTQSMPYTLVVVK SEC ID n° 7

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Procedimiento para preparar una masa refrigerada, comprendiendo el procedimiento el mezclado de harina de cereal y agua con una proteína que reduce o impide la degradación enzimática del arabinosilano presente en la harina de cereal, siendo dicha proteína un inhibidor de la xilanasas.

10 2. Procedimiento para preparar una masa refrigerada, comprendiendo dicho procedimiento el mezclado de harina de cereal y agua con una proteína que tiene un efecto inhibidor, por lo menos, sobre una enzima que tiene un efecto muy negativo sobre el arabinosilano, siendo dicha proteína un inhibidor de la xilanasas.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho inhibidor de la xilanasas es un inhibidor de la xilanasas endógeno del cereal.

20 4. Utilización de un inhibidor de la xilanasas endógeno de cereal en una masa refrigerada para impedir que adquiera aspecto de jarabe.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

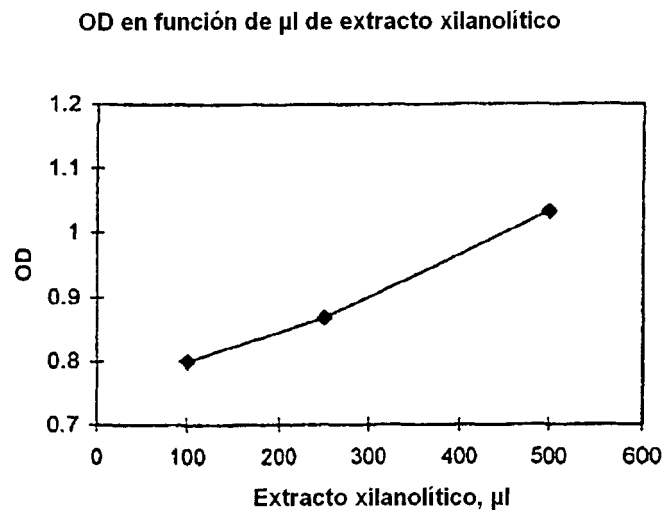


Figura 1. Aumento de la OD en ensayo de xilanasas en función de extracto xilanolítico endógeno de trigo añadido.

# FIG. 2

MASA CON JARABIZACIÓN

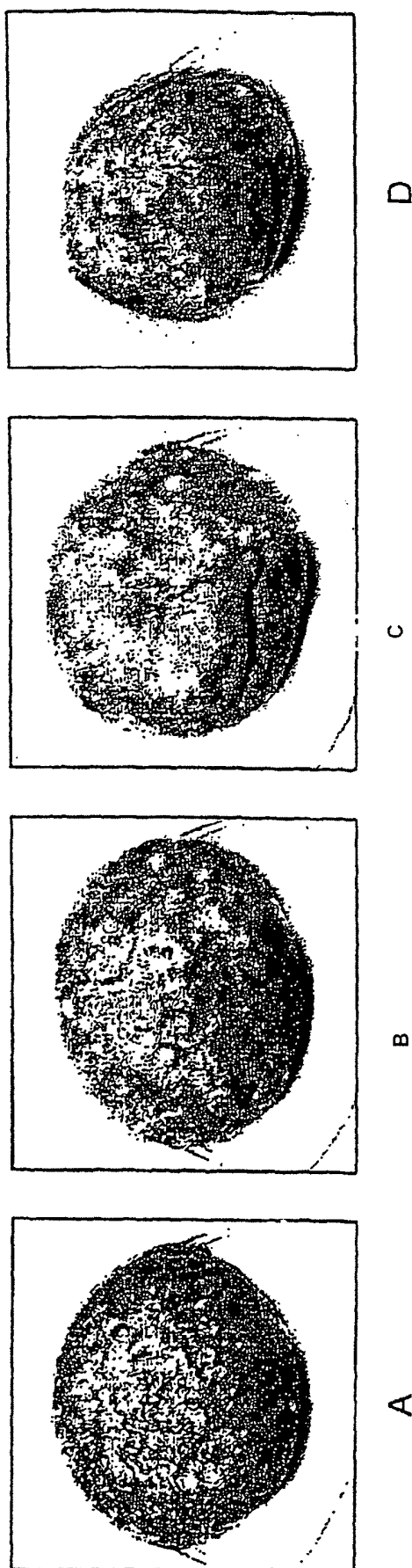


FIGURA 2: MASA PREPARADA TAL COMO SE DESCRIBE EN EL EJEMPLO 3. LA MASA A ES UNA MASA DE CONTROL, LA MASA B CONTIENE 2 VECES LA CANTIDAD NATIVA DE INHIBIDOR DE LA XILANASA, LA MASA C CONTIENE 10 VECES LA CANTIDAD NATIVA DE INHIBIDOR DE LA XILANASA Y LA MASA D CONTIENE UN 2% DE XILANO ADICIONAL Y AGUA ADICIONAL.