



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

EVALUACIÓN DE NUEVAS XILANAS FÚNGICAS PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES DERIVADOS DE CEREALES

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Autora:
Catalina Obando Garzón

Directoras:
Dra. Margarita Orejas y
Dra. Mónica Haros

Tutor:
Dr. Rafael Gavara

Universidad Politécnica de Valencia

2013

EVALUACIÓN DE NUEVAS XILANASAS FÚNGICAS PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES DERIVADOS DE CEREALES

C. Obando; M. Orejas; M. Haros

RESUMEN

Las endo-1,4- β -xilanasas (xilanasas; E.C. 3.2.1.8) son enzimas hidrolíticas que catalizan la degradación de los xilanos, rompiendo al azar los enlaces glicosídicos β -(1-4) de las cadenas de xilosa presentes en la hemicelulosa de la pared celular vegetal, produciendo oligosacáridos (solubles e insolubles) de diferentes tamaños. Estas enzimas son extensamente utilizadas como coadyuvantes tecnológicos en la industria panadera por sus beneficios tecnológicos, como son el incremento del volumen de la pieza panaria, la mayor durabilidad del producto y la mejora de la calidad de la miga. El objetivo de este trabajo fue estudiar la utilidad de nuevas xilanasas de origen fúngico con el fin de incrementar el contenido de fibra soluble en productos de panadería, y por consiguiente su valor nutricional y funcional. Los ensayos se realizaron con tres formulaciones diferentes de pan: 100% harina de trigo (F-100), 50% harina de trigo + 50% harina de trigo integral (WWF-50) y 100% harina de trigo integral (WWF-100). Las enzimas estudiadas fueron dos xilanasas de *Aspergillus nidulans* (XlnA/X₂₂ y XlnC/X₃₄) expresadas en un organismo genéticamente modificado (*Pichia pastoris*) y una enzima comercial procedente de *Thermomyces lanuginosus* y expresada en *Aspergillus oryzae* (XlnPP), como referencia positiva. Cada formulación fue adicionada durante la etapa de amasado con las enzimas en estudio y éstas fueron comparadas con una muestra control sin la adición enzimática. En términos de volumen específico no se encontraron diferencias significativas entre el control y las muestras tratadas con enzimas, si bien se observó una tendencia positiva en las formulaciones con xilanasas comercial y XlnC/X₃₄. Por otra parte, la aplicación de xilanasas ocasionó incrementos significativos en la cantidad de fibra soluble del pan. Estas diferencias fueron significativas entre el control y las muestras adicionadas con las enzimas XlnA/X₂₂ y XlnPP, aumentando la fibra soluble un 7% y un 27% respectivamente en la formulación WWF-50. Asimismo, en la formulación WWF-100 se observó un incremento del 35% cuando se adicionó XlnA/X₂₂. Finalmente, en la formulación F-100 también se encontraron diferencias significativas empleando XlnC/X₃₄ cuando se compara con la muestra control. En general estos resultados demuestran que, además de las aplicaciones tecnológicas actuales de las xilanasas, las enzimas de *A. nidulans* son capaces de aumentar el contenido de fibra soluble al producir oligosacáridos solubles que mejoran el valor funcional de los productos de panadería.

PALABRAS CLAVE: xilanasas, *Aspergillus nidulans*, fibra dietética, productos de panadería

RESUM

Les xilanasas són enzims hidrolítics les quals catalitzen la degradació del xilano, trencant els enllaços β 1-4 de les cadenes de xilosa presents en l'hemicelulosa de la paret cel·lular, produint oligosacàrids (solubles i insolubles) de diferents grandàries." Estos enzims són extensament utilitzades com coadyuvants tecnològics en la indústria fornera pels seus beneficis tecnològics, com són l'increment del volum de la peça panaria, la major durabilitat del producte i millora de la qualitat de la molla. L'objectiu d'este treball va ser estudiar la utilitat de noves endoxilanasas d'origen fúngic a fi d'incrementar el contingut de fibra soluble en productes de forn i per consegüent el seu valor nutricional i funcional. Els assajos es van realitzar amb tres formulacions diferents de pa: 100% farina de blat (F-100), 50% farina de blat + 50% farina de blat integral (WWF-50) i 100% farina de blat integral (WWF-100) . Els enzims, les quals van ser addiciones durant l'etapa de pastat, van ser dos endoxilanasas d'*Aspergillus nidulans* (XlnA/X22 i XlnC/X34) expressades en un organisme genèticament modificat (*Pichia pastoris*) i un enzim comercial procedent de *Thermomyces lanuginosus* i expressada en *Aspergillus oryzae* (XlnPP), com a referència positiva. Les mostres van ser addicionades amb enzims i van ser comparades amb una mostra control sense enzims. En termes de volum específic no es van trobar diferències significatives entre el control i les mostres tractades amb enzims, observant-se una tendència a incrementar-se en les formulacions amb xilanasas comercial i XlnC/X₃₄. D'altra banda, l'aplicació de les endoxilanasas va mostrar un increment significatiu en la quantitat de fibra soluble en el producte final. Estes diferències van ser significatives entre el control i les mostres addicionades amb els enzims XlnA/X₂₂ i XlnPP, augmentant un 7% i 27%, respectivament en la formulació WWF-50. En la formulació de pa integral es va observar un increment del 35% quan es va addicionar XlnA/X₂₂. Finalment, en la formulació F-100 també es van trobar diferències significatives emprant XlnC/X₃₄ comparat amb la mostra control. En general estos resultats demostren que a més de les aplicacions tecnològiques actuals de les endoxilanasas, els enzims de *A. nidulans* són capaços d'augmentar el contingut de fibra soluble produint oligosacàrids solubles i al seu torn productes de forn amb propietats funcionals.

PARAULES CLAU: xilanasas, *Aspergillus nidulans*, fibra dietètica, productes de forn

ABSTRACT

Xylanases are hemicellulolytic enzymes, which catalyze the degradation of xylan - the major polysaccharide constituent of hemicellulose- producing oligosaccharides (soluble or insoluble) of different sizes. These enzymes are widely used as food processing aids in baking for technological benefits such as increased volume, bread durability and improved crumb quality. The aim of this work was to test new fungal endoxylanases in order to enhance the production of soluble fibre in bakery products. The assays were performed using three different bread formulations: 100% wheat flour (F-100), 50% wheat flour + 50% whole wheat flour (WWF-50) and 100% whole wheat flour (WWF-100). The enzymes added during mixing were two *Aspergillus nidulans* endoxylanases (XlnA/X₂₂ and XlnC/X₃₄) overexpressed in genetically modified organisms (*Pichia pastoris*) and a commercial enzyme from *Thermomyces lanuginosus* and expressed in *Aspergillus oryzae* (XlnPP), as positive reference and samples were compared against control ones without enzymes. In terms of specific volume, no significant differences were found between control and samples treated with enzymes; however a tendency towards increasing was observed using either commercial xylanase or XlnC/X₃₄. Application of endoxylanases resulted to be useful increasing the soluble fibre amount in breads. Significant differences were found between control samples and XlnA/X₂₂ (7% increase) or the commercial endoxylanase (27%) in WWF-50 formulations. Remarkably, about 35% increase was observed when applying XlnA/X₂₂ in whole wheat bread formulations. The F-100 bread showed a significant increase when the XlnC/X₃₄ enzyme was added comparing to the control sample without enzyme. These results illustrate that in addition to their current technological applications, endoxylanases from *A. nidulas* showed themselves capable of developing bakery products with functional properties.

KEYWORDS: xylanase, hemicellulose, *Aspergillus nidulans*, dietary fibre, breadmaking products

INTRODUCCIÓN

La fibra dietética puede desempeñar un importante papel fisiológico en el mantenimiento del bienestar general y la salud, siendo los productos que la contienen un ejemplo claro de alimento funcional. El consumo de productos ricos en fibra, como los cereales en grano entero, las harinas integrales y las enriquecidas con salvado, se ha incrementado en los últimos años por el aumento de la prevalencia de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, como son la diabetes de tipo-2 y las enfermedades cardiovasculares (Aleixandre y Miguel, 2008). La fibra dietética puede clasificarse en fibra soluble e insoluble. La fibra insoluble es aquella que está compuesta de sustancias que no se disuelven en agua tales como la celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón resistente. Estos componentes resisten la acción de los microorganismos intestinales, por lo tanto es una fibra no fermentable, funcionando como un barrido del intestino, acelerando el tránsito intestinal y movilizándolo fuera del organismo más rápidamente (Aleixandre y Miguel, 2008). La fibra soluble, como su nombre lo indica, está compuesta por sustancias que se disuelven en agua tales como inulina, pectina, gomas y fructo-oligosacáridos. Este tipo de fibra es capaz de captar agua para formar una especie de gel, disminuyendo y ralentizando la absorción de grasas y azúcares lo que conlleva a regular la tasa de colesterol y glucosa en sangre; además es fermentable en el colon y podría aumentar el número de bifidobacterias y lactobacilos, los cuales tienen un efecto probiótico (Brown et al, 1999).

Como producto de la molienda del grano de trigo se obtiene la harina, cuyos principales componentes son el almidón, las proteínas y los lípidos. Entre los componentes minoritarios se encuentran los polisacáridos no amiláceos (NSP), básicamente provenientes de la pared celular del grano y que constituyen entre el 2-3%, los arabinosilanos (AX) solubles entre 0,4–0,8%, y los insolubles entre 1,1–1,9% (Courtin y Delcour, 2002). Los NSP de la harina de trigo comprenden distintos polisacáridos formados principalmente por hexosas y pentosas de los cuales aproximadamente un 25% son solubles y el 75% restante insolubles, siendo su principal componente los arabinosilanos que representan la mayor parte del material insoluble (Jiménez, 1999).

Los arabinosilanos pertenecen al grupo de las hemicelulosas y están formados por una cadena principal de residuos de xilosa unidos por enlaces β -(1→4) a la que se unen ramificaciones laterales de L-arabinofuranosa (Jiménez, 1999). Sus productos de hidrólisis por degradación enzimática tienen la capacidad de afectar positivamente las propiedades de la masa mejorando su maquinabilidad, además de producir aumento del volumen de la pieza panaria y retardo del envejecimiento (Caballero et al, 2007). Para incrementar el porcentaje de solubilización de los AX se pueden realizar tratamientos con sustancias con características alcalinas (NaOH, Ba(OH)₂, KOH) o bien con endoxilasas, las cuales catalizan la degradación del xilano, hidrolizando los enlaces glicosídicos β -(1→4) de las cadenas de xilosa (Courtin y Delcour, 2002).

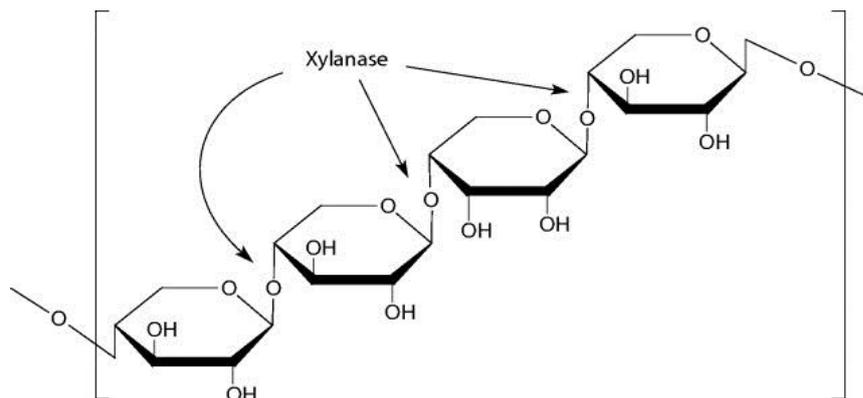


FIGURA 1. Esquema del mecanismo general de hidrólisis de los enlaces glicosídicos β -1,4 del xilano.

Las xilanasas pueden ser producidas por hongos filamentosos, levaduras, algas marinas y algunas bacterias, entre otros. Entre las fuentes microbianas los hongos filamentosos son especialmente interesantes, ya que secretan estas enzimas en el medio y sus niveles de xilanasas son más elevados que los que se encuentran en las levaduras y las bacterias (Polizeli et al, 2005). La mayoría de los microorganismos xilanólicos pueden tener varios genes capaces de codificar la producción de diferentes tipos de xilanasas que difieren en cuanto a la especificidad del sustrato, secuencia y estructura (Wong et al, 1988). De forma general se pueden clasificar en dos familias, GH10 y GH11 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) cuya diferencia se encuentra principalmente a nivel de secuencia y estructura tridimensional (Gallardo, 2007), aunque existen otras familias con actividad xilanólica como las GH5, GH7, GH8 y GH43.

La actividad xilanólica en el proceso de panificación se inicia durante el amasado modificando las características viscoelásticas de la masa, continúa durante la fermentación y los primeros minutos de cocción hasta su desnaturalización por efecto de las altas temperaturas de horneado (Caballero et al, 2007). Tecnológicamente los efectos de las xilanasas son bastante conocidos en la industria panadera. Estas enzimas se emplean como coadyuvantes tecnológicos para mejorar los parámetros de procesamiento y calidad del producto final (Haros et al, 2002). Sin embargo, la acción hidrolítica de estas enzimas sobre el xilano no sólo tiene una implicación tecnológica, se ha demostrado que los arabinoxilano-oligosacáridos (AXOS) producidos por la degradación de los AX del salvado estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de la microbiota beneficiosa en el colon, y por lo tanto son considerados compuestos con actividad prebiótica (Van Craeyveld et al, 2010).

Es por ello que el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la adición de nuevas xilanasas de origen fúngico en distintas formulaciones de pan, con el fin de incrementar la cantidad de fibra soluble en productos de panadería a base de trigo para incrementar su valor funcional. Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron dos xilanasas de *A. nidulans* (XlnA/X₂₂ y XlnC/X₃₄), pertenecientes a las familias de glicosil hidrolasas GH11 y GH10 respectivamente, expresadas en organismos genéticamente modificados (*Pichia pastoris*) y una xilanasas recombinante comercial de la familia GH11 procedente de *Thermomyces lanuginosus* y obtenida en *Aspergillus oryzae*, como referencia positiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En este estudio se utilizó harina de trigo (La Meta, Lleida, España) y harina de trigo integral (La Meta, Lleida, España), ambas adquiridas en el mercado local. Las enzimas empleadas fueron una xilanasa comercial (Pentopan Mono BG, Novozymes, Dinamarca) y dos de *A. nidulans* producidas en el laboratorio por cepas modificadas de *P. pastoris*, denominadas XInA/X₂₂ y XInC/X₃₄; las tres con actividad endo- β -(1,4)-xilanasa.

Para la elaboración de las masas se utilizó levadura prensada comercial (*Saccharomyces cerevisiae*, Levamax, España), agua destilada y sal común.

Métodos

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MATERIAS PRIMAS

La caracterización de las harinas en cuanto a la composición química consistió en la determinación de cenizas por ignición en mufla a 910°C (ICC 104/1, 1990), contenido de humedad (Método 44-15A de la AACC, 1995), contenido de proteína por el método semimicro de Kjeldhal (AACC 46-13, 1983), contenido lipídico por el método Soxhlet (AACC, 1967) y fibra dietética, soluble e insoluble, por método enzimático (AOAC 991.43, 1991). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

DETERMINACION DE LAS CARACTERÍSTICAS FARINOGRÁFICAS DE LAS HARINAS Y MEZCLA DE HARINAS

Mediante un Farinógrafo (Brabender, Duisburg, Alemania) y utilizando el método oficial de la AACC (Método 54-21, 1995) se determinó la variación de la resistencia al amasado que presenta la masa en función del tiempo. Se utilizaron 300g de harina o mezcla de harinas adicionando agua destilada a 30°C hasta obtener 500 Unidades Brabender (UB). Los parámetros obtenidos fueron: absorción de agua (W.A) (%), cantidad de agua necesaria para que la masa alcance su máxima consistencia a 500 UB; tiempo de llegada (A.T) (min), es el tiempo que la masa requiere para llegar a la consistencia de 500 UB; tiempo de desarrollo de la masa (D.D.T) (min), tiempo transcurrido desde que se adiciona el agua hasta que la masa alcanza la consistencia máxima; estabilidad (D.S) (min), tiempo en que la consistencia de la masa se mantiene constante a 500 UB; índice o grado de ablandamiento (S.D) (UB), diferencia de consistencia entre el punto máximo de consistencia de la curva hasta pasados 12 minutos; e índice de tolerancia al amasado (M.T.I) (UB), diferencia entre el punto máximo de consistencia de la masa hasta pasados 5 minutos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

OBTENCIÓN DE LAS ENZIMAS

Las xilanasas de *A. nidulans* fueron obtenidas a partir de las cepas FGSC10073 (XInC/X₃₄) y FGSC1009 (XInA/X₂₂) de la levadura *P. pastoris*. Éstas se obtuvieron en el Fungal Genetics Stock Center y los detalles de su construcción se pueden consultar en la bibliografía (Bauer et al., 2006).

CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *P. pastoris* Y PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

Se realizaron pre-cultivos de las cepas FGSC1009 y FGSC10073 sembrando en 300ml de medio líquido BMGY (10g/L de extracto de levadura, 20g/L de peptona, 100mM tampón fosfato (pH 6,0), 3.4g/L base de levadura nitrogenada (YNB) sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 10g/L de (NH₄)₂SO₄, 10mL/L de glicerol y 0,4mg/L de histidina) dos colonias de cada levadura previamente obtenidas en placas de BMMY sólido (1,5% de agar). Se incubaron durante 24 horas a 30°C y con agitación constante a 250 rpm. Se midió la absorbancia a 600 nm (OD₆₀₀) para determinar la densidad celular, OD₆₀₀ 3-6; (Bauer et al., 2006), utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec™ 2100 pro, GE Healthcare, USA). Las células se recogieron por centrifugación durante 5 min a 5000 rpm y los '*pellets*' se resuspendieron en el medio líquido de inducción BMMY para su incubación durante 72 horas a 30°C. El medio BMMY tenía la misma composición que el medio BMGY pero se sustituían 10ml/L de glicerol por 5ml/L de metanol. Cada 24 horas se tomaron dos muestras, una para medir la OD₆₀₀ y otra se almacenó en congelación para su posterior análisis. Tras cada toma de muestra, el medio se suplementó con metanol (0,5% del volumen final del cultivo) para compensar pérdidas del inductor por evaporación. Tras 72 horas de incubación el cultivo se centrifugó durante 10 min, a 4000rpm, se recuperó el sobrenadante y éste fue almacenado en congelación para su posterior aplicación.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática fue determinada siguiendo el protocolo del comerciante (Megazyme, Irlanda) con pequeñas modificaciones. El sustrato utilizado fue azo-xilano (Birchwood) en solución al 2% en tampón acetato sódico 100 mM a pH 4,5. La reacción contenía 125µL de sustrato, 15µL del sobrenadante o caldo de cultivo y 35µL de agua destilada, para un volumen final de reacción de 175µL. La mezcla se incubó a 50°C durante 15 minutos en un incubador Thermomixer (Eppendorf) con agitación constante. La reacción se terminó añadiendo 500µL de etanol al 96% y agitación en vortex durante 10 segundos para provocar la precipitación del xilano no hidrolizado, que luego se separó por centrifugación durante 10 min a 3000 rpm. Al sobrenadante recuperado se le midió la absorbancia a 590 nm en un multilector de microplacas (POLARstar Omega, BMG LabTech, USA).

PROCESO DE PANIFICACIÓN

Se estudiaron 3 formulaciones, en base harina o mezclas de harinas (500g): pan blanco (F-100), harina 100%, sal 1,6%, levadura 5,0% y agua 60,3%; pan semi-integral (WWF-50), harina 50%, harina integral 50%, sal 1,6%, levadura 5,0% y agua 64,9%; y pan integral (WWF-100), harina integral 100%; sal 1,6%, levadura 5,0% y agua 68,8%. Cada una de las tres formulaciones anteriormente descritas se adicionaron con xilanasa comercial como control positivo, y las xilanasas de *A. nidulans* en estudio XInA y XInC. La enzima comercial se adicionó a una concentración de 40mg/100kg de harina (2500 Unidades/g de enzima) según recomendación del fabricante. Las enzimas estudiadas se equipararon en dosis a la enzima comercial.

La cantidad de agua utilizada en cada formulación corresponde a la absorción óptima de la harina o mezcla de harinas para alcanzar la consistencia óptima durante el amasado según datos farinográficos (Tabla 1).

Para la obtención de las piezas panarias fue necesario optimizar las variables operativas del proceso para cada formulación estudiada (F-100, WWF-50 y WWF-100) con el fin de estandarizar el tiempo de fermentación, volumen óptimo de la masa y posteriormente la temperatura y tiempo de cocción. En la etapa de fermentación se registró a intervalos regulares de tiempo (15 min) la temperatura y el volumen de la masa hasta alcanzar el valor límite, obteniéndose la evolución del volumen versus el tiempo de fermentación.

El proceso de panificación se realizó mediante el método directo, que consiste en la adición de los ingredientes en una misma fase. Se incorpora a la harina, la sal, la levadura y la enzima, en su caso, disueltas en parte del agua de la formulación. Posteriormente se amasó durante 3-7 minutos según formulación (Tabla 1) y se dejó reposar durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo la masa se dividió en piezas de 100 g, se les dio uniformidad boleándose por 10 segundos en boleadora (Brabender, Alemania). A continuación las piezas se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La segunda etapa de fermentación se realizó en cámara de fermentación (Infrisa, España) en condiciones controladas de temperatura (28°C) y humedad relativa (80%) hasta el desarrollo óptimo del volumen, según los parámetros de optimización de cada formulación de pan (Tabla 1).

Tras la etapa de fermentación las piezas se hornearon en un horno eléctrico (Eurofours.59144, Gommegnies, Francia) durante 18-25 minutos a 160-170°C según formulación (Tabla 1). Las piezas panarias se enfriaron a temperatura ambiente para su posterior análisis. Cada formulación se realizó por duplicado.

TABLA 1. Condiciones de proceso de panificación según tipo de pan

Muestra	Amasado		Fermentación			Horneado	
	Absorción de agua (%)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
F-100	60,3	3	28-29	30	120	170	18
WWF-50	64,9	6	28-29	35	115	170	18
WWF-100	68,8	8	28-29	40	110	160	25

F-100: harina de trigo 100%; WWF-50: harina de trigo 50%+ harina de trigo integral 50%; WWF-100: harina de trigo integral 100%.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO FINAL

Se evaluó el contenido de fibra dietética, soluble e insoluble, según el método oficial de la AOAC (Método 991.43, 1991) (Figura 2), y el contenido de humedad según el método oficial de la AACCC (Método 44-15A, 1995). Los parámetros tecnológicos estudiados fueron el volumen específico de cada pieza panaria (cm^3/g) determinado en panvolumenómetro (Chopin, Francia), la relación de aspecto de la rebanada central, ancho/alto (cm/cm); y la dureza de la miga (N) mediante un análisis de perfil de textura en el texturómetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para estudiar las diferencias estadísticamente significativas de los resultados obtenidos se utilizó el programa Statgraphics Plus 7.1 por medio de la prueba de comparación múltiple de medias utilizando la distribución de Fisher (L.S.D), con un nivel de confianza del 95%, ($p < 0,05$).

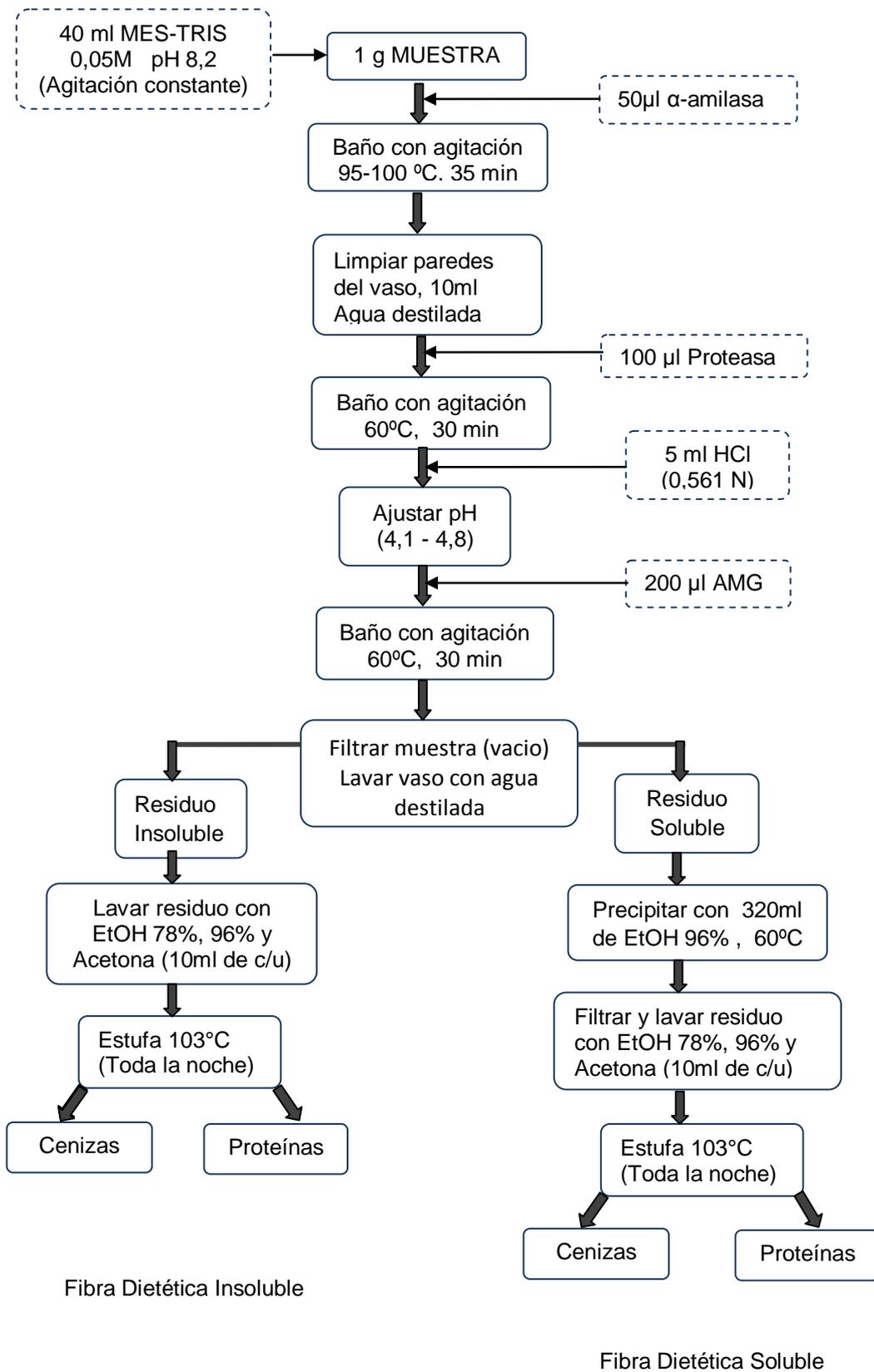


FIGURA 2. Diagrama de flujo para la determinación del contenido de fibra dietética

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de materias primas

Los resultados de los análisis de la composición química de las harinas utilizadas en esta investigación se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. Composición química de las materias primas

Muestra	Humedad ⁽¹⁾	Cenizas ⁽²⁾	Lípidos ⁽²⁾	Proteínas ⁽²⁾	Fibra ⁽²⁾ Dietética
	%	%	%	%	%
H.B	13,91 ± 0,04 b	0,84 ± 0,01 a	1,29 ± 0,05 a	10,2 ± 0,9 a	4,2 ± 0,1 a
H.I	13,62 ± 0,03 a	1,88 ± 0,02 b	1,64 ± 0,01 b	10,9 ± 0,1 b	11,4 ± 0,1 b

H.B: Harina Blanca, H.I: Harina Integral. Media ± de (desviación estándar), n=3. Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes a un nivel de confianza de 95%. ⁽¹⁾ Humedad en base húmeda, ⁽²⁾ Datos expresados en base seca (b.s.).

El contenido de cenizas, lípidos, proteína y fibra dietética de la harina de trigo integral (H.I) son significativamente superiores comparado con la harina refinada (H.B). La harina integral mostró un contenido significativamente mayor en cenizas debido a la mayor concentración de minerales presentes en el salvado. El contenido en fibra dietética es otro de los componentes claramente superiores en las harinas integrales. La fibra total comprende las fracciones soluble e insoluble, en la harina refinada, aproximadamente el 65% correspondió a la fibra insoluble mientras que en la harina integral cerca del 82%. Esta diferencia se debe fundamentalmente a la presencia del pericarpio del grano de trigo en las harinas con alto índice de extracción, y en su mayoría constituida por arabinosanos (solubles e insolubles), β -glucanos, celulosa y lignina (Lebesi y Tzia, 2012).

Características farinográficas de las formulaciones de harinas

En la Tabla 3 se muestran las propiedades de amasado y sobreamasado de las harinas involucradas en esta investigación.

La absorción de agua de las harinas muestra valores significativamente diferentes en cada una de las formulaciones debido a la presencia de salvado de trigo en las mezclas WWF-50 y WWF-100, las cuales aumentan en 7% y 12% respectivamente comparado con la harina refinada. Esto se debe principalmente a la composición de las fibras existentes en él con mayor número de grupos hidroxilo que permiten una mejor interacción con el agua por medio de los

puentes de hidrógeno, lo que conlleva a una mayor hidratación de la masa (Sanz Penella et al, 2008).

TABLA 3. Características farinográficas de las harinas y mezcla de harinas

Muestra	W.A	A.T	D.D.T	D.S	M.T.I	S.D
	%	min	min	min	UB	UB
F-100	60,3 ± 0,1 a	1,0 ± 0,1 a	3,0 ± 0,1 a	4,1 ± 0,7 a	77,5 ± 3,5 c	97,5 ± 3,5 c
WWF-50	64,9 ± 0,1 b	3,6 ± 0,1 b	5,9 ± 0,1 b	5,1 ± 0,3 b	47,5 ± 3,5 b	65,3 ± 0,3 b
WWF-100	68,8 ± 0,1 c	4,7 ± 0,1 c	7,8 ± 0,1 c	8,3 ± 0,1 c	15,1 ± 0,1 a	57,5 ± 3,5 a

F-100: Harina de Trigo 100%; WWF-50: Harina de Trigo 50%+ Harina de Trigo Integral 50%; WWF-100: Harina de Trigo Integral 100%. W.A: Absorción de agua, A.T: Tiempo de llegada, D.D.T: Tiempo de desarrollo de la masa, D.S: Estabilidad, M.T.I: Índice de tolerancia al amasado, S.D: Grado de ablandamiento. Media ± de (desviación estándar), n=3. Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes con un nivel de confianza de 95%.

Se puede observar un incremento en la estabilidad y el tiempo necesario para el desarrollo de la masa que aumentan de forma significativa en las formulaciones que incluyen harina integral, ya que las partículas de salvado ralentizan la velocidad de hidratación y el desarrollo del gluten para llegar a la consistencia adecuada (Sudha et al, 2007).

El índice de tolerancia al amasado y el grado de ablandamiento por el contrario disminuyen de forma significativa debido a la dilución de la proteína del gluten con la inclusión de la harina integral, principalmente por las partículas de salvado que interfieren en la conformación de la red de gluten (Zhang y Moore, 1997).

Calidad tecnológica del pan fresco

En cuanto al contenido de humedad del producto final no hay diferencias significativas entre el control negativo (sin enzima) y las muestras tratadas con enzima, excepto con la xilanasa comercial en las formulaciones F-100 y WWF-50, donde el contenido de agua fue significativamente inferior. En términos generales se observó un incremento significativo del contenido de humedad en las muestras adicionadas con harina integral (Tabla 4).

TABLA 4. Efecto de la inclusión de xilanasas en la calidad del pan fresco

Muestra	Humedad ^(a) %	Dureza ^(a) N	Volumen Específico ^(b) cm ³ /g	Relación ^(b) Ancho/Alto cm/cm
Pan Blanco				
F-100	36,7 ± 0,4 b	0,79 ± 0,09 a	3,25 ± 0,02 b	1,5 ± 0,1 a
F-100 XInC/X ₃₄	35,5 ± 1,5 b	0,68 ± 0,07 a	3,26 ± 0,06 b	2,0 ± 0,1 c
F-100 XInA/X ₂₂	36,6 ± 0,4 b	0,75 ± 0,18 a	3,03 ± 0,10 a	1,8 ± 0,1 b
F-100 XInPP	31,7 ± 3,7 a	0,71 ± 0,09 a	3,37 ± 0,20 b	1,8 ± 0,0 b
Pan Semi Integral				
WWF-50	38,0 ± 0,1 b	0,87 ± 0,14 b	2,88 ± 0,10 b	1,8 ± 0,1 a
WWF-50 XInC/X ₃₄	38,0 ± 0,2 b	0,81 ± 0,05 ab	2,89 ± 0,06 b	2,1 ± 0,1 b
WWF-50 XInA/X ₂₂	38,3 ± 0,3 b	0,97 ± 0,05 b	2,70 ± 0,05 a	1,8 ± 0,0 a
WWF-50 XInPP	37,2 ± 0,2 a	0,75 ± 0,13 a	2,92 ± 0,07 b	1,9 ± 0,2 a
Pan Integral				
WWF-100	37,9 ± 0,4 a	1,8 ± 0,2 b	2,26 ± 0,22 a	2,0 ± 0,1 b
WWF-100 XInC/X ₃₄	37,9 ± 0,9 a	1,4 ± 0,3 a	2,28 ± 0,14 a	2,1 ± 0,1 b
WWF-100 XInA/X ₂₂	38,1 ± 0,2 a	1,5 ± 0,2 ab	2,18 ± 0,14 a	1,9 ± 0,0 a
WWF-100 XInPP	38,4 ± 0,1 a	1,4 ± 0,1 a	2,32 ± 0,13 a	2,0 ± 0,1 b

F-100: Harina de Trigo 100%; WWF-50: Harina de Trigo 50% + Harina de Trigo Integral 50%; WWF-100: Harina de Trigo Integral 100%. XInPP: Xilanasa Pentopan® MonoBG; Media ± de ^(a)n=3; ^(b)n=6. Valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes a un nivel de confianza de 95%. El análisis estadístico fue realizado por separado para cada tipo de pan.

En lo concerniente al volumen específico de la pieza panaria no se observó un incremento significativo de este parámetro con el tratamiento enzimático (Tabla 4). Por el contrario, el volumen específico de las piezas panarias de las formulaciones WWF-50 y F-100 con la xilanasa XInA/X₂₂ descendió significativamente (Tabla 4). Esto podría deberse a una excesiva degradación de los arabinoxilanos solubles lo cual conduciría a la pérdida de la capacidad de retención de agua en la masa provocando una mala distribución de las células de

gas en la red de gluten y por consiguiente una pérdida de volumen del pan (Courtin et al, 2001) (ver Figura 3). Teniendo en cuenta que las xilanasas XInA/X₂₂ y XInPP pertenecen a la familia GH11, estos resultados podrían sugerir un efecto específico de la xilanasas XInA/X₂₂ que no ocurrirían con otras xilanasas de esta familia.

En términos de dureza de la miga del pan fresco, aunque las diferencias no son significativas en todos los casos, se aprecia una disminución de este parámetro con la adición de enzimas en todas las formulaciones. El descenso fue más acusado en la formulación de pan integral, especialmente con la enzima comercial y la XInC/X₃₄ de *A. nidulans*. Esto puede ser debido a la degradación del xilano que origina fragmentos de hemicelulosa hidrosolubles los cuales aumentan su capacidad de hidratación, suavizando la miga y retardando el endurecimiento (Caballero et al, 2007). Sabemos por anteriores investigaciones (Lebesi y Tzia, 2012; Jiménez, 1999) que existe una relación inversa entre la dureza del pan fresco y el volumen específico, al incrementarse el volumen y tener una miga menos densa y más porosa, la firmeza tiende a disminuir. Los resultados de esta investigación están en concordancia con estas investigaciones debido a que las xilanasas XInC/X₃₄ y XInPP presentaron mayor volumen y menor dureza (Tabla 4).



FIGURA 3. Efecto de la adición de las diferentes xilanasas en el volumen de la pieza panaria. F-100: Harina de Trigo 100%; WWF-50: Harina de Trigo 50% + Harina de Trigo Integral 50%; WWF-100: Harina de Trigo Integral 100%. Xilanasas: XInC/X₃₄; XInA/X₂₂; XInPP: Pentopan® MonoBG.

De forma general los panes elaborados con las enzimas muestran una relación de aspecto de la rebanada central más uniforme en cuanto a la forma del pan y estructura de la miga (Figura 4).



FIGURA 4. Efecto de la adición de las diferentes xilanasas en el aspecto de la rebanada central. F-100: Harina de Trigo 100%; WWF-50: Harina de trigo 50% + Harina de trigo integral 50%; WWF-100: Harina de trigo integral 100%. Xilanasas: XlnC/X₃₄; XlnA/X₂₂; XlnPP: Pentopan® MonoBG.

En términos generales las xilanasas XlnC/X₃₄, XlnA/X₂₂ y XlnPP han incrementado de forma significativa el contenido de fibra soluble en casi todas las formulaciones. Los resultados más sorprendentes se observaron en la formulación F-100 XlnC/X₃₄ con un incremento de 40% comparado con la muestra control sin enzima y de 7% con la adición de xilanasas comercial. Por otra parte, en las formulaciones donde hubo inclusión de harina integral (WWF-50 y WWF-100), la enzima que mejores resultados ha mostrado ha sido XlnA/X₂₂ aumentando de forma significativa el contenido de fibra soluble en 7% y 35% respectivamente, comparado con las muestras sin enzimas. Comparado con la enzima comercial el incremento que produjo XlnA/X₂₂ fue del 16% en WWF-100 (Tabla 5).

TABLA 5. Efecto de la inclusión de xilanasas en el contenido de fibra soluble, insoluble y total de productos de panadería

Muestra	Fibra Soluble %	Fibra Insoluble %	Fibra Total %
Pan Blanco			
F-100	1,65 ± 0,38 a	5,01 ± 0,27 b	6,66 ± 0,13 c
F-100 XInC/X ₃₄	2,31 ± 0,34 b	4,19 ± 0,17 a	6,50 ± 0,16 bc
F-100 XInA/X ₂₂	1,92 ± 0,29 ab	4,10 ± 0,14 a	6,02 ± 0,33 a
F-100 XInPP	2,15 ± 0,54 ab	4,04 ± 0,91 a	6,19 ± 0,36 ab
Pan Semi Integral			
WWF-50	2,50 ± 0,10 a	8,69 ± 0,43 b	11,18 ± 0,33 c
WWF-50 XInC/X ₃₄	2,52 ± 0,11 a	8,00 ± 0,21 a	10,51 ± 0,22 a
WWF-50 XInA/X ₂₂	2,68 ± 0,12 b	7,85 ± 0,34 a	10,53 ± 0,21 ab
WWF-50 XInPP	3,18 ± 0,11 c	7,67 ± 0,17 a	10,85 ± 0,16 b
Pan Integral			
WWF-100	2,46 ± 0,10 a	12,28 ± 0,31 b	14,73 ± 0,33 a
WWF-100 XInC/X ₃₄	2,61 ± 0,47 a	11,98 ± 0,15 ab	14,59 ± 0,58 a
WWF-100 XInA/X ₂₂	3,33 ± 0,41 b	11,79 ± 0,46 ab	15,12 ± 0,15 a
WWF-100 XInPP	2,86 ± 0,36 ab	11,43 ± 0,74 a	14,29 ± 1,11 a

Media, n=3. Valores seguidos de la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes con un nivel de confianza de 95%. El análisis estadístico se realizó por separado para cada tipo de pan. F-100: Harina de Trigo 100%; WWF-50: Harina de Trigo 50% + Harina de Trigo Integral 50%; WWF-100: Harina de Trigo Integral 100%. Xilanasas: XInC/X₃₄; XInA/X₂₂; XInPP: Pentopan® MonoBG

Como se ha mencionado anteriormente, dentro de las glicosil-hidrolasas, las xilanasas empleadas en este estudio se pueden categorizar dentro de dos familias. Las enzimas XInA/X₂₂ y XInPP pertenecen a la familia GH11, mientras que la XInC/X₃₄ a la familia GH10, y por tanto filogenéticamente esta última aparece en distinto grupo (Figura 5).

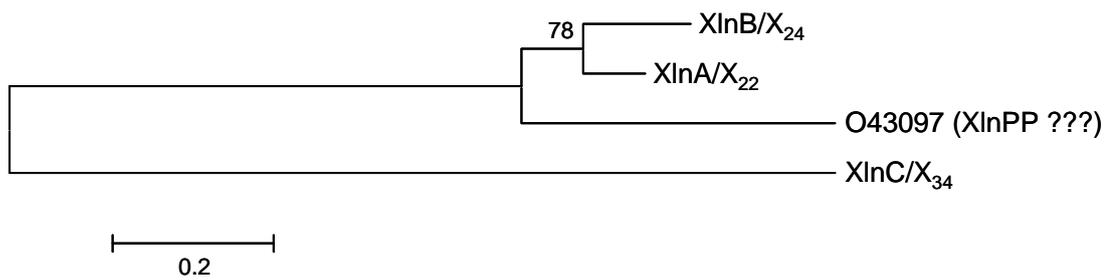


FIGURA 5. Relaciones filogenéticas de las xilanasas utilizadas en este estudio y de otra xilanasas de la familia GH11 (XlnB/X₂₄) caracterizada en *A. nidulans*. Si bien no podemos garantizar que la enzima XlnPP se corresponda con aquella cuyo número de acceso es O43097, hemos considerado que es así ya que es la única xilanasas caracterizada de *T. lanuginosus* en la base CAZy.

Las enzimas del grupo GH10 (XlnC) suelen ser más permisivas en términos de especificidad de sustrato y preferentemente activas con los sustratos solubles. Pueden degradar cadenas de xilosa tanto lineales como ramificadas, rompiendo los enlaces glicosídicos β -(1-4) y algunos β -(1-3) [cuando están en medio de dos enlaces β -(1-4)] hacia el extremo no reductor, requiriendo dos restos de xilosa entre los residuos ramificados (Pollet et al, 2010). Mientras que las pertenecientes a la familia GH11 (XlnA) son menos permisivas y más activas con los xilanos insolubles (Beaugrand, 2004). Estas enzimas sólo rompen enlaces β -(1-4), preferentemente por las regiones menos ramificadas de la cadena, ya que no pueden cortar por el extremo no reductor y requieren tres restos de xilosa no sustituidos consecutivos para realizar la hidrólisis (Figura 6).

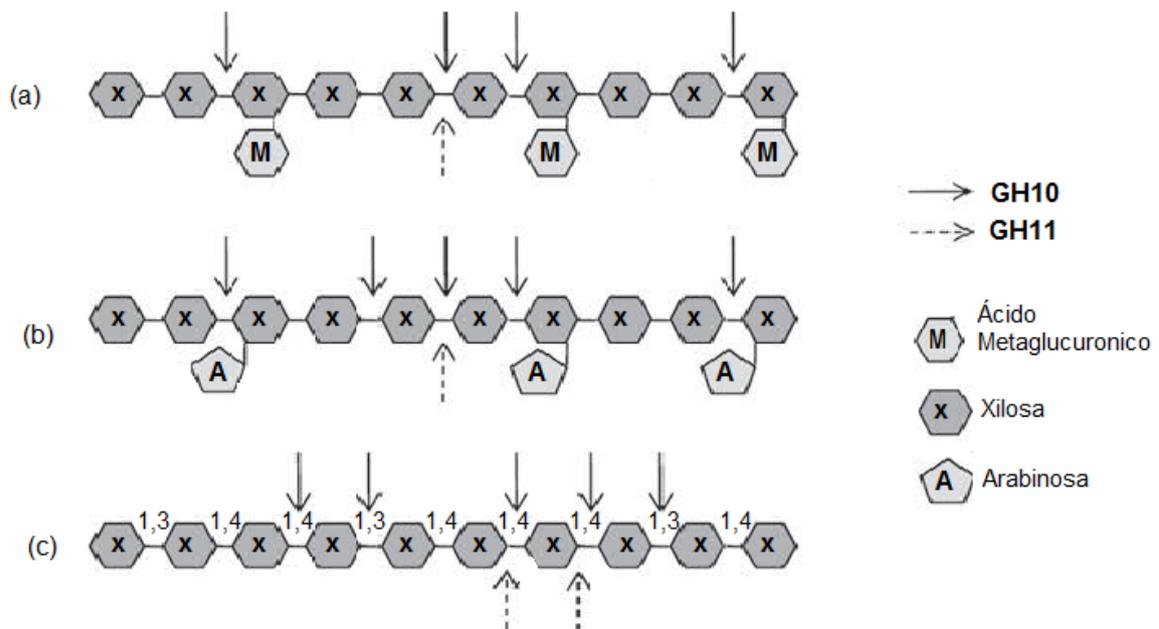


FIGURA 6. Actividad hidrolítica de GH10 y GH11. (a) Glucuronoxilano; (b) Arabinoxilano; (c) Cadena mixta de xilano con enlaces (β -1,3/ β -1,4). Fuente: Pollet et al, 2010.

Esta actividad catalítica puede observarse con la enzima XInA/X₂₂ la cual mostró mejores resultados en la obtención de fibra soluble en las formulaciones que incluían harina integral donde el contenido de AX insolubles es mayor.

En la industria panadera suelen utilizarse mayoritariamente xilanasas de la familia GH11, a la que pertenece XInA/X₂₂, principalmente por la especificidad de sustrato de los AX insolubles. El producto de su hidrólisis son fibras de alto peso molecular que incrementan la fibra dietética del producto final (Pollet et al, 2010) y son las responsables de la retención de agua en la masa para formar una red de gluten adecuada que mejora las características tecnológicas del pan.

CONCLUSIONES

La adición de xilanasas de *A. nidulans* en formulaciones de pan mostró un incremento significativo en el contenido de fibra soluble en todas las formulaciones estudiadas, en particular en F-100 con XInC/X₃₄ y en WWF-100 con XInA/X₂₂. Las nuevas xilanasas fúngicas tuvieron un comportamiento similar o superior en cuanto al incremento del contenido de fibra soluble que la xilanasas comercial. Este incremento podría proporcionarle características prebióticas a los productos de panadería por la presencia de arabinosilanos solubles que favorecen el crecimiento y actividad de la microbiota beneficiosa en el colon. Sin embargo, en cuanto a la calidad tecnológica de los productos desarrollados, la inclusión de las xilanasas XInC/X₃₄ y XInA/X₂₂ no mostró una mejora sustancial de la dureza de la miga o volumen específico de las piezas panarias. Por este motivo se debe continuar la investigación profundizando en el empleo de estas enzimas en panificación en cuanto a la optimización de su dosis tanto a nivel tecnológico como nutricional y funcional, ahondando en el perfil hidrolítico remanente en el producto final así como también en su implicación en el efecto bifidogénico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y PROMETEO/2012/064 de la Generalitat Valenciana, España.

BIBLIOGRAFIA

- AACC, 1995. Approved Methods of AACC. Method 54–21, ninth ed. The American Association of Cereal Chemists, Saint Paul, Minnesota
- AACC. Approved Methods of AACC. Method 44–15A, (9th ed.) The American Association of Cereal Chemists, Saint Paul, Minnesota, 1995.
- AACC. 1983. Approved methods of the AACC (8th ed.) St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. Methods 46-13.
- AOAC, Determination of ash in cereals and cereals products. Method 923.03ICC 104/1 (1990)
- .AOAC. 1991. Determination of total, soluble and insoluble dietary fibre. *Megazyme*. Methods 991.43.
- AOAC. 1991. Total dietary fibre assay procedure. *Megazyme*. Based on AACC method 32-05 and AOAC Method 985.29
- Aleixandre, A., Miguel, M. 2008. Dietary Fiber in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome: A Review Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48: 905–912.
- Bauer, S., Vasu, P., Mort, A.J., Somerville, C.R. 2006. Cloning, expression, and characterization of an oligoxyloglucan reducing end-specific xyloglucanobiohydrolase from *Aspergillus nidulans*. Carbohydrate Research 340: 2590–2597
- Beaugrand, J., Chambat, G., Wong, V., Goubet, F., Rémond, C., Paës, G., Benamrouche, S., Debeire, P., O'Donohue, M., Chabbert, B. 2004. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. Carbohydrate Research 339: 2529–2540.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W., Sacks, F.M. 1999. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. The American Journal of Clinical Nutrition, 69: 30-42.
- Caballero, A., Ruiz, L., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., Popper, L. 2007. Efectos de la adición exógena de complejos enzimáticos con actividad principal xilanasas sobre las propiedades viscoelásticas de las masas de harina de trigo.
- Courtin, C.M., Delcour, J. A. 2002. Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread - making. Journal of Cereal Science, 35: 225–243.
- Courtin, C.M., Gelders, G.G., Delcour, J.A. 2001. Use of Two Endoxylanases with Different Substrate Selectivity for Understanding Arabinoxylan Functionality in Wheat Flour Breadmaking. Cereal Chemistry. 78(5):564–571.
- Gallardo Román, O. 2007. Caracterización de Nuevas Xilanasas Bacterianas. Ingeniería de Enzimas con la Xilanasas XynB de "Paenibacillus barcinonensis". Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Haros. M., Rosell, C., Benedito, C. 2002. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. European Food Research and Technology 215: 425–430
- Jiménez López, M.T. 1999. Participación de los carbohidratos (amiláceos y pentosanas) en los mecanismos físico-químicos implicados en la alteración del pan y su relación con las alternativas tecnológicas para prolongar la vida de conservación. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Lebesi, D.M., Tzia, C. 2012. Use of endoxylanase treated cereal brans for development of dietary fiber enriched cakes Innovate. Food Science & Emerging Technologies, 13: 207–214.
- Polizeli, M. L. T. M. A., Rizzatti, C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. 67: 577–591.

- Pollet, A., Delcour, J.A., Courtin, C.M. 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(3): 176-191
- Sanz Penella, J.M., Collar, C., Haros, M. 2008. Effect of wheat bran and enzyme addition on dough functional performance and phytic acid levels in bread. *Journal of Cereal Science* 48: 715–721.
- Sudha, M.L., Baskaran, V., Leelavathi, K. 2007. Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*, 104: 686–692.
- Van Craeyveld, V., Dornez, E., Holopainen, U., Selinheimo, E., Poutanen, K., Delcour, J. A., Courtin, C.M. 2010. Wheat Bran AX Properties and Choice of Xylanase Affect Enzymic Production of Wheat Bran-Derived Arabinoxylan-Oligosaccharides. *Cereal Chemistry* 87: 283-291.
- Wong, K.K., Tan, T.U., Saddler, J N. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Reviews*. 52(3): 305–317.
- Zhang, D., Moore, W.R. 1997. Effect of wheat bran particle size on dough rheological properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74: 490–496.