

UN PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO HORNEADO SIN ADICIÓN DE AZÚCAR

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto horneado elaborado sin adición de azúcar, que todavía tiene una intensidad de dulzor adecuada y un buen sabor. El producto horneado tiene un contenido muy bajo de fructosa y, por lo tanto, puede ser adecuado para su uso también en seres humanos intolerantes a la fructosa. El producto horneado se obtiene mediante un proceso enzimático de dos pasos que consiste en un primer paso de obtener azúcar a partir de almidón, apta para un proceso de fermentación, seguido de un segundo paso de hidrólisis enzimática de polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos, en particular para formar principalmente glucosa y maltosa. El nuevo proceso permite además una fermentación optimizada y/o abreviada de la masa en el primer paso. El tiempo de fermentación más corto es ventajoso ya que reduce el tiempo total que lleva la producción del producto horneado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Debido a los problemas de salud, el consumo de azúcar se ha vuelto muy importante en la agenda de salud. De este modo, dentro de la UE, existe el objetivo de reducir los azúcares agregados en un mínimo de 10% para 2020 en diferentes aplicaciones alimentarias. En los últimos años se han desarrollado muchos ingredientes de sustitución del azúcar para evitar la adición de azúcar a los alimentos, incluidos los edulcorantes artificiales (polioles), los edulcorantes naturales (inulina, oligofructosa), que son hidrolizados principalmente por ácidos o enzimas.

Además de los problemas de salud, existe un interés general en mantener el contenido de azúcar agregada al producto horneado lo más bajo posible. Las razones incluyen reducir el precio de costo del producto horneado, evitar el impacto de las fluctuaciones en el precio del azúcar, obtener la posibilidad de reducir la cantidad de sal añadida, etc. Además, existe un creciente escepticismo general contra los aditivos sintéticos o percibidos como no naturales en el grupo de consumidores.

Ya se conocen productos horneados con un contenido reducido o sin azúcar agregada:

El documento WO 2016/005452 (Purac Biochem BV) describe productos formados a partir de masa que comprende una amiloglucosidasa térmicamente estable y una amiloglucosidasa que degrada el almidón crudo y/o una amilasa que evita el envejecimiento, que puede ser una amilasa maltogénica. Se afirma que el nivel de azúcar agregada incluido en la masa se puede reducir sustancialmente, e incluso eliminarse, al mismo tiempo que se consigue un producto dulce.

El documento WO 91/01088 (Kama Danish Pastry A/S) describe un método para preparar una masa de levadura congelada, en donde la masa se prepara a partir de harina, agua, levadura y una o más amilasas y posiblemente otros ingredientes de masa convencionales.

El documento WO 2013/028071 (CSM Nederland BV) describe el uso de una mezcla de enzimas antienvjecimiento que consta de una amilasa maltogénica y una amiloglucosidasa.

El documento CN 101461392 se refiere a un pan sin azúcar elaborado con alto contenido de gluten de trigo, bajo contenido de gluten de trigo, mantequilla anhidra, agente modificador sin azúcar, leche en polvo sin azúcar, mejorador para pan, levadura, huevo. Puede contener una alfa-amilasa fúngica.

El documento WO 2019/238423 (Novozymes A/S) describe un método para producir una masa con una cantidad reducida de azúcar que comprende añadir una alfa-amilasa que degrada el almidón crudo (amilasa GH13_1), una glucoamilasa y una alfa-amilasa a los ingredientes de la masa.

El documento US 2018/0177202 (blareau et al.) describe un mejorador para panificación que comprende exoamilasa maltogénica, amiloglucosidasa, alfa-amilasa y xilanasa. Sin embargo, no se dan detalles sobre las propiedades de las enzimas.

Aun así, ninguno de los procesos demostrados en el arte previo i) muestra que sea posible reducir significativamente el tiempo de fermentación y ii) da como resultado un producto horneado que sea tan palpable como un producto horneado tradicional que se ha horneado con azúcar agregada y que tiene un bajo contenido de monosacáridos o disacáridos individuales y un bajo contenido total de monosacáridos y disacáridos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Proceso para producir un producto de acuerdo con la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la elaboración de un producto horneado sin azúcar agregada, en donde el proceso comprende

- i) mezclar harina con un contenido de almidón dañado de al menos 5% p/p, en un rango de 7% a 9% en peso con una alfa-amilasa termolábil; una composición que contiene una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica; una levadura; agua y opcionalmente otros ingredientes comunes para preparar una masa, para obtener una masa,
- ii) fermentar la masa,
- iii) hornear la masa a una temperatura en un rango de 180 a 250° C.

La presente invención también se refiere a un proceso para producir un producto horneado sin azúcar agregada, en donde el proceso comprende

- i) mezclar harina con un contenido de almidón dañado de al menos 5% p/p, en un rango de 7% a 9% en peso con una alfa-amilasa termolábil; una composición que contiene una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica; una levadura; agua y opcionalmente otros ingredientes comunes para preparar una masa, para obtener una masa,
- ii) fermentar la masa,
- iii) pre-hornear la masa en un grado de 70% a 85%, por ejemplo, 80% a una temperatura en un rango de 180 a 250° C.

La presente invención también se refiere a un proceso para producir un producto sin hornear sin azúcar agregada. En tales casos, el consumidor comprará el producto sin hornear en forma congelada y se encargará de la cocción final. De este modo, el proceso comprende

- i) mezclar harina con un contenido de almidón dañado de al menos 5% p/p, en un rango de 7% a 9% en peso con una alfa-amilasa termolábil; una composición que contiene una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica; una levadura; agua y opcionalmente otros ingredientes comunes para preparar una masa, para obtener una masa,
- ii) fermentar la masa,
- iii) dar forma a la masa en un producto sin hornear,

- iv) congelar el producto sin hornear a una temperatura en un rango de -35° C - -45° C durante un período de tiempo de aproximadamente 15 min. a aproximadamente 30 min. seguido de congelación a aproximadamente -18° C, y
- v) opcionalmente, pre-hornear u hornear el producto congelado sin hornear a una temperatura en un rango de 180 a 250° C.

En aspectos de la invención, el paso de pre-hornear está incluido en el proceso. En otros aspectos, también el paso de hornear está incluido en el proceso.

De este modo, en su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a un proceso para elaborar un producto sin azúcares agregados, en donde el proceso comprende

- i) mezclar harina con un contenido de almidón dañado de al menos 5% p/p, en un rango de 7% a 9% en peso con una alfa-amilasa termolábil; una composición que contiene una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica; una levadura; agua y opcionalmente otros ingredientes comunes para preparar una masa, para obtener una masa,
- ii) fermentar la masa,
- iii) opcionalmente, moldear la masa en la forma deseada,
- iv) opcionalmente, congelar el producto sin hornear a una temperatura en un rango de -35° C - -45° C por un período de tiempo de aproximadamente 15 min. a aproximadamente 30 min. seguido de congelación a aproximadamente -18° C, y
- v) Opcionalmente, pre-hornear u hornear la masa moldeada opcionalmente a una temperatura en un rango de 180 a 250° C.

En aspectos de la invención, se incluyen los pasos i), ii) y v), donde el paso v) es un paso de hornear (el producto final es un producto horneado).

En aspectos de la invención, se incluyen los pasos i), ii) y v), donde el paso v) es un paso de pre-hornear (el producto final es un producto pre-horneado).

En aspectos de la invención, se incluyen los pasos i), ii) y v), donde el paso v) es un paso de pre-hornear seguido del paso iv) (el producto final es un producto pre-horneado congelado).

En otros aspectos de la invención, se incluyen los pasos i), ii), iii) y v), donde el paso v) es un paso de hornear (el producto final es un producto moldeado horneado).

En otros aspectos de la invención, se incluyen los pasos i) y iv) (el producto final es un producto sin fermentar, congelado, sin hornear).

En otros aspectos de la invención, se incluyen los pasos i), iii) y iv) (el producto final es un producto sin fermentar, congelado, moldeado y sin hornear).

En otros aspectos de la invención, se incluyen los pasos i), ii) y iv) (el producto final es un producto sin fermentar, congelado, sin hornear).

En otros aspectos de la invención, se incluyen los pasos i), ii), iii) y iv) (el producto final es un producto fermentado, moldeado, congelado, sin hornear).

La presente invención también se refiere a los productos obtenidos por los procesos descritos anteriormente.

Las características importantes de un proceso de acuerdo con la invención son a) la ausencia de adición de azúcar y b) el uso de un proceso enzimático de dos pasos.

En el presente contexto, los términos “sin adición de azúcar” y “sin azúcar agregada” significan que ninguno de los ingredientes utilizados en la producción de un producto horneado de acuerdo con la presente invención es un azúcar en forma de monosacárido como, por ejemplo, glucosa, fructosa o un disacárido como, por ejemplo, maltosa o sacarosa, es decir, no hay adición externa de azúcar en el proceso de horneado. Otros ingredientes, como la harina, pueden contener oligosacáridos o polisacáridos que se pueden degradar enzimáticamente a monosacáridos o disacáridos y pueden contener una cantidad menor de un monosacárido o disacárido, como alrededor del 1-2% en peso de, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa y rafinosa. Sin embargo, un perito en el arte sabrá que las cantidades de mono-, di-, oligo- y polisacáridos en una harina pueden variar dependiendo de la harina particular utilizada.

Uno de los desafíos para evitar añadir azúcar a la masa es cómo obtener una fermentación suficiente y optimizada de la masa. La fermentación de la masa se obtiene normalmente mediante un proceso de fermentación en donde los organismos de levadura consumen azúcar en la masa y producen etanol y dióxido de carbono como productos de desecho. El dióxido de carbono forma burbujas en la masa y la expande (fermentación).

Cuando no se añade azúcar a la masa como en un proceso de la invención, se debe aplicar otro mecanismo. Para ello, es importante que la harina contenga una cierta cantidad de almidón dañado. El almidón dañado se refiere a la porción del almidón del grano que se ha roto o fragmentado físicamente durante la molienda. Se cree que el almidón dañado tiene una fuerte influencia en la masa y el proceso de horneado. En el presente proceso, el almidón dañado es un sustrato adecuado para que la alfa-amilasa proporcione las moléculas de azúcar necesarias que se requieren para el proceso de fermentación por parte de la levadura. Se prevé que la alfa-amilasa (muy probablemente con alguna contribución de la combinación de amiloglucosidasa y amilasa maltogénica) produzca relativamente rápido los azúcares necesarios y en una cantidad suficiente para obtener una fermentación rápida. Se supone que los azúcares formados se consumen aproximadamente al mismo tiempo que se forman. Esto está respaldado por la observación realizada por los inventores de que el tiempo de fermentación se reduce para la masa sin azúcar agregada en comparación con la masa con azúcar agregada.

Las Figuras 1A y 1B muestran que el paso de fermentación se controla con levadura o con tiempo de fermentación, o ambos. El gráfico superior de ambas figuras corresponde a un producto sin azúcar agregada. Los demás gráficos se refieren a productos con un 7% de azúcar agregada. Para obtener, por ejemplo, una altura de fermentación de 3,5 cm, el tiempo de prueba se puede reducir desde 40 minutos hasta 20 minutos, por lo tanto, en general, una reducción de 50% en el tiempo de fermentación. Además, la elección y el contenido de la levadura pueden controlar la fase y el volumen de la fermentación. En los ejemplos se ha utilizado levadura estándar danesa (levadura Malteser). En general, se obtiene una reducción del tiempo de fermentación de 25 a 30%. Los detalles experimentales se dan en el Ejemplo 4.

Otra observación realizada por los inventores es que parece como si la presencia de la combinación de amiloglucosidasa y amilasa maltogénica también tuviera un impacto en este primer paso enzimático, ya que la liberación de azúcares parece ser más rápida cuando las tres enzimas están presentes en comparación con la presencia de alfa-amilasa sola. De este modo, en este primer paso, tanto la amiloglucosidasa como la amilasa maltogénica pueden contribuir a la liberación de azúcar, incluso si tienen una actividad relativa más baja a la temperatura de fermentación en comparación con la actividad relativa a temperaturas más altas (por ejemplo, a unos 60° C). Como se ve en la Figura 7, las tres enzimas (amilasa termolábil, amiloglucosidasa termoestable y amilasa maltogénica) contribuyen a la

fermentación de la masa. Esta observación apoya la hipótesis del inventor de que incluso si la amiloglucosidasa utilizada es termoestable, tiene alguna actividad a la temperatura de fermentación, que normalmente está en un rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 40° C. Lo mismo se aplica a la amilasa maltogénica.

Un escenario previsto podría ser que la amilasa maltogénica contribuya a la liberación de maltosa del almidón y que parte de la maltosa liberada del almidón por la acción de la alfa-amilasa y (quizás) por la acción de la amilasa maltogénica se degrade aún más a glucosa por la acción de la amiloglucosidasa presente en la combinación.

Otro desafío a la hora de evitar la adición de azúcar a la masa es cómo obtener un producto horneado que sea agradable al paladar. Con este fin, el sabor, el olor, el aroma, la consistencia, etc. del producto horneado influyen en si un consumidor encuentra apetecible el producto horneado. Como se ve a partir de los ejemplos de este documento, ha sido posible obtener productos horneados apetecibles sin añadir azúcar a la masa. Como se demuestra en los ejemplos del presente documento, el proceso de la invención conduce a productos horneados con un bajo contenido de monosacáridos y disacáridos. De este modo, incluso si el contenido de azúcar es bajo, el producto horneado es apetecible. La concentración total de monosacáridos y disacáridos (medidos como fructosa, glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa) es como máximo del 10% p/p del producto horneado, y la concentración de azúcar individual es:

Fructosa: como máximo 1% p/p, en particular 0,7% p/p o menos,

Glucosa: como máximo 4,5% p/p, en particular 4,1 o menos,

Lactosa: como máximo 0,1% p/p, en particular no detectable,

Maltosa: como máximo 5,5% p/p, en particular 5,2 % o menos,

Sacarosa: como máximo 0,1% p/p, en particular no detectable,

La concentración de azúcar individual se basa en el peso total del producto horneado.

La presente invención también se refiere a productos horneados con los contenidos de azúcares mencionados anteriormente. Los productos horneados con bajo contenido de azúcares son de gran relevancia para muchos consumidores. Según una encuesta reciente, 60% de los consumidores, tanto en Europa como en Estados Unidos, informaron que están tratando de reducir su consumo de azúcar.

Cóctel de tres enzimas

Como se mencionó anteriormente, en un proceso de la presente invención se usa un cóctel de tres enzimas. A continuación se proporcionan detalles sobre las enzimas, incluida la actividad de las enzimas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las actividades indicadas se miden en sistemas *in vitro* en condiciones estandarizadas (temperatura, pH, humedad, etc.). La actividad de una enzima depende de las condiciones en las que está presente la enzima. Por tanto, la actividad en una masa y durante el horneado puede diferir de las actividades *in vitro* dadas aquí.

La *alfa-amilasa* utilizada (EC 3.2.1.1) es una enzima que hidroliza la degradación de los enlaces alfa-1,4-glucosídicos en oligosacáridos o polisacáridos como el almidón para producir maltosa, pero no actúa sobre la maltosa en sí. En el proceso se forman oligosacáridos intermedios como las dextrinas. La alfa-amilasa es una endoglucosidasa que escinde un enlace glucosídico interno en un oligosacárido o polisacárido.

La alfa-amilasa puede ser una alfa-amilasa de origen fúngico o bacteriano. Se prefiere una alfa-amilasa de origen fúngico. El origen fúngico puede ser de *Aspergillus*, como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachii*. Ejemplos de composiciones comercialmente disponibles que comprenden alfa-amilasas son FUNGAMYL™, incluidos Fungamyl 4000 SG y Fungamyl Prime BAN® (todos de Novozymes, Dinamarca), MYCOLASE®, Bakezyme P180, Bakezyme P500 (DSM, Gist Brocades), Grindamyl A 1000, Grindamyl A 5000, Grindamyl A 10000, Grindamyl A 14000 (de IFF/Dupont) y Veron M4 /de AB Enzymes). Las alfa-amilasas de origen bacteriano adecuadas para su uso en la presente invención incluyen Biobake 2500 (Kerry Ingredients), BAN 800 MG (Novozymes), Bakezymes AN 301 (DSM) y Grindamyl Max life (IFF/Dupont).

Especialmente adecuada para su uso en la presente invención es una alfa-amilasa que es una alfa-amilasa fúngica, es decir, una endo-amilasa que hidroliza enlaces (1,4)-alfa-D-glucosídicos en polisacáridos de almidón, y la alfa-amilasa fúngica se obtiene de *Aspergillus oryzae*.

Las alfa-amilasas se utilizan normalmente en el pan, entre otras cosas, para mejorar el color café de la cuajada, para garantizar una estructura de miga fina y uniforme y/o para aumentar el volumen del pan. Sin embargo, en la presente invención, una característica importante de la alfa-amilasa es su capacidad para

degradar el almidón para proporcionar monosacáridos y disacáridos para su uso en el proceso de fermentación de la levadura.

Como se desprende de los ejemplos del presente documento, una alfa-amilasa adecuada para su uso en la presente invención está contenida en el producto comercial Fungamyl® 4000 SG de Novozymes, Copenhague. También se han probado otras alfa-amilasas y se han encontrado adecuadas para su uso. Estas incluyen las enzimas Fungamyl de Novozymes, Grindamyl de IFF/Dupont, Bakezyme de DSM y Veron M4 de AB Enzymes.

Fungamyl® 4000 SG contiene alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*. Tiene una actividad de 4000 FAU-F/g. De acuerdo con una ficha técnica de Novozymes, la enzima es de color amarillo a café claro y aparece como un granulado con un tamaño de partícula de aprox. 50-212 micras; tiene una densidad aprox. de 0,6 g/ml.; es fácilmente soluble en agua en todas las concentraciones que se presentan en el uso normal. Otras alfa-amilasas que tienen las mismas características, o características que se desvían como máximo un 10% de las características mencionadas anteriormente, se contemplan como adecuadas para su uso en la presente invención; fx: una característica es la actividad, que puede estar dentro de un rango de 3600 a 4400 FAU-F/g; el tamaño de partícula puede ser de 45 a 233 micras y la densidad puede ser de 0,54 a 0,66 g/ml. FAU-F es una medida de la actividad enzimática. FAU se refiere a la unidad de alfa-amilasa fúngica, es decir, la cantidad de enzima que descompone 5,26 g de almidón por hora conforme al método estándar de Novozymes para la determinación de alfa-amilasa. Las pruebas de actividad de la alfa-amilasa son bien conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, la prueba descrita en Sigma Aldrich, o en Bernfeld, P. (1955) *Methods in Enzymology* 1, 149-158. Se publican métodos adicionales en *Enzymology*, y la selección y aplicación de los métodos forman parte de las capacidades de un perito en el arte.

La alfa-amilasa tiene una actividad en un rango de 30 a 65° C (actividad relativa al menos 40% de la actividad máxima) y alrededor de 100% de actividad relativa a una temperatura de 50 a 55° C. Asimismo, tiene una actividad óptima a un pH en un rango de 3,5 a 7,3 (más de 30% de actividad relativa) y aproximadamente 100% de actividad relativa a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,3. A temperaturas de aprox. 60-65° C, la actividad disminuye y a aprox. 75° C, las enzimas se inactivan al 100%. La alfa-amilasa se comienza a inactivar rápidamente a temperaturas superiores a aproximadamente 55° C, es decir, antes de que el almidón se gelatinice (a aproximadamente 60° C) y se cree que tiene poca o

ninguna actividad inicial durante el horneado a aproximadamente 60 a aproximadamente 100° C. Por lo tanto, se cree que la alfa-amilasa no contribuye (o contribuye muy poco) al contenido final de azúcar en el producto horneado.

El producto comercial, Fungamyl® 4000 SG, contiene aproximadamente 59% p/p de alfa-amilasa CAS Nro. 900-90-2 (que se define como concentración de enzima en base a materia seca), aproximadamente 14% p/p de harina de trigo CAS Nro. 130498 -22-5, aproximadamente 10% p/p de almidón de trigo CAS Nro. 9005-25-8, aprox. 10% p/p de agua CAS Nro. 7732-18-15 y aproximadamente 7% p/p de dextrina CAS Nro. 9004-53-9.

Cuando se emplea Fungamyl® 4000 SG, normalmente se usa en una cantidad en un rango de alrededor de 5 a alrededor de 15 ppm/kg de harina, por ejemplo, en un rango de alrededor de 6 a alrededor de 12 ppm/kg de harina o en un rango de alrededor de 7 a alrededor de 10 ppm/kg de harina, por ejemplo, alrededor de 8 ppm/kg de harina. Si se utiliza otra alfa-amilasa, un perito en el arte sabrá cómo calcular una cantidad adecuada en función de las actividades dadas para Fungamyl® 4000 SG y la otra alfa-amilasa utilizada.

Conforme se usa en el presente documento para alfa-amilasa como Fungamyl®, se aplica lo siguiente:

5 ppm $\approx$ 20 Fau

7 ppm $\approx$ 28 Fau

10 ppm $\approx$ 40 Fau

12 ppm $\approx$ 48 Fau

15 ppm $\approx$ 60 Fau

Una alfa-amilasa termolábil se usa normalmente en una cantidad correspondiente a un rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 48 Fau/kg de harina, por ejemplo, de aproximadamente 28 a aproximadamente 40 Fau/kg de harina.

Otros productos comerciales pueden contener la misma alfa-amilasa u otra alfa-amilasa adecuada para su uso en la presente invención. También se contempla que dichos productos sean adecuados para su uso en la presente invención.

En comparación con el producto Fungamyl® 4000 SG, una composición de alfa-amilasa adecuada puede ser una composición en donde puede haber una variación en el contenido de harina (se puede usar otra harina que no sea de trigo), puede haber una variación en la concentración de harina (se puede usar otra

concentración diferente al 90% en peso), etc. Por lo tanto, una composición que comprende una alfa-amilasa adecuada para su uso en la presente invención puede comprender:

Alfa-amilasa en un rango de concentración de 50 a 70% p/p.

Harina en un rango de concentración de 10 a 25% p/p.

Almidón en un rango de concentración de 5 a 15% p/p,

Agua en un rango de concentración de 0,5 -2% p/p.

Dextrina en un rango de concentración de 4 a 12% p/p.

Las composiciones dadas anteriormente son solo ejemplos de composiciones adecuadas. También pueden ser adecuadas otras composiciones siempre que contengan una alfa-amilasa adecuada para el presente uso. En general, dichas composiciones contienen uno o más ingredientes que hacen que la enzima sea estable para el almacenamiento o que permiten una fácil manipulación de las enzimas. Una composición adecuada puede estar en forma sólida o puede estar en forma líquida.

Cantidades menores de oligoelementos del proceso de producción pueden estar presentes en una composición. Normalmente, no está presente más de un pequeño porcentaje como máximo.

La *glucoamilasa* (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3), también denominada amiloglucosidasa, es una enzima que cataliza la liberación de beta-D-glucosa de los extremos no reductores del almidón u oligo- y polisacáridos.

Se cree que la intensidad del dulzor de la glucosa que se obtiene en el producto horneado final proviene principalmente de la acción de la amiloglucosidasa y su capacidad para liberar glucosa. Además, se cree que participa en la reacción de Maillard produciendo una corteza dorada más rica del producto horneado.

Una amiloglucosidasa para usar en la combinación enzimática para su uso en la presente invención es una enzima que tiene actividad óptima a aproximadamente 60-65° C y que casi no tiene actividad a temperaturas superiores a 75° C. Tiene aproximadamente 50% de actividad relativa a una temperatura de aproximadamente 40 a aproximadamente 75° C, midiéndose la actividad a pH 5,0 después de un tiempo de incubación de 30 minutos a la temperatura relevante.

Las amiloglucosidasas se utilizan normalmente en la industria de la panificación para obtener más color.

Como se desprende de los ejemplos del presente documento, una amiloglucosidasa adecuada es GoldCrust 3300BG de Novozymes, Dinamarca. Otras amiloglucosidasas adecuadas son Grindamyl AG 1500C, FD48, plussweet G (todas de IFF/Dupont), Bakezyme AG 800 y Bakezyme AG 1100 (ambas de DSM) y AMG 1100 BG (de Novozymes).

Gold Crust 3300BG se deriva de *Aspergillus niger*. La actividad de la enzima se expresa en unidades de amiloglucosidasa/g (AGU/g medida en condiciones de reacción pH = 4,3, temperatura 37° C y un tiempo de incubación de 6 minutos . La actividad de la enzima se determina en función de la liberación de glucosa y se calcula en relación con un estándar de enzima (ESFA Journal, 16 (10), octubre de 2018 – <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5450>).

Cuando se emplea Gold Crust® 3300BG, normalmente se usa en una cantidad en un rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 ppm/kg de harina, por ejemplo, en un rango de aproximadamente 150 a aproximadamente 400 ppm/kg de harina o en un rango de alrededor de 175 a alrededor de 400 ppm/kg de harina, por ejemplo, de alrededor de 200 o 400 ppm/kg de harina. Si se utiliza otra amiloglucosidasa, un perito en el arte sabrá cómo calcular una cantidad adecuada en función de las actividades dadas para Gold Crust® 3300BG y la otra amiloglucosidasa utilizada.

Conforme se usa en el presente documento para una amiloglucosidasa termoestable como Gold Crust®, se aplica lo siguiente:

150 ppm ≈ 495 AGU

175 ppm ≈ 578 AGU

200 ppm ≈ 660 AGU

400 ppm ≈ 1320 AGU

500 ppm ≈ 1650 AGU

Una amiloglucosidasa termoestable se usa normalmente en una cantidad correspondiente a un rango de aproximadamente 578 a aproximadamente 1650 AGU/kg de harina, por ejemplo, de aproximadamente 660 a aproximadamente 1650 AGU/kg de harina.

La composición dada anteriormente es sólo un ejemplo de una composición adecuada. También pueden ser adecuadas otras composiciones siempre que contengan una alfa-amilasa adecuada para el presente uso. En general, dichas

composiciones contienen uno o más ingredientes que hacen que la enzima sea estable para el almacenamiento o que permiten una fácil manipulación de las enzimas. Una composición adecuada puede estar en forma sólida o líquida.

Una *amilasa maltogénica* (EC 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar almidón, amilosa y amilopectina a maltosa. Se puede producir una amilasa maltogénica a partir de bacterias como *Bacillus subtilis* (Novamyl® 10000 BG) o *Bacillus stearothermophilus*. La enzima usada en los Ejemplos del presente documento es de *Bacillus subtilis*.

Las amilasas maltogénicas se utilizan normalmente en la industria de la panificación para mejorar la suavidad.

La corteza del pan se forma a través de la reacción de Maillard, que es una reacción química entre los azúcares y los aminoácidos que se produce a altas temperaturas. Los aminoácidos son abundantes en la harina y no son un factor limitante, mientras que se cree que el contenido de azúcar es un factor limitante.

Como se demuestra en los ejemplos del presente documento, la amilasa maltogénica contenida en el producto comercial Novamyl® 10000 BG ha demostrado ser adecuada en el presente contexto. Otras amilasas maltogénicas adecuadas son Grindamyl Max life P100, U4, E50, Powerfresh 8100, Powerfresh 3000, Powerfresh 9740, Powerfresh 9450, Powerfresh 9460, Powerfresh 7001, Powerfresh 7002 (todas de IFF/Dupont), Novamyl 3D, Sensea BG, Novamyl Rye, Novamyl Pro 80 BG y Novamyl Ro 12 BG (todas de Novozymes), Bakemaster Master, Bakemaster Fresh XL, Bakemaster Man 10000, Bakemaster Alpha (todas de DSM), Veron 1000, Veron AC, Veron BA, Veron Sort+, Veron ELS y Amylofresh (todas de AB Enzymes).

Novamyl® 10000 BG contiene una amilasa maltogénica que se obtiene de *Bacillus subtilis*. Tiene una actividad de 10000 MANU/g. Aparece como un polvo de color café claro en forma de un granulado que fluye libremente y que genera poca cantidad de polvo, con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 50-212 micras. Tiene una densidad aproximada de 0,6% g/ml. Es fácilmente soluble en agua en todas las concentraciones que ocurren en el uso normal. Otras amilasas maltogénicas que tienen las mismas características, o características que se desvían como máximo en un 10% de las características mencionadas anteriormente, se contemplan como adecuadas para su uso en la presente invención; por ejemplo: una característica es la actividad, que puede estar dentro

de un rango de 9000 a 11000 MANU/g; el tamaño de partícula puede ser de 45 a 233 micras y la densidad puede ser de 0,54 a 0,66 g/ml.

MANU se refiere a Unidades de Novo de Amilasa Maltogénica. Una MANU se define como la cantidad de enzimas que produce 1 μ mol de glucosa por minuto utilizando maltotriosa como sustrato en condiciones de reacción: pH = 5,0, temperatura = 37° C, tiempo de incubación = 30 minutos . La hidrólisis enzimática de la maltotriosa da como resultado la liberación de glucosa, que se puede determinar cuantitativamente mediante un ensayo de hexoquinasa (EFSA Journal, 16 (5), mayo de 2018 - <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5171>).

La amilasa maltogénica tiene una actividad óptima en un rango de 50 a 75° C (actividad relativa de al menos 80%) y alrededor de 100% de actividad relativa a una temperatura de 57 a 65° C y un pH de 5,5. Asimismo, tiene una actividad óptima a un pH en un rango de 3,5 a 7,0 (más de 30% de actividad relativa) y aproximadamente 100% de actividad relativa a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0. El efecto de la temperatura sobre la actividad de la amilasa maltogénica. La amilasa maltogénica se incubó a diferentes temperaturas durante 30 minutos a pH 5,5 utilizando maltotriosa como sustrato.

El producto comercial, Novamyl® 10000 BG, contiene aproximadamente 90% en peso de harina de trigo, CAS Nro. 130498-22-5, 5% en peso de cloruro de sodio CAS NI. 7647-14-5, 4% en peso de amilasa maltogénica (que se define como concentración de enzima en base a materia seca) CAS Nro. 160611-47-2 y 1% en peso de agua CAS Nro. 7732-18-5. Para más detalles, se hace referencia a la ficha técnica emitida por Novozymes y válida desde 2017-08-24. Otros productos comerciales pueden contener la misma amilasa maltogénica u otra amilasa maltogénica adecuada para su uso en la presente invención. También se contempla que dichos productos sean adecuados para su uso en la presente invención. En comparación con Novamyl® 10000 BG, una composición de amilasa maltogénica adecuada puede ser una composición en donde hay una variación en el contenido de harina (se puede usar otra harina que no sea de trigo), también puede haber una variación en la concentración de harina (se puede usar otra concentración que no sea 90% en peso), etc. Por lo tanto, una composición que comprende una amilasa maltogénica adecuada para su uso en la presente invención puede comprender:

Harina en un rango de concentración de 80 a 95% p/p,

NaCl en un rango de concentración de 2 a 10% p/p

Amilasa maltogénica en un rango de concentración de 2 a 10% p/p

Agua en un rango de concentración de 0,5 -2% p/p.

Cantidades menores de oligoelementos del proceso de producción pueden estar presentes en una composición.

Cuando se emplea Novamyl® 10000 BG, normalmente se usa en una cantidad en un rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 ppm/kg de harina, por ejemplo, en un rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 ppm/kg de harina o en un rango de alrededor de 125 a alrededor de 200 ppm/kg de harina, por ejemplo, de alrededor de 150 ppm/kg de harina. Si se utiliza otra amilasa maltogénica, un perito en el arte sabrá cómo calcular una cantidad adecuada en función de las actividades proporcionadas para Novamyl® 10000 BG y la otra amilasa maltogénica utilizada.

Conforme se usa en el presente documento para una amilasa maltogénica tal como Novamyl - amiloglucosidasa estable tal como Gold Crust®, se aplica lo siguiente:

50 ppm ≈ 500 Manu

100 ppm ≈ 1000 Manu

125 ppm ≈ 1250 Manu

150 ppm ≈ 1500 Manu

250 ppm ≈ 2500 Manu

300 ppm ≈ 3000 Manu

400 ppm ≈ 4000 Manu

Una amilasa maltogénica se usa normalmente en una cantidad correspondiente a un rango de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500 Manu/kg de harina, por ejemplo, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 2500 Manu/kg de harina.

Las composiciones dadas anteriormente son solo ejemplos de composiciones adecuadas. También pueden ser adecuadas otras composiciones siempre que contengan una alfa-amilasa adecuada para el presente uso. En general, dichas composiciones contienen uno o más ingredientes que hacen que la enzima sea estable para el almacenamiento o que permiten una fácil manipulación de las enzimas. Una composición adecuada puede estar en forma sólida o puede estar en forma líquida.

Las enzimas también imparten otras propiedades beneficiosas al producto final. Por lo tanto, como se puede observar en los ejemplos de este documento, el producto final tiene excelentes propiedades con respecto al color de la corteza, la forma del producto, la uniformidad, el tamaño de las celdas, la pared de las celdas, la forma de las celdas y el color de la miga.

La masa también puede contener otras enzimas como alfa-amilasas termoestables, lipasas, xilanasas, etc. Sin embargo, estas enzimas no contribuyen al contenido de azúcar en el producto final ni al tiempo de fermentación observado.

Ingredientes en la masa

La harina utilizada en el presente proceso puede ser de cualquier origen, siempre que contenga la cantidad necesaria de almidón dañado. La harina puede ser harina de trigo, harina de trigo integral, harina tratada térmicamente, harina de repostería, harina de centeno, centeno tamizado, harina de avena, harina de cebada, harina de triticale (pan), harina de arroz, harina de maíz, harina de papa, harina tratada térmicamente, harina blanqueada o mezclas de las mismas, y/o puede incluir almidón de tapioca, almidón de maíz, almidón de papa, etc.

Como se demuestra en los ejemplos del presente documento, una harina adecuada para su uso en la presente invención es la harina de trigo. La harina de trigo puede ser cualquier harina de trigo adecuada, por ejemplo, una o más seleccionadas del grupo que consiste en harina para todo uso, harina para pan, harina alemana tipo 550, harina Reform, harina Manitoba, harina de trigo duro, harina de trigo a base de tipos de trigo blando o de trigo duro, Emmer, harinas de espelta y repostería, otras harinas de trigo disponibles en el mercado y combinaciones de las mismas.

En términos generales, hay cuatro tipos de harina de trigo. La harina blanca está hecha solo de endospermo del grano de trigo. La harina integral incluye parte del germen y el salvado de los granos, mientras que la harina de grano integral se elabora con el grano entero, incluido el salvado, el endospermo y el germen. La harina de germen se elabora a partir del endospermo y el germen, excluyendo el salvado. Los cuatro tipos son adecuados para su uso en la presente invención.

Como se mencionó anteriormente, la harina utilizada debe tener un cierto contenido de almidón dañado. En la presente invención, un contenido de al menos 5% p/p (basado en el peso total de la harina). Generalmente, el contenido de almidón dañado es como máximo de 20% p/p. Por lo tanto, un contenido adecuado de almidón dañado está en un rango de 5 a 20% p/p o 6% p/p o más, 7% p/p o más, 8% p/p o más, 9% p/p o más, 10% p/p o más, 11% p/p o más o 12% p/p o más. En

los ejemplos del presente documento, se usa harina, en donde el contenido de almidón dañado es de 5 a 12%, en particular de 7 a 9% p/p (basado en el peso total de harina). Si se usa harina en combinación con almidón, el contenido total de almidón dañado es como se describe anteriormente.

También se pueden usar varios almidones como complemento de la harina.

Una levadura adecuada para su uso en la presente invención es cualquier levadura utilizada convencionalmente en panadería con levadura. Las levaduras adecuadas incluyen levadura seca, levadura estable en azúcar y levadura normal. Una levadura especialmente adecuada es *Saccharomyces cerevisiae*. En los ejemplos del presente documento, se ha utilizado levadura estándar danesa (levadura Malteser).

Si es necesario, el pH de la masa se ajusta a un pH en un rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, por ejemplo, de aproximadamente 4,5 a 5, mediante la adición de uno o más agentes de ajuste del pH. El ajuste del pH se puede realizar para garantizar la actividad deseada de las enzimas.

La masa también puede comprender otros ingredientes comúnmente utilizados en una masa. Estos ingredientes normalmente se mezclan con los demás ingredientes durante la preparación de la masa. Los aditivos adecuados incluyen uno o más de los siguientes:

emulsionantes, fibras (tales como maltodextrinas, polidextrosa, inulinas, etc.), triglicéridos, grasas, aditivos para ajustar el pH, aditivos para ajustar la fermentación, agentes de manteca, fortalecedores de masa, mejoradores de harina, otras enzimas, incluidas las enzimas que fortalecen la masa; enzimas oxidantes, hemicelulosa, lipasa, proteasa, combinaciones de las mismas, ácido ascórbico, cloruro de sodio, agente conservante, agente químico de salida y otros ingredientes comúnmente utilizados en productos horneados.

La mezcla se puede realizar con cualquier método adecuado, incluido un sistema mezclador continuo, una mezcladora en espiral o una mezcladora de horquilla.

Después de mezclar todos los ingredientes, la masa obtenida se deja fermentar en condiciones adecuadas. Como se mencionó anteriormente, el tiempo de fermentación se reduce notablemente en comparación con las masas que tienen azúcar agregada. El tiempo de fermentación se puede reducir en un 30%, por ejemplo, un 40% o incluso un 50%. La fermentación se lleva a cabo normalmente a temperaturas ligeramente elevadas en comparación con la temperatura

ambiente. La temperatura está normalmente en un rango de alrededor de 20 a alrededor de 40° C, en particular de alrededor de 25 a alrededor de 35° C o de alrededor de 25 a alrededor de 30° C y a una humedad relativa en un rango de 75-90% HR.

La masa también se puede obtener mediante otros métodos como masa esponja, masa directa, masa pre-fermento, esponja líquida, CBP (proceso de pan de Chorleywood), fermentación larga o tecnología de congelación. Una masa esponja es un proceso de elaboración de pan de dos pasos. En el primer paso se forma una masa esponja y se deja fermentar durante un tiempo, y en un segundo paso se añade la masa esponja a los ingredientes de la masa final. Una masa directa es un proceso de una sola mezcla para hacer pan. La masa está hecha de todos los ingredientes, y se colocan juntos y se combinan en una sesión de amasado o mezcla seguida de fermentación. El proceso CBP (proceso de pan de Chorleywood) permite el uso de trigos bajos en proteína y reduce el tiempo de procesamiento. La masa también se puede preparar por pasos. Tal manera gradual podría incluir un paso previo para ablandar la masa seguido de la adición de las enzimas y la fermentación de la masa. En general, las enzimas no se añaden en el paso previo, pero podría haber situaciones en que la inclusión de una o más de las enzimas sea beneficiosa para el resultado final del producto final.

La masa que se obtiene después del mezclado y la masa que se obtiene después de la fermentación también son objeto de la presente invención.

Un objeto de la presente invención es también la propia masa. De este modo, los objetos de la presente invención son:

- i) una masa antes de la fermentación y que se congela principalmente para retrasar la fermentación (masa sin fermentar),
- ii) una masa congelada, opcionalmente moldeada, es decir, una masa después de la fermentación y opcionalmente moldeada en la forma deseada seguido de congelación y congelación estable (masa pre-fermentada)
- iii) un producto pre-horneado, es decir, la masa se fermenta, se le da la forma deseada y se pre-hornea en un 70-85%,
- iv) un producto horneado, es decir, la masa se fermenta, se le da la forma deseada y se hornea.

También se utilizan las siguientes notaciones: i) descongelar y servir (listo para comer después de descongelar), ii) descongelar y hornear (pre-horneado), iii) masa

pre-fermentada (del congelador al horno) y iv) masa cruda (se debe fermentar y hornear)

De este modo, los productos pre-cocidos también son objeto de la presente invención, es decir, masas fermentadas que han sido horneadas hasta cierto punto, pero el producto necesita un horneado adicional antes de la ingesta del mismo (productos pre-horneados).

La masa de la presente invención contiene harina con un contenido de almidón dañado en un rango de 5% p/p o más (basado en el contenido total de harina), por ejemplo, de 5 a 10% p/p, de 6 a 10% p/p o de 7 a 9% p/p, una alfa-amilasa termolábil y una composición que contiene una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica; una levadura; agua, y opcionalmente otros ingredientes comunes para preparar una masa. La masa no contiene azúcar agregada. El contenido de harina dañada se describe anteriormente. En algunos casos, la masa también puede contener una o más fibras como maltodextrina o inulina. El contenido de las enzimas se ha descrito anteriormente en este documento.

Antes o después de la fermentación, se puede moldear la masa en la forma deseada. Puede estar sujeto a congelación, lo que normalmente implica un paso de pre-congelación a una temperatura de aproximadamente -35 a -45, por ejemplo, aproximadamente -38° C, durante un período de tiempo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 minutos, por ejemplo, aproximadamente de 15 a 30 minutos seguidos de una congelación estable a unos -18° C. El producto congelado se puede descongelar antes de hornearse o colocarse directamente en un horno para hornearse.

El paso de congelación normalmente se lleva a cabo cuando el producto se vende como un producto pre-fermentado o sin fermentar, es decir, el consumidor debe hornear el producto por sí mismo. Para el producto sin fermentar, los consumidores deben fermentar y hornear el producto ellos mismos.

La masa puede estar congelada de modo que el consumidor solo necesite hornear la masa para obtener el producto horneado. De este modo, la presente invención también se refiere a la masa que se obtiene después de la fermentación y en donde la masa ha sido congelada. Cuando la masa congelada se hornea, da como resultado un producto horneado como se describe a continuación. La congelación de la masa se usa normalmente para masas laminadas.

El producto fermentado se hornea o de otro modo se manipula para obtener el producto final. El horneado se lleva a cabo normalmente a una temperatura en un rango de aproximadamente 150 a 280° C o de aproximadamente 180 a 250° C, y la temperatura central del producto es de 60 a 100° C, de 70 a 100° C, de 90 a 100° C o de 95 a 100° C. En lugar de hornear, la masa se puede someter a vapor y, por lo tanto, el producto se obtiene como un pan al vapor. La cocción al vapor se lleva a cabo normalmente a una temperatura de unos 100° C, pero la temperatura central del producto es la misma que si se hubiera empleado el horneado. La masa también se puede someter a fermentación seguido de cocción y horneado. Por lo tanto, el paso de horneado puede ser reemplazado por un paso de cocción al vapor.

Al comienzo del proceso de cocción, la temperatura de la masa es cercana a la temperatura ambiente y, a medida que la temperatura de la masa asciende cuando se coloca en el horno, la alfa-amilasa se volverá inactiva (o mucho menos activa) y la levadura se inactivará. Durante este proceso, la combinación de la amiloglucosidasa y la amilasa maltogénica está activa. Mientras que el primer paso enzimático proporcionó azúcar como alimento para la levadura, este segundo paso proporciona azúcar al producto horneado para que el consumidor lo encuentre apetecible, sabroso, con un sabor y una textura agradables y distintivos. Por lo tanto, todas las enzimas no están activas (o igualmente activas) a las temperaturas a las que se llevan a cabo la mezcla y la fermentación. No todos los azúcares que se pueden producir en condiciones óptimas para todas las enzimas presentes se producen durante la mezcla y la fermentación ya que, si este fuera el caso, todo el contenido de azúcar o la mayor parte podría ser utilizado por la levadura, sin dejar un contenido de azúcar particular en el producto horneado final. En consecuencia, la alfa-amilasa y las dos enzimas en la combinación de amiloglucosidasa y amilasa maltogénica tienen diferentes patrones de actividad a diferentes temperaturas.

El horneado da como resultado un producto horneado. Dicho producto tiene un contenido total de monosacáridos y disacáridos superior al de los ingredientes que componen la masa. Además, como se puede observar a partir de los Ejemplos de este documento, se obtienen un panecillo más suave y croissants más crujientes.

Producto horneado

La invención también se refiere a un producto horneado que comprende

- i) fructosa en una concentración de aproximadamente 2,6% como máximo, por ejemplo, 2,0% como máximo o 1% como máximo en peso (en los tipos de

pan ejemplificados: 0,7, 0,6, 0,6%), por ejemplo, no más de 0,8% en peso, no más de aproximadamente 0,7% en peso.

- ii) glucosa en una concentración de 4,5% como máximo en peso, por ejemplo 4,3% como máximo en peso, 4,2% como máximo en peso o 4,1% como máximo en peso. La glucosa puede estar presente en un rango de concentración de alrededor de 3,5 a alrededor de 4,5% en peso (en los tipos de pan ejemplificados: (3,8, 4,1, 3,7%),
- iii) lactosa en una concentración de 0,5% como máximo en peso, o 0,4% como máximo en peso, 0,3% como máximo en peso, 0,2% como máximo en peso o 0,1% como máximo en peso (en todos los tipos de pan ejemplificados la concentración fue 0,1% o menos (no detectable)),
- iv) maltosa en una concentración de 5,5% como máximo en peso, 5,4% como máximo en peso, 5,3% como máximo en peso, o en un rango de concentración de 2,5 a 5,5% en peso (en los tipos de pan ejemplificados: 4,3, 5,2, 3,2),
- v) sacarosa en una concentración de 0,5% como máximo en peso, o 0,4% como máximo en peso, 0,3% como máximo en peso, 0,2% como máximo en peso o 0,1% como máximo en peso (en todos los tipos de pan ejemplificados: 0,1% o menos (no detectable)),

en donde la concentración se basa en el peso total del producto horneado.

En particular, la concentración total de monosacáridos y disacáridos (medidos como fructosa, glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa) es de 10% como máximo p/p, en un rango de 7,5 a 10% p/p basado en el peso total del producto horneado.

Por lo general, las concentraciones de los azúcares individuales son:

Fructosa: 1% como máximo p/p, en particular 0,7% p/p o menos, por ejemplo, 0,4% - 0,6%,

Glucosa: 4,5% como máximo p/p, en particular 4,1 o menos, por ejemplo, 1,7% a 3,7%,

Lactosa: 0,1% como máximo p/p, en particular no detectable,

Maltosa: 5,5% como máximo p/p, en particular 5,2% o menos, por ejemplo, nivel 2,9% - 3,6%,

Sacarosa: 0,1% como máximo p/p, en particular no detectable,

y la concentración se basa en el peso total del producto horneado.

Se aplica cualquier combinación de las concentraciones mencionadas para el contenido de los azúcares individuales en los párrafos anteriores y está dentro del alcance de la presente solicitud. Por lo tanto, el producto horneado puede obtener:

0,7% en peso de fructosa,

4,5% en peso de glucosa,

0,1% como máximo de lactosa,

2,9% de maltosa, y

0,5% como máximo en peso de sacarosa.

Como se observa en las Figuras 3, 4 y 6, la concentración de los azúcares individuales también se puede basar en la cantidad total de azúcar en el producto horneado. Sobre la base del contenido total de azúcares en el producto (en particular, el contenido de fructosa, glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa), el contenido de los azúcares individuales puede ser:

Fructosa: 10% como máximo en peso, o 9% como máximo en peso, 8% como máximo en peso o 7% como máximo en peso;

Glucosa: 50% como máximo en peso, o 49% como máximo en peso, 48% como máximo en peso, 45% como máximo en peso, o en un rango de 25 a 50% en peso, por ejemplo alrededor de 35% como máximo en peso, o alrededor de 33% como máximo en peso, alrededor de 32% como máximo en peso, alrededor de 31% como máximo en peso, o alrededor de 30% como máximo en peso;

Lactosa: alrededor de 5% como máximo en peso, por ejemplo alrededor de 4% como máximo en peso, alrededor de 3% como máximo en peso, alrededor de 2% como máximo en peso o alrededor de 1% como máximo en peso;

Maltosa: aproximadamente 70% como máximo en peso, por ejemplo, aproximadamente 65% como máximo en peso, aproximadamente 60% como máximo en peso, o en un rango de aproximadamente 35 a 70%, por ejemplo, 55% como máximo en peso, 50% como máximo en peso, 45% como máximo en peso, 44% como máximo en peso, aproximadamente 43% como máximo en peso o aproximadamente 42% como máximo en peso.

Como se menciona anteriormente en este documento, se aplica cualquier combinación del contenido de los azúcares individuales en los párrafos anteriores y está dentro del alcance de la presente solicitud.

Un producto horneado de acuerdo con la invención se puede obtener mediante un proceso como se describe en este documento.

Un producto horneado de acuerdo con la invención puede estar en forma de pan de hamburguesa, pan de sándwich, pan integral, pan, muffins, pretzels, panecillos, tortillas, pizza, bagels (roquillas), pitas, ciabattas, sin gluten, foccacias, baguettes, hogazas, sándwiches, gofres, panqueques, masa laminada, croissants, hojaldre, galletas y bollos, etc.

Cuando el paso de horneado es al vapor, un producto horneado de acuerdo con la invención puede ser un pan al vapor.

Un producto horneado de acuerdo con la presente invención o que se obtiene mediante un proceso de acuerdo con la presente invención puede ser consumido por seres humanos que padecen intolerancia a la fructosa. La intolerancia a la fructosa puede ser intolerancia hereditaria a la fructosa (IHF), que es un error congénito del metabolismo de la fructosa causado por una deficiencia de la enzima aldolasa B. Si se ingiere fructosa, el bloqueo enzimático de la aldolasa B provoca una acumulación de fructosa-1-fosfato, que, con el tiempo, da como resultado la muerte de las células hepáticas. Los síntomas de la IHF incluyen vómitos, convulsiones, irritabilidad, hipoglucemia, hemorragia y posible insuficiencia renal.

Combinación sinérgica de enzimas

La invención también se refiere a una combinación sinérgica de una alfa-amilasa termolábil, una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica, combinación que, cuando se usa en un proceso para producir un producto horneado sin adición de azúcar, da como resultado un producto horneado que contiene 1% p/p o menos de fructosa, en particular 0,7% p/p o menos, basándose el peso en el peso del producto horneado. Como se describe en este documento, se contempla obtener un efecto sinérgico de las enzimas presentes en la masa en el primer paso enzimático. Por tanto, se prevé que no sólo la alfa-amilasa sea la encargada de aportar azúcar a la levadura para consumir durante la fermentación, sino que también pueda haber una contribución de la combinación de amiloglucosidasa y amilasa maltogénica, de tal forma que la amilasa maltogénica, aunque no muy activa a temperatura ambiente y de fermentación, contribuya a la liberación de maltosa, y que la amiloglucosidasa contribuya a la liberación de glucosa, por ejemplo, de maltosa.

Además, en aquellos casos en que se desee añadir una cantidad de azúcar, pero en una cantidad reducida respecto a la que se utiliza normalmente, es posible

sustituir parte del azúcar por el cóctel de enzimas de acuerdo con la invención. Además, la sustitución de una cantidad de azúcar agregada a una masa mediante un cóctel de enzimas de la invención da como resultado una masa y un producto horneado tan buenos como el producto sin ninguna reducción en el contenido de azúcar. Por lo tanto, el cóctel de enzimas de la presente invención también se puede utilizar en situaciones en las que el objetivo no es “sin azúcar agregada”, sino en que el objetivo es una reducción del azúcar agregada.

La combinación sinérgica se utiliza en un proceso de acuerdo con la invención para obtener un producto horneado de acuerdo con la invención.

La combinación sinérgica normalmente comprende la alfa-amilasa termolábil, el amiloglucósido termoestable y la amilasa maltogénica en proporciones correspondientes a

De 20 a 48 Fau o de 28 a 40 Fau de la alfa-amilasa termolábil,

De 578 a 1650 Agu o de 660 a 1650 Agu de la amiloglucosidasa termoestable, y

De 500 a 2500 Manu o de 1000 a 2500 Manu de la amilasa maltogénica.

Por tanto, a modo de ejemplo, si se pretende utilizar 1 g de la combinación sinérgica/kg de harina, entonces 1 g de la combinación debe contener de 20 a 48 Fau o de 28 a 40 Fau de la alfa-amilasa termolábil, de 578 a 1650 Agu o de 660 a 1650 Agu de la amiloglucosidasa termoestable, y de 500 a 2500 Manu o de 100 a 2500 Manu de la amilasa maltogénica.

Asimismo, si se pretende utilizar 10 g de la combinación sinérgica/kg de harina, entonces 10 g de la combinación deben contener de 20 a 48 Fau o de 28 a 40 Fau de la alfa-amilasa termolábil, de 578 a 1650 Agu o de 660 a 1650 Agu de la amiloglucosidasa termoestable, y de 500 a 2500 Manu o de 100 a 2500 Manu de la amilasa maltogénica.

La composición de la combinación sinérgica se puede adaptar a usos específicos. Por tanto, por ejemplo, para bollos o tostadas, dicha combinación sinérgica puede contener la alfa-amilasa termolábil, el amiloglucósido termoestable y la amilasa maltogénica en proporciones correspondientes a

De 24 a 48 Fau o de 24 a 40 Fau de la alfa-amilasa termolábil,

De 660 a 1650 Agu o de 660 a 1485 Agu de la amiloglucosidasa termoestable, y

De 500 a 1500 Manu o de 1000 a 1500 Manu de la amilasa maltogénica.

Pre-mezcla

La invención también se refiere a una pre-mezcla de pan o a una pre-mezcla para obtener un producto horneado. La pre-mezcla normalmente contiene harina, la combinación de enzimas como se describe en este documento y, opcionalmente, otros ingredientes como emulsionantes, cloruro de sodio, levadura, fibras, ácido ascórbico, nueces, granos, etc.). La pre-mezcla no contiene azúcar agregada. La harina puede ser harina de granos, por ejemplo, harina de trigo, harina de maíz, harina de centeno, harina de cebada, harina de avena, harina de arroz, sorgo, harina de soja y combinaciones de las mismas. La pre-mezcla puede ser adecuada para obtener pan, bollos, etc. o para obtener productos a base de masa laminada (como, por ejemplo, croissants). Cuando se elabora un producto a partir de la pre-mezcla, se añaden agua y levadura a la pre-mezcla y la masa que se obtiene está lista para fermentar y hornear.

Todos los detalles y particularidades descritos en este documento para un aspecto de la invención se aplican mutatis mutandis a todos los demás aspectos de la invención y viceversa.

Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a continuación para ilustrar la presente invención.

Tienen la intención de ser ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes de ninguna manera.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. La Figura 1A muestra la fermentación de bollos usando el mismo nivel de levadura, pero utilizando dos masas, una de las cuales contiene 7% p/p de azúcar (basado en la cantidad de harina utilizada) y la otra sin azúcar agregada, en lugar de ser preparado de acuerdo con la presente invención. Los resultados muestran claramente una fermentación más rápida de la masa de acuerdo con la presente invención en comparación con la masa que contiene azúcar agregada.

La Figura 1B muestra el impacto de diferentes niveles de levadura en el tiempo de fermentación. Se observa que se puede obtener casi el mismo tiempo de fermentación con menos levadura usando un proceso de la invención en comparación con una masa que contiene 7% p/p de azúcar agregada.

La Figura 2 muestra el aspecto de dos productos horneados, un producto elaborado con adición de azúcar (marcado con 1) y el otro producto de acuerdo con la

invención (marcado con 2). Ambos productos tienen aspectos aceptables (ver Ejemplo 1).

Las Figuras 3A y B muestran la distribución porcentual de azúcares en pan de molde (Ejemplo 1); 100% corresponde a la cantidad total de azúcares. La Figura 3A muestra los resultados para pan con 3,3% de azúcar agregada y la Figura 3B muestra los resultados para pan sin azúcar agregada.

Las Figuras 4A-C muestran la distribución porcentual de azúcares en pan de trigo (Ejemplo 2); 100% corresponde a la cantidad total de azúcares. La Figura 4A muestra los resultados para pan de trigo con 3% de azúcar agregada; la Figura 4B muestra los resultados para pan de trigo con 5% de azúcar agregada y la Figura 4C muestra los resultados para pan de trigo sin azúcar agregada.

La Figura 5 muestra el aspecto de dos bollos horneados. El producto de la izquierda se obtiene mediante la adición de 14% de azúcar (basado en el contenido de harina) y el de la derecha se obtiene mediante un proceso de acuerdo con la invención. Ambos productos tienen aspectos aceptables (ver Ejemplo 3).

La Figura 6 muestra la distribución porcentual de azúcares en pan de molde (Ejemplo 3); 100% corresponde a la cantidad total de azúcares.

La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos de masa directa y muestra un efecto sinérgico obtenido durante la fermentación mediante el uso de una alfa amilasa termolábil, una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica.

La Figura 8A es un croissant horneado que usa un 7% de azúcar en la masa y la Figura 8B es un croissant horneado de acuerdo con la invención sin azúcar agregada.

La Figura 9 muestra el resultado del Ejemplo 8. Prueba 0 (izquierda), prueba 4 (derecha).

La Figura 10 muestra la altura de las masas tostadas fermentadas en diferentes momentos.

La Figura 11 muestra las imágenes de las masas tostadas fermentadas en diferentes momentos.

La Figura 12 muestra la altura de las masas de bollo fermentadas en diferentes momentos.

La Figura 13 muestra las imágenes de las masas de bollo fermentadas en diferentes momentos.

Las Figuras 14-16 muestran la distribución de azúcares individuales en bollos elaborados con 10% azúcar, 6% azúcar + combinación de enzimas de acuerdo con la invención, 6% azúcar + combinación de enzimas de acuerdo con la invención + 2% maltodextrina, 7% azúcar, y 7% azúcar + combinación de enzimas de acuerdo con la invención + 2% maltodextrina

MATERIALES Y MÉTODOS

Synlab, Malmö, Suecia, realizó los análisis de los productos horneados finales, relacionados con el contenido de azúcares individuales y el contenido de calorías. Es un laboratorio acreditado con Nro. 1008 e ISO/IEC 17025.

Todas las harinas usadas en los ejemplos contienen almidón dañado en una concentración de 7-9% p/p en base al peso total de la harina.

Las enzimas: alfa-amilasa termolábil, amiloglucosidasa termoestable y amilasa maltogénica se utilizan en los ejemplos en cantidades/kg de harina de la siguiente manera: 8 ppm/kg harina de alfa-amilasa termolábil, 200 ppm/kg harina o 400 ppm/kg harina de amiloglucosidasa termoestable y 150 ppm/kg harina de amilasa maltogénica. La actividad de las enzimas utilizadas se puede calcular en base al texto del presente documento con respecto a las enzimas individuales.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Preparación de un producto horneado – pan integral

Se prepararon dos masas (una sin adición de azúcar y otra con adición de azúcar) a partir de los siguientes ingredientes:

	C1 (azúcar agregada; comparación)	C2 (sin azúcar agregada)
	g	g
Harina de trigo	800	800
Trigo blanco*	1200	1200
Masa agria seca	20	20
Levadura	90	90

Cloruro de sodio	30	30
Azúcar	66**	0
Aceite de colza	50	50
Malta oscura	24	24
Mejorador***		20.0
Mejorador II****	20.0	
Agua	1100	1000

*Solo se incluyen en la cantidad granos y copos de trigo, centeno, cebada, avena y maíz

**aproximadamente 3,3% de azúcar en la masa según la cantidad total de harina

*** contiene 8 ppm/kg harina de Fungamyl como alfa-amilasa termolábil, 400 ppm/kg harina de GoldCrust como amiloglucosidasa y 150 ppm de Novamyl como amilasa maltogénica; y 60 ppm/kg harina de Pentopan 500 (mejora la estructura)

**** Mejorador estándar no para liberación de azúcar (contiene 60 ppm/kg harina de Pentopan 500 BG como xilanasa, Fungamyl 800 pmn/kg harina y ácido ascórbico 40 ppm/kg harina)

Todos los ingredientes se mezclaron en un mezclador. Mezclando a baja velocidad por 90 segundos y a alta velocidad por 380 segundos. Se utilizó un mezclador de espiral. A continuación, la masa fermentó durante 50 a 55 minutos a una temperatura de 36° C y una humedad relativa de 78%. Después de la fermentación, la levadura se inactivó a 50 a 55° C y se horneó a 180 a 250° C durante 32 minutos

Los resultados visuales se muestran en la Figura 2, donde 1 indica el producto horneado de la masa 1.1 y 2 indica el producto horneado de la masa 1.2.

Antes de hornear, las dos masas fueron evaluadas en cuanto a pegajosidad, suavidad, extensibilidad, elasticidad y temperatura de la masa. No se encontró ninguna diferencia marcada.

Después de hornear, el pan se evaluó con respecto al color de la corteza, la forma de los productos, la uniformidad, el tamaño de las celdas, la pared de las celdas, la forma de las celdas y el color de la miga. No se encontró ninguna diferencia.

Además, se evaluó el contenido de azúcares individuales con los siguientes resultados:

3,3% azúcar	Resultado g/100g
Fructosa	1,4
Glucosa	0,8
Lactosa	0,1
Maltosa	2,0
Sacarosa	0,1
Suma de azúcar	4,2
Calorías totales Kcal	245
Calorías totales KJ	1036
Sin azúcar	Resultado g/100g
Fructosa	0,6
Glucosa	3,7
Lactosa	0,1
Maltosa	3,2
Sacarosa	0,1
Suma de azúcar	7.5
Calorías totales Kcal	236
Calorías totales KJ	995

La Figura 3 muestra el contenido de azúcares individuales expresado como porcentaje de la cantidad total de azúcar.

Como se puede observar en los resultados anteriores, hay un cambio marcado en el contenido de los azúcares individuales, especialmente en el producto sin azúcar agregada, en comparación con el producto con azúcar agregada, la reducción del bajo contenido de fructosa, el aumento del contenido de glucosa y de maltosa se notan. Además, en este ejemplo se observó una reducción menor en las calorías totales.

EJEMPLO 2 – Preparación de pan de trigo horneado.

Se prepararon tres masas, una con un contenido de azúcar agregada de 3% (B1), una con un contenido de azúcar agregada de 5% (B2) y una sin azúcar agregada (B3). El contenido de azúcar se basa en la cantidad total de harina en la masa. Los ingredientes fueron los siguientes:

Masa N°/ Ingredientes		B1	B2	B3
		3% azúcar	5% azúcar	Sin azúcar
Harina	Gramos	3.000	3000	3.000
Agua	Gramos	1.620	1620	1.680
Levadura	Gramos	90	90	90
Azúcar	Gramos	90	150	
Salt	Gramos	45	45	45
Mejorador I	Gramos	30	30	
Mejorador II*	Gramos			30
Aceite	Gramos	45		45

Mejorador I: Amilasa 8 ppm, Xilanas 50 ppm, Lipasa 30 ppm (xilanas y lipasa imparten estabilidad y estructura al producto final), Novamyl 150 ppm, Asc 40 ppm; todas las ppm son ppm/kg de harina; para la actividad ver el texto en el presente.

Mejorador II: glucoamilasa termoestable 400 ppm, amilasa termolábil 8 ppm, xilanasa 50 ppm, lipasa 30 ppm, Novamyl 150 ppm, ácido ascórbico 40 ppm; todas las ppm son ppm/kg de harina; para la actividad ver el texto en el presente.

Todos los ingredientes se mezclaron durante 4/6 minutos en una mezcladora, la masa se fermentó a 36° C y 78% de humedad relativa durante 50 minutos; luego se inactivó la levadura a 50-55° C, y luego se horneó la masa a una temperatura de 180° C - a 250°C durante 50 minutos.

Después de mezclar los ingredientes, se evaluaron las masas. Todas las masas fueron aceptables. Los resultados fueron los siguientes:

Evaluación de masas después de mezclar		3% de azúcar	5% de azúcar	Sin azúcar agregada
Pegajosidad		5	5	4
Suavidad		5	5	4
Extensibilidad		5	6	4
Elasticidad		5	4	6
masa de temperatura		26,9	26,3	27

En general, agregar azúcar da una consistencia de masa más suave. Sin la adición de azúcar, la masa se vuelve menos suave y estirable. Sin embargo, después de hornear, todos los productos mostraron (buenas propiedades con respecto a los siguientes parámetros.

Continuación se exhiben los parámetros de evaluación, los cuales también aplican a los otros ejemplos en el presente:

Pegajosidad	De 0 a 10	De poca a mucha	5 es control
Suavidad	De 0 a 10	De menos a más	5 es control
Extensibilidad	De 0 a 10	De baja/corta a alta/larga	5 es control
Elasticidad	De 0 a 10	De baja/débil a alto/fuerte	5 es control
Temperatura de masa	De 0 a 10	De baja a alta/fuerte	5 es control

Evaluación de bollos		3% de azúcar	5% de azúcar	Sin azúcar agregada
Evaluación de bollos				
Color de corteza		5	5	5
Forma de productos		5	5	5
Uniformidad		5	5	5
Tamaño de celdas		5	5	5
Pared de celdas		5	5	5
Forma de celdas		5	5	5
Color de miga		5	6	5

Color de corteza	De 0 a 10	De claro a oscuro	5 es control
Forma de producto	De 0 a 10	De baja a alta	5 es control
Estructura de miga	De 0 a 10	De menos a más	5 es control
Uniformidad	De 0 a 10	De menos a más	5 es control
Tamaño de celdas	De 0 a 10	De abierto a bueno/pequeño	5 es control
Pared de celdas	De 0 a 10	De gruesa a delgada	5 es control
Forma de celdas	De 0 a 10	De redonda/profunda a alargada/superficial	5 es control
Color de miga	De 0 a 10	De oscuro a claro	5 es control

Con respecto sabor, se observó una menor intensidad del azúcar en el producto horneado sin ninguna azúcar agregada con respecto al producto en el que se había agregado un 5% de azúcar.

Después de hornear se determinó el contenido de los azúcares individuales. Se obtuvieron los siguientes resultados: los resultados para los azúcares individuales se presentan en g/100 g:

Azúcar	3% de azúcar agregada, B1	5% de azúcar agregada, B2	Sin azúcar agregada, B3
Fructosa	1,3	2,1	0,4
Glucosa	0,6	1,3	1,8
Lactosa	0,1	0,1	0,1
Maltosa	2,9	2,7	3,6
Sacarosa	0,1	0,1	0,1
Suma de azúcar	4,8	6,1	5,8
Total calorías Kcal	258	254	249
Total calorías KJ	1094	1078	1055

La Figura 4 muestra el contenido de azúcares individuales expresado como un porcentaje de la cantidad total de azúcar.

EJEMPLO 3 –Preparación de bollos horneados

Se prepararon dos tipos de bollos. Uno con la adición de 14% de azúcar (A1), y el otro sin ninguna adición de azúcar. Las masas fueron preparadas con los siguientes ingredientes:

Masa Nº/Ingredientes		A1	A2
		14% de azúcar	Sin azúcar
Harina	Gramos	2.000	2000
Agua	Gramos	1.060	1220
Levadura	Gramos	110	60
Azúcar	Gramos	280	
Sal	Gramos	32	32

Mejorador de bollos	Gramos	20	
Mejorador para sin azúcar*	Gramos		20
Aceite	Gramos	100	100

- El mejorador para sin azúcar comprende alfa-amilasa, glucoamilasa y amilasa maltogénica – corresponde a mejorador II en el Ejemplo 2.
- Mejorador de bollos – corresponde a Mejorador I en el Ejemplo 2.
- El Mejorador sin azúcar comprende alfa-amilasa, glucoamilasa y amilasa maltogénica: corresponde al Mejorador II del Ejemplo 2.
- Mejorador de bollos: corresponde al Mejorador I del Ejemplo 2.

Todos los ingredientes fueron mezclados por 60 segundos/420 segundos en una mezcladora; la masa se fermentó a 38° C y 84% de humedad relativa durante 50 minutos. Luego se inactivó la levadura a 50° C, seguida de horneado de la masa a una temperatura de 235° C /230° C durante 12 minutos.

La Figura 5 muestra la apariencia de los bollos horneados.

Después de mezclarse los ingredientes, se evaluaron las masas. Todas las masas resultaron eran aceptables. Los resultados fueron los siguientes:

Evaluación de masas luego de mezclado		14% de azúcar	Sin azúcar agregada
Pegajosidad		5	3
Suavidad		5	3
Extensibilidad		5	4
Elasticidad		5	7
Temperatura de masa		27,2	26,6

La masa con azúcar agregada parece ser más suave y más estirable en comparación con la masa sin azúcar agregada. Sin embargo, estas propiedades no afectan negativamente el procesamiento de la masa.

Después de hornear, la evaluación de los bollos mostró los siguientes resultados:

Evaluación de bollos		14% de azúcar	Sin azúcar agregada
Evaluación de bollos			
Color de corteza		5	4

Forma de producto		5	5
Uniformidad		5	5
Tamaño de celdas		5	4
Pared de celdas		5	4
Forma de celdas		5	5
Color de miga		5	4

Como se puede observar de la tabla de arriba, solo se observaron diferencias menores. Sin adición de azúcar, hubo una tendencia a una (miga más abierta y un color más claro. El sabor sin azúcar agregado es menos intenso con respecto a los bollos con un 14% de azúcar agregada.

La medición del contenido de los azúcares individuales arrojó los siguientes resultados:

14% azúcar	Resultado en g/100g
Fructosa	4,3
Glucosa	3,6
Lactosa	0,1
Maltosa	1,6
Sacarosa	0,1
Suma de azúcar	9,5
Total calorías Kcal	274
Total calorías KJ	1.159

Sin azúcar	Resultado en g/100g
Fructosa	0,5
Glucosa	1,7
Lactosa	0,1

Maltosa	2,9
Sacarosa	0,1
Suma de azúcar	5,1
Total calorías Kcal	256
Total calorías KJ	1.083

La Figura 6 muestra el contenido de azúcares individuales expresado como porcentaje de la cantidad total de azúcar.

Como se puede observar en los resultados de arriba, hay un marcado cambio en el contenido de azúcares individuales, especialmente en el producto sin azúcar agregada en contraste con el producto con azúcar agregada, observándose una reducción en el bajo contenido de fructosa, una disminución en el contenido de glucosa y un aumento en el contenido de maltosa. Más aun, en este ejemplo se observó una reducción de aproximadamente un 10% en las calorías totales.

EJEMPLO 4

Influencia del contenido de azúcar y contenido de levadura en el tiempo de fermentación.

Se prepararon productos en base a los siguientes ingredientes:

Masa N° / Ingredientes		1	2	3
		7% azúcar 3.5% Levadura	Sin azúcar 2.5% Levadura	Sin azúcar 3.5% Levadura
Harina	Gramos	3.000	3.000	3.000
Agua	Gramos	1.689	1.689	1.689

Levadura	Gramos	105	75	105
Azúcar	Gramos	210		
Sal	Gramos	36	36	36
Acido ascórbico I	Ppm/kg	40	40	40
Aceite	Gramos	90	90	90

Enzimas/aditivos

Masa N° / Ingredientes		1	2 and 3
		7% azúcar 3.5% Levadura	Sin azúcar 2.5% Levadura o 3.5% Levadura
Novamyl 10000BG	ppm/kg harina mg/masa	150 450	150 450
Gold crust 3300BG	ppm/kg harina mg/masa		350 1.050
Fungamyl 4000 SG	ppm/kg harina mg/masa	10 30	10 30
Lipoan Etra 1000	ppm/kg harina mg/masa	30 90	30 90
Pentopan 5000 BG	ppm/kg harina mg/masa	60 180	60 180

La masa y el producto horneado fueron preparados en la forma descrita en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 5 – PRUEBAS DE MASA DIRECTA

La masa se preparó con el siguiente ingrediente. La alfa-amilasa termolábil, amiloglucosidasa y amilasa maltogénica testeadas fueron agregadas en cantidades correspondientes a las usadas en el Ejemplo 1 o 2.

Las enzimas testeadas fueron: alfa-amilasa termolábil (Fau), amiloglucosidasa termoestable (Gluco), amilasa maltogénica Manu).

Receta de masa directa para prueba de enzimas:

Harina	100 %
Agua	57 %
Aceite (aceite de colza)	2 %
Levadura	3 %
Sal	1,5
Mejorador I	1 %

Sitio	Bandeja abierta
	600 g masa

Mezcla en mezcladora en espiral	Bajo 60 segundos/ alto 600 segundos
Tiempo de harina	10 min
Pesar Masa	600 g
Fermentación	Para alturas / 50-60 minutos
Horneado	35 minutos con vapor

Los resultados son mostrados en la Figura 7. La figura de la izquierda muestra un efecto sinérgico al combinar cuando se combina alfa-amilasa y amiloglucosidasa, y el volumen después de fermentar aumenta de 3,3 (sin azúcar agregada) a 4,3 (es decir, 30%), o de 3,64 (cuando se agregó a la receta un 3% de azúcar) a 4.3 (es

decir, 18%). El índice de volumen, cuando la masa sin enzimas y sin azúcar es 100, es el siguiente:

Fau/Glu: 130 g/ml

Fau/Manu: 117 g/ml

Gluco/manu: 110 g/ml

3% de azúcar: 110 g/ml

La figura a la derecha muestra que la adición de alfa-amilasa o amiloglucosidasa como enzimas individuales aumenta el volumen después de la fermentación en contraste con masa sin enzimas agregadas y sin azúcar agregada, o con un 3% de azúcar agregada. Al agregar las tres enzimas, se logra el mejor resultado con respecto al volumen. El índice de volumen, cuando la masa sin enzimas y sin azúcar es 100, es el siguiente:

Alfa amilasa: 121 g/ml

Amilasa maltogénica: 97 g/ml

Glucoamilasa: 121 g/ml

Las tres enzimas: 135 g/ml

3% de azúcar: 113 g/ml

Evaluación de masas

Evaluación de masas después de mezclar		Ref- meno s	Fau/G luco	Fau/M anu	Gluco/ Manu	3 % azúca r				
Pegajosidad		5	6	6	6	6				
Suavidad		5	7	7	6	6				
Extensibilidad		5	7	7	7	6				
Elasticidad		5	6	6	6	7				

Evaluación de masa luego de tiempo de harina

Pegajosidad										
Suavidad										
Extensibilidad										
Elasticidad										
Maquiniabilidad										

Parámetros para evaluación de masa											
Pegajosidad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Poca				control					Mucha
Suavidad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Menos				control					Más
Extensibilidad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Baja / Corta				control					Alta/larga

Elasticidad	0	Baja / Débil	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Alta/fuerte
Maquinabilidad	0	Baja	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Alta/fuerte

Como se observa en la tabla anterior, las masas con enzimas son mejores que las masas sin enzimas y con azúcar, y mejores o iguales que masas con 3% de azúcar y sin enzimas.

Evaluación de volumen y miga

Evaluación de Pan			Fau/Gluc	Fau/Manu	Gluc/Manu	3 % azúcar				
Color de Corteza		5	8	7	7	7				
Textura crujiente		5	8	7	7	7				
En reposo		5	7	6	6	6				
Uniformidad		5	6	6	6	6				
Tamaño de celdas		5	5	4	4	5				
Pared de celdas		5	5	4	4	5				
Forma de celdas		5	5	5	5	5				
Color de miga		5	7	7	7	6				

Evaluación de pan Fermentación larga

Color de corteza										
Textura crujiente										
En reposo										
Uniformidad										
Tamaño de celdas										
Pared de celdas										
Forma de celdas										
Color de miga										

Color de corteza	0	Claro	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Oscuro
Textura crujiente	0	Baja	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Alta
En reposo	0	Plana	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Redondo
Estructura de miga	0		1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	
Uniformidad	0	Menos	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Más
Tamaño de celdas	0	Abierto	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Fino/pequeño
Pared de celdas	0	Grotesca	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Delgada
Forma de celdas	0	Redonda/profunda	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Alargada/superficial
Color de miga	0	Oscuro	1	2	3	4	5	control	6	7	8	9	10	Claro

Luego de la cocción, los productos horneados obtenidos de masas con enzimas son mejores que el producto horneado obtenido de masa sin enzimas y con azúcar, y mejores o iguales que los productos horneados obtenidos de masas que con un 3% de azúcar y sin enzimas. Las columnas en la tabla de arriba son las mismas que en la tabla anterior.

EJEMPLO 6 — MASA LAMINADA – CROISSANTS

Los croissants fueron hechos en base a la siguiente receta:

Receta estándar de croissants:

Harina	100 %
Agua	50-55 % %
Levadura	8 % -10 %
Sal	1,9 %
Azúcar	7%-11 %
Mejorador	0,75 %
Mantequilla	25-35 %

Sitio	70g forma de triángulo
-------	------------------------

Mezcladora en espiral	Lento 250 segundos	Alto 290 segundos
Pre-fermentación	1-3 horas	
Fermentación	90 minutos / 28°C/80 rH	
Barniz de huevo batido		
Horneado	18 minutos/180° C	

Los croissants fueron preparados se sin azúcar agregada, pero con contenido de alfa-amilasa termolábil, amiloglucosidasa termoestable y amilasa maltogénica. La Figura 8A (referencia) y Figura 8B (sin azúcar agregada) muestran los resultados de los croissants horneados.

Se prepararon cuatro masas sin azúcar agregada y se compararon con las masas estándar. Todos los productos horneados resultantes de masas sin azúcar agregada presentaron un volumen, estructura, sabor, sabor a azúcar y color tan buenos como o mejores en comparación con los croissants con un contenido de azúcar del 7%.

En una prueba interna de triángulo con 25 participantes, solo un encuestado notó la diferencia.

EJEMPLO 7 – Reducción de azúcar agregada

Este ejemplo muestra que usar la combinación de enzimas reivindicadas en el presente documento también puede reemplazar un 30-40% del azúcar agregada sin pérdida de calidad.

Ingredientes	Prueba 0	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
Harina en Kg	132	132	132	132	132
Azúcar en %	10	6	6	7	7
Azúcar en Kg	13,5	7,92	7,92	9,24	9,24
200 ppm GoldCrust= gramos		26,4	26,4	26,4	26,4
150 ppm Novamyl 10.000 BG=gramos		19,8	19,8	19,8	19,8
Maltodextrinas kg			2,64		2,64
Apariencia externa	Punto de referencia				
Volumen	X	Mismo que Punto de referencia	Menor volumen	Mismo que Punto de referencia	Menor volumen
Forma	X	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia

Color	X	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia
Superficie dispareja	X	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia
Apariencia interna	Punto de referencia				
Resiliencia	X	Muy buena	Buena	Muy buena	Buena
Mordida	X	Mordida corta, pero más suave en boca	Mordida corta, pero más seca que en prueba 1	Mordida corta, pero más suave en boca	Mordida corta, pero más seca que en prueba 1
Suavidad	X	Muy suave	Más suave	Muy suave	Más suave
Uniformidad	X	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia
Estructura de miga	x	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia
Color	X	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia	Mismo que Punto de referencia
Intensidad de azúcar	x	Sin diferencia	Sin diferencia	Sin diferencia	Sin diferencia

Los resultados muestran que la combinación de enzimas de la invención puede reemplazar un 30-40 % del azúcar sin pérdida de calidad; el uso de la combinación de enzimas brinda una mayor suavidad y frescura en comparación con el punto de referencia, y la adición de fibra brinda una mordida (seca) más corta frente al punto

de referencia. La Figura 8 muestra el resultado, de izquierda a derecha: Prueba 0- Prueba 4.

EJEMPLO 8 – Reducción de tiempo de fermentación

Se probaron masas para tostadas y bollos con diferente contenido de azúcar y con o sin el cóctel de enzimas de la invención.

Alturas de fermentación basadas en receta de tostadas:

Alturas de fermentación Harina de proceso	Bola de masa de 50g para fermentar Masa directa (receta de tostadas) Harina Dana de Cerealía	
Ingredientes	%	Gramos
Harina	100	2.000
Agua	56	1.120
Levadura	3,5	70
Azúcar	0%/3%/6%	0/40/100
Aceite	1,5	30
Sal	1,8	36
Datem	0,3	6
Acido ascórbico	40 ppm / kg harina	0,080
Concepto de sin azúcar agregada*	1	20

- Se prepararon dos masas con 0% de azúcar; una de las cuales tenía las tres enzimas agregadas (“concepto de sin azúcar agregada”) mientras que la otra masa con 0% azúcar no contenía la mezcla de enzimas. Proceso de tostadas:

Agregar todos los ingredientes

Mezclar a desarrollo óptimo de la masa

Dividir bola de masa en 50 g

Redondear & moldear masa

Colocar en recipiente de vidrio

Fermentar en 30 minutos / 45 minutos / 60 minutos (36°C / 84 rH)

Las enzimas usadas fueron:

Solución Enzimática

Masa directa	Ppm o gr	Agregar dosis por Kg	Solución que se desea agregar de harina en %
Fungamyl 4000 SG	ppm/kg	8	1
Novamyl 10 000 BG	ppm/kg	150	1
Gold crust 3300 BG	ppm/kg	400	1
Asc	ppm/kg	40	1

Las Figuras 10 y 11 muestran los resultados. Como se puede observar en la Figura. 10, se ve un aumento de un 66% en la altura, después de 30 minutos es de aproximadamente para la masa con las tres enzimas, en comparación con aproximadamente un 33% para las masas que con 3% o 6% de azúcar. Después de 45 minutos, el aumento es de alrededor del 133 % para la masa con las tres enzimas, en comparación con aproximadamente un 80 % para las masas que con un 3 % o un 6 % de azúcar. Después de 60 minutos, el aumento es de aproximadamente un 200% para la masa con las tres enzimas, en comparación con aproximadamente 80%-150% para las masas con 3% o 6% de azúcar. Para obtener el doble de altura respecto al valor inicial, una masa tostada con la combinación de las tres enzimas, de acuerdo con la invención, logrará esta al menos 15 minutos más rápido que la obtenida para masas con 0%, 3%, 6% de azúcar sin la combinación de enzimas.

Alturas de fermentación basadas en receta de bollo:

Alturas de fermentación Harina de Proceso	Bola de masa de 50 g para fermentar Masa directa (receta de bollo) Harina Dana de Cerealía	
Ingredientes	%	<i>gramos</i>

Harina	100	2.000
Agua	56	1.120
Levadura	4,5	90
Azúcar	0% / 7 %/ 14 %	0 /140 / 280
Aceite	5	100
Sal	1,8	36
Datem	0,4	8
Acido ascórbico	60 ppm / kg de harina	0,120
Concepto de sin azúcar agregada *	1	20

- Se prepararon dos masas con 0% de azúcar; una de las cuales tenía las tres enzimas agregadas (“concepto de sin azúcar agregada”) mientras que la otra masa con 0% azúcar no contenía la mezcla de enzimas.

Proceso:

Agregar todos los ingredientes

Mezclar para un desarrollo óptimo de la masa.

Dividir la bola de masa en 50g

Masa para redondear y moldear

Colocar en recipiente de vidrio

Fermentar en 30 minutos/45 minutos/60 minutos (36°C / 84 rH)

Las enzimas usadas fueron ppm/kg de harina:

Solución enzimática

Mejorador de bollos	Ppm o gr	Agregar dosis por Kg	Solución que se desea agregar de harina en %
Fungamyl 4000 SG	ppm/kg	10	1
Novamyl 10 000 BG	ppm/kg	150	1
Gold crust 3300 BG	ppm/kg	450	1

Asc	ppm/kg	60	1
-----	--------	----	---

Las Figuras 12 y 13 muestran los resultados. Como se observa la Figura 12, un aumento de altura después de 30 minutos es de aproximadamente 266% para la masa con las tres enzimas, en comparación con aproximadamente 43%-66% para las masas con 6% o 14% de azúcar. Después de 60 minutos, el aumento es de aproximadamente 200% para la masa con las tres enzimas, en comparación con aproximadamente 66%-133 % para las masas con 6% o 14% de azúcar. Después de 90 minutos, el aumento es de aproximadamente 233% para la masa con las tres enzimas, en comparación con aproximadamente 133%-200% para las masas con 6% o 14% de azúcar. Para obtener el doble de altura con respecto al valor inicial, una masa de bollo con la combinación de las tres enzimas, de acuerdo con la invención, alcanzará esta al menos 15 minutos más rápido que la obtenida para una masa con un 6% o un 14% de azúcar sin la combinación de enzimas.

EJEMPLO 9 – Reducción del contenido de azúcar

Este ejemplo ilustra que es posible reemplazar parte del azúcar con la combinación de enzimas de acuerdo con la invención, y obtener productos con menor contenido de fructosa y mayor contenido de glucosa y maltosa. La adición de maltodextrina en un 2% no cambia marcadamente el contenido de azúcares en comparación con los bollos con la combinación de enzimas.

La receta es la siguiente:

	Prueba 0	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
Kg de harina	132	132	132	132	132
Azúcar en %	10%	6%	6%	7%	7%
Azúcar en kg	13,5	7,92	7,92	9,24	9,24
200 ppm Gold Crust = Gr		26,4	26,4	26,4	26,4
150 ppm Novamyl 10000 BG = Gr		19,8	19,8	19,8	19,8

Maltodextrinas (Kerry) KG			2,64		2,64
------------------------------	--	--	------	--	------

Las masas también contienen 6-8 ppm de alfa amilasa termolábil (Fungamyl).

MODALIDADES ESPECÍFICAS

1. Un proceso para producir un producto horneado sin azúcar agregada, proceso que comprende los pasos de:
 - i) mezclar harina con un contenido de almidón dañado de al menos 5% en peso con una alfa-amilasa termolábil; una composición que contenga una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa maltogénica; una levadura; agua, y, opcionalmente, otros ingredientes corrientes para preparar una masa, para obtener una masa,
 - ii) fermentar la masa
 - iii) hornear la masa a una temperatura en un rango de 180° C a 250° C.
2. Un proceso, de acuerdo con el punto 1, en donde los pasos i) y ii) implican la acción de la alfa-amilasa termolábil sobre los polisacáridos de almidón en la harina para producir azúcar fermentable.
3. Un proceso, de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que el paso iii) implica la acción de la amiloglucosidasa termoestable y la amilasa maltogénica sobre poli-, oligo- y/o disacáridos en la masa para aumentar el contenido de glucosa y maltosa en el producto horneado.
4. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la alfa-amilasa termolábil es activa a una temperatura en el rango de 30°C a aproximadamente 65°C.
5. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la alfa-amilasa termolábil se selecciona de alfa-amilasas fúngicas o alfa-amilasas bacterianas.

6. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la alfa-amilasa es una alfa-amilasa fúngica.
7. Un proceso, de acuerdo con el punto 6, en donde la alfa-amilasa fúngica es una endoamilasa que hidroliza enlaces (1,4)-alfa-D-glucosídicos en polisacáridos de almidón y se obtiene de *Aspergillus oryzae*.
8. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la amilasa maltogénica tiene una óptima actividad en un rango de temperatura de 57°C a 65°C.
9. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la amilasa maltogénica hidroliza enlaces (1,4)-alfa-D-glucosídicos en polisacáridos.
10. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la amilasa maltogénica se selecciona de amilasas producidas por bacterias.
11. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la amilasa maltogénica es producida por *Bacillus subtilis* (Novamyl 10000 BG) o *Bacillus stearothermophilus*.
12. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la amiloglucosidasa termoestable tiene una óptima actividad en un rango de temperatura de 60°C a 65°C.
13. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la amiloglucosidasa termoestable hidroliza enlaces alfa-D-glucosídicos enlazados en 1,4 terminales de maltooligo- y polisacáridos para producir beta-D-glucosa.
14. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la amiloglucosidasa termoestable se deriva de *Aspergillus niger*.

15. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el producto horneado obtenido tiene un contenido máximo de fructosa de 1% en peso.
16. Un proceso, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
17. Un producto horneado que comprende:
- i) fructosa en una concentración máxima de 1% en peso,
 - ii) glucosa en un rango de concentración de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5% en peso,
 - iii) lactosa en una concentración máxima de 0,5% en peso,
 - iv) maltosa en un rango de concentración de 2,5% a 5,5% en peso,
 - v) sacarosa en una concentración máxima de 0,5% en peso,
- en donde la concentración se basa en el peso total del producto horneado.
18. Un producto horneado, de acuerdo con el punto 17, en donde la concentración de fructosa es de 0,4%, 0,7%, 0,6% o 0,6% en peso.
19. Un producto horneado, de acuerdo con el punto 17, en donde la concentración de glucosa está en un rango aproximado de 3,5"%" a alrededor de 4,5% en peso.
20. Un producto horneado, de acuerdo con el punto 7, en donde la concentración de glucosa es de 3,8%, 4,1% o 3,7% en peso.
21. Un producto horneado, de acuerdo con el punto 17, en donde la concentración de lactosa es de 0.1%.
22. Un producto horneado, de acuerdo con el punto 17, en donde la concentración de maltosa está en un rango de aproximadamente 2,9% a aproximadamente 3,6% en peso.
23. Un producto horneado, de acuerdo con el punto 17, en donde la concentración de maltosa es de 4,3%, 5,2% o 3,2% en peso.
24. Un producto horneado, de acuerdo con el punto 17, en donde la concentración de sacarosa es de 0,1% en peso.

25. Un producto horneado que se puede obtener del proceso definido en cualquiera de los puntos 1-14.
26. Un producto horneado, de acuerdo con cualquiera de los puntos 17 a 25, en forma de bollos para hamburguesa, pan par emparedado, pan integral, panini, pan de molde, baguettes, bagels (rosquillas), ciabatta, libre de gluten o de pastelería.
27. Una combinación de una alfa-amilasa, una amiloglucosidasa y una amilasa maltogénica para usar en la producción de un producto horneado sin ninguna adición de monosacáridos o disacáridos durante la producción.