

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 780**

51 Int. Cl.:

A21D 10/00 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12753597 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2747574**

54 Título: **Uso de una mezcla de enzimas de antiendurecimiento en la preparación de pan horneado**

30 Prioridad:

25.08.2011 EP 11178839

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2016

73 Titular/es:

**BAKERY SUPPLIES EUROPE HOLDING B.V.
(100.0%)
Nienoord 13
1112 XE Diemen, NL**

72 Inventor/es:

**ELSE, ANTHONY JAMES;
TRONSMO, KARI MARGRETE;
NIEMANN, LUDGER-ANDREAS y
MOONEN, JOHANNES HUBERTUS ELISE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 583 780 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de una mezcla de enzimas de antiendurecimiento en la preparación de pan horneado

5 Campo técnico de la invención

[0001] La presente invención se refiere a la prevención del endurecimiento del pan horneado. Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de una mezcla enzimática para prevenir tal endurecimiento, donde dicha mezcla enzimática comprende amilasa maltogénica y amiloglicosidasa.

10

Antecedentes de la invención

[0002] El endurecimiento de productos alimenticios horneados (tales como pan) es un problema bien conocido. Endurecimiento, o "enranciamiento" es un proceso químico y físico en alimentos horneados que reduce su palatabilidad.

15

El endurecimiento se vuelve evidente como un aumento de la solidez de la miga, una reducción de la elasticidad o resiliencia de la miga, y cambios en la corteza, que se vuelve dura y correosa.

El aumento en la solidez de la miga, que se considera como el aspecto más importante del endurecimiento, es reconocido por el consumidor mucho antes de que el producto de pan se haya hecho de otro modo inapropiado para el consumo.

20

[0003] El endurecimiento no es, como se cree comúnmente, sencillamente un proceso de sequedad debido a la evaporación de agua.

25

El pan se pondrá rancio aún en un ambiente húmedo y se vicia más rápidamente a temperaturas justo antes de la congelación.

Aunque el mecanismo preciso del endurecimiento sigue siendo desconocido, un mecanismo importante parece ser la migración de la humedad de los gránulos de almidón en los espacios intersticiales, y la realineación de amilosa y moléculas de amilopectina de almidón.

El proceso de la realineación de las moléculas de almidón se llama retrogradación.

30

En la retrogradación, se pueden formar estructuras tipo cristal que son similares a aquellas originalmente presentes en los gránulos de almidón, y el proceso se conoce como recristalización.

La retrogradación normalmente produce pan rancio con una textura de miga más dura y menos elástica.

[0004] El almidón es un constituyente esencial de los productos alimenticios horneados.

35

Durante el proceso de horneado, el almidón se vuelve gelatinizado y absorbe grandes cantidades de agua; mientras tanto la proteína se desnaturaliza.

Inmediatamente después del horneado, el almidón se empieza a retrogradar.

La solidez de la miga aumenta, aunque esto todavía se considera como una ventaja en las primeras horas.

En particular las características de cortabilidad y de mascación de la miga mejoran durante este periodo.

40

[0005] Se supone que la fracción de almidón no ramificado, amilosa, se retrograda primero, seguido de la fracción ramificada del almidón, amilopectina, durante el siguiente almacenamiento.

Al mismo tiempo la miga se vuelve rígida, y con el tiempo cada vez menos elástica y finalmente seca y dura: el pan se ha puesto rancio.

45

Además, la corteza pierde frescura y se vuelve correosa durante el almacenamiento.

Se supone que esto es un resultado de la liberación del agua por la retrogradación y la difusión hacia el exterior de la miga a la corteza.

[0006] Es indiscutible que la reacción clave causal para todos estos fenómenos de endurecimiento es la retrogradación de almidón.

50

Suprimir o circundar este fenómeno es el objeto de numerosos derechos y publicaciones protectores.

[0007] Una estrategia para obstruir, al menos parcialmente, la solidificación considerable de la miga durante el almacenamiento se conoce desde hace tiempo: la miga se ablanda desde el principio.

55

Los medios elegidos para esto son emulsionantes tales como mono/diglicéridos, que se añaden a la masa y producen una estructura de miga que es particularmente blando del principio.

El uso de a-amilasa derivada de hongos tal como *Aspergillus oryzae* tiene un efecto similar.

Actúa sobre partículas de almidón dañadas, reduciendo así la viscosidad de la masa y la producción de azúcares fermentables.

60

A consecuencia, el artículo horneado final tiene un volumen mayor, que es consistente con la miga más blanda.

Aparte del hecho de que el pan fresco es blando, esta estrategia no previene o previene de forma poco adecuada el desarrollo de una consistencia más dura y menos elástica de la miga cuando se pone rancia.

[0008] Otra estrategia es reducir la retrogradación por hidrólisis parcial mediada por enzima de las dos fracciones de almidón durante el horneado.

65

La hidrólisis mediada por enzima de la miga debería preferiblemente ocurrir después de que el almidón haya sido gelatinizado, es decir aproximadamente por encima de 65°C.

A consecuencia la estructura del almidón en el producto horneado es radicalmente alterada, limitando su capacidad para retrogradarse.

5 Los fragmentos producidos por hidrólisis parcial del almidón son demasiado cortos para ser capaces de recrystalizar y asociarse con el almidón de peso molecular alto restante, reduciendo así la velocidad de recrystalización.

Una amilasa maltogénica termoestable de *Bacillus* está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Novamyl 10,000® (producto de Novozymes A/S, Dinamarca) y es muy usada en la industria de panadería como un agente de antiendurecimiento debido a su capacidad para reducir la retrogradación por el almidón de hidrolización a temperatura de gelatinización de almidón (WO 91/04669).

10 Novamyl 10,000® es más activo a 60-70°C. (Christophersen, C., et al., 1997, Starch, vol. 50, No. 1, 3945).

[0009] Puesto que los costes significativos se asocian con el uso de amilasa maltogénica como un agente antiendurecimiento en el pan horneado, existe una necesidad de un agente antiendurecimiento más rentable.

15 Resumen de la invención

[0010] Los inventores han sido capaces de proporcionar un agente antiendurecimiento enzimático para pan horneado que es extremadamente eficaz y que tiene un coste en uso inferior que el de agentes de antiendurecimiento enzimático existentes, sobre todo amilasas maltogénicas termoestables.

20

[0011] Los inventores han descubierto que la eficacia de las amilasas maltogénicas termoestables como agentes de antiendurecimiento se puede mejorar sustancialmente por la combinación de tales amilasas con amiloglucosidasa.

25 [0012] Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere al proceso de preparación de un pan horneado mediante el horneado de una masa farinácea, donde dicho proceso comprende la incorporación en la masa de una combinación de dos o más enzimas incluyendo:

- amilasa maltogénica en una cantidad de 750-75.000 unidades de amilasa maltogénica (MAU) por kg de harina, donde dicha amilasa maltogénica tiene una temperatura óptima por encima de 50°C;
- amiloglucosidasa en una cantidad de 0,01-3,00 unidades de amiloglucosidasa (AGU) por unidad de actividad de MAU.

30

[0013] Otro aspecto de la invención se refiere a un pan horneado que es obtenido por el proceso anteriormente mencionado.

35 [0014] El uso combinado de amilasa maltogénica y amiloglucosidasa es descrito WO 2011/039324.

Esta solicitud de patente internacional describe un método para la preparación de una composición de pan al vapor, que comprende el paso de la fabricación de una masa usada para preparar pan al vapor con una o varias alfa-amilasas maltogénicas, una o varias enzimas de degradación de almidón crudo, y al menos una enzima lipolítica.

40 Los ejemplos 7-10 de WO 2011/039324 describen la preparación de empanar al vapor utilizando una combinación de Opticake™ 50 BG (alfa-amilasa maltogénica) y Trametes™ AMG (enzima de degradación de almidón crudo).

[0015] Además, Gerrard et al. (The Role of Maltodertrins in the Staling of Bread, Journal of Cereal Science 26 (1997) 201-209) describen los resultados de un estudio en el que se investigó el efecto de alfa-amilasa añadida (Novamyl®) y/o niveles muy altos de glucoamilasa adicionada (GA300N; Genencor) en el endurecimiento de pan.

45

[0016] El uso de una combinación de una amiloglucosidasa termoestable y una amilasa estable sin calor en una masa laminada congelada leudada es descrito en US 5,589,207.

Más específicamente, esta patente US enseña a emplear una amilasa fúngica que se vuelve inactiva a la temperatura de 60°C en combinación con una amiloglucosidasa que permanece activa por encima de 60°C.

50 Los ejemplos de la patente describen el uso combinado de la amilasa fúngica MG 35000 Fungamyl® y la amiloglucosidasa AMG 300 MG.

En la Patente US explica que el uso de la amiloglucosidasa termoestable asegura la formación de monosacáridos después de que la actividad de levadura haya dejado de estar disponible de modo que estos monosacáridos pueden participar en las reacciones de coloración de la corteza.

55

Descripción detallada de la invención

[0017] La invención proporciona un proceso de preparar pan horneado mediante el horneado de una masa farinácea, donde dicho proceso comprende la incorporación en la masa de una combinación de dos o más enzimas incluyendo:

- amilasa maltogénica en una cantidad de 750-75,000 unidades de amilasa maltogénica (MAU) por kg de harina, donde dicha amilasa maltogénica tiene una temperatura óptima por encima de 50°C;
- amiloglucosidasa en una cantidad de 0,01-3,0 unidades de amiloglucosidasa (AGU) por unidad de actividad de MAU.

[0018] El término "amilasa maltogénica" como se utiliza en este caso se refiere a una enzima de degradación de almidón con número de clasificación de IUPAC EC 3.2.1.133. (glucano 1,4- α -maltodihidrolasa) que es capaz de hidrolizar maltotriosa de a maltosa y glucosa.

[0019] El término "amiloglucosidasa" como se utiliza en este caso se refiere a otra enzima de degradación de almidón con número de clasificación de IUPAC EC 3.2.1.3.

La amiloglucosidasa (o 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa) no solo corta los enlaces α (1-4)glicosídicos últimos en el extremo no-reducido de amilosa y amilopectina, produciendo glucosa, sino que también corta α (1-6) enlaces glicosídicos.

[0020] Siempre que se hace referencia aquí a la "temperatura óptima" de una enzima lo que se entiende es la temperatura en la que la actividad enzimática es máxima.

Para la amilasa maltogénica la temperatura óptima es adecuadamente determinada a pH 5,0.

Para la amiloglucosidasa la temperatura óptima es adecuadamente determinada a pH 4,2.

[0021] El "pH óptimo" de una enzima es el pH en el que la actividad enzimática es máximo.

El pH óptimo es adecuadamente medido a 60°C.

[0022] Una unidad de actividad de amilasa maltogénica (MAU) es definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un nanomol de maltosa por segundo a una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa por ml de tampón de citrato 0,1 M, pH 5,0 a 37°C.

[0023] Una unidad de actividad de amiloglucosidasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un nanomol de glucosa por segundo a una concentración de 10 mg de sustrato de maltosa por ml de tampón de citrato 0,1 M, pH 5,0 a 37°C.

[0024] El presente método puede emplear adecuadamente diferentes tipos de amiloglucosidasas.

Preferiblemente, la amiloglucosidasa empleada es un polipéptido que se codifica por una secuencia de ADN que se encuentra en una cepa fúngica de *Aspergillus*, *Rhizopus* o *Talaromyces*.

Ejemplos de hongos adecuados incluyen *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae* y *Talaromyces emersonii*.

De la forma más preferible, la amiloglucosidasa empleada conforme a la presente invención es un polipéptido codificado por una secuencia de ADN que se encuentra en una cepa de *Aspergillus niger*.

[0025] La amiloglucosidasa empleada en el presente proceso típicamente tiene un pH óptimo en el rango de 1,5-5,5, especialmente en el rango de 2,0-4,5.

[0026] La amiloglucosidasa es ventajosamente incorporada en la masa en una cantidad de 40-40.000 AGU por kg de harina, más preferiblemente de 80-23.000 AGU por kg de harina.

Expresado de manera diferente, la amiloglucosidasa es preferiblemente incorporada en la masa en una cantidad de 0,05-0,50 AGU por unidad de actividad de MAU, de la forma más preferible en una cantidad de 0,10-0,30 AGU por unidad de actividad de MAU.

[0027] La amilasa maltogénica empleada en el presente proceso preferiblemente tiene una temperatura óptima en el rango de 52-90°C, de la forma más preferible en el rango de 55-85°C.

[0028] El pH óptimo de la amilasa maltogénica preferiblemente se encuentra en el rango de 4,0-7,5, de la forma más preferible en el rango de 4,5-7,0.

[0029] Los inventores descubrieron que el endurecimiento se puede minimizar muy eficazmente aunque la amiloglucosidasa tenga una temperatura óptima que es sustancialmente inferior a la temperatura óptima de la amilasa maltogénica.

Preferiblemente, la temperatura óptima de la amiloglucosidasa es al menos 10°C, más preferiblemente al menos 12°C y de la forma más preferible al menos 14°C inferior a la temperatura óptima de la amilasa maltogénica.

Típicamente, la temperatura óptima de la amiloglucosidasa es inferior a 55°C.

[0030] La amilasa maltogénica empleada conforme a la presente invención es preferiblemente un polipéptido que se codifica por una secuencia de ADN que se encuentra en una cepa de *Bacillus*, de la forma más preferible en una cepa de *Geobacillus. stearothermophilus*.

5 [0031] La amilasa maltogénica es típicamente incorporada en la masa en una cantidad de 1.000-40.000 MAU por kg de harina, de la forma más preferible de 1.500-7.500 MAU por kg de harina.

[0032] Conforme a una forma de realización preferida, la masa de pan empleada en el presente proceso es una masa de harina de centeno/trigo mezclado.

10 Conforme a otra forma de realización preferida, la masa de pan es masa de harina de trigo.

[0033] En el presente proceso la masa farinácea es típicamente preparada por la combinación de harina, agua, levadura, la amilasa maltogénica, la amiloglucosidasa y opcionalmente otros ingredientes de panadería.

15 Además de la amilasa maltogénica y la amiloglucosidasa, el presente proceso puede emplear otras enzimas aptas para uso alimentario, tal como α -amilasa, xilanasa y proteasa.

[0034] La masa farinácea es preferiblemente horneada a más de 180 °C de temperatura, más preferiblemente a una temperatura de más de 200°C.

20 En caso de que la masa sea una masa que contiene levadura, la masa es preferiblemente fermentada antes de hornearla.

[0035] Conforme a una forma de realización particularmente preferida del presente proceso la masa se prepara por la incorporación de un mejorador de pan en la masa, donde dicho mejorador de pan comprende una combinación de dos o más enzimas incluyendo:

- 25
- amilasa maltogénica en una cantidad de 7.500-75.000,000 unidades de amilasa maltogénica (MAU) por kg de sustancia seca, donde dicha amilasa maltogénica tiene una temperatura óptima por encima de 50°C;
 - amiloglucosidasa en una cantidad de 0,01-3,0 unidades de amiloglucosidasa (AGU) por unidad de actividad de MAU.

30 [0036] El mejorador de pan anteriormente mencionado es típicamente empleado en la masa de pan en una concentración de 0,1-10%, especialmente de 0,3-5% en peso de harina.

[0037] Típicamente, la amiloglucosidasa está presente en el mejorador de pan en una cantidad de 100-120.000.000 AGU por kg de sustancia seca, aún más preferiblemente en una cantidad de 500-30.000.000 AGU por kg de sustancia seca y de la forma más preferible de 750-4.000.000 AGU por kg de sustancia seca.

35 [0038] Además de la amilasa maltogénica y la amiloglucosidasa, el mejorador de pan empleado en el presente proceso preferiblemente comprende uno o varios, más preferiblemente dos o más y de la forma más preferible tres o más de los siguientes ingredientes de panadería:

- 40
- emulsionante;
 - aceite de triglicérido o grasa;
 - otras enzimas, sobre todo enzimas seleccionadas de α -amilasas, hemicelulasas, lipasas, proteasas y combinaciones de las mismas;
 - gluten;

45

 - ácido ascórbico;
 - conservantes, por ejemplo, propionato de calcio;
 - agente de levadura de química;
 - harina de cereal.

50 [0039] Típicamente, los ingredientes de panadería anteriormente mencionados juntos representan al menos 50% en peso, más preferiblemente al menos 70% en peso del mejorador de pan.

[0040] El mejorador de pan usado en el presente proceso es preferiblemente un líquido o un producto granulado.

55 Más preferiblemente, el mejorador de pan es un polvo o un granulado que tiene un tamaño de partícula promedio ponderado de masas en el rango de 10-1000 μm , más preferiblemente de 50-800 μm , de la forma más preferible de 100-500 μm .

[0041] Otro aspecto de la invención se refiere a un pan horneado que es obtenido por un proceso tal y como se define aquí con anterioridad.

60 [0042] La invención es posteriormente ilustrada, pero de manera no limitativa, por los ejemplos siguientes.

65

Ejemplos

Ejemplo 1

[0043] Se preparó masa de pan de centeno/trigo basándose en la receta mostrada en la tabla 1 y mezclando los ingredientes en un mezclador Diosna durante 6 min lento, y 2 min rápido.

5

Tabla 1

	% en peso de harina
Harina de centeno tipo 1150	70
Harina de trigo tipo 550	30
Agua	80
Mejorador de pan ¹	2,5
Mejorador ácido ²	2,5
Sal	2,1
Levadura comprimida	1,5
Enzima antiendurecimiento de	0,008 (80 ppm)
¹ WB 24 de CSM Deutschland GmbH	
² Bacsauer R22 de CSM Deutschland GmbH	

[0044] Dos masas diferentes fueron preparadas usando las siguientes enzimas de antiendurecimiento:

Producto I: 80 ppm Novamyl® 10.000 BG: 6.080 MAU por kg harina

Producto II: 60 ppm Novamyl® 10.000 BG: 4.560 MAU por kg harina + 20 ppm Bakezyme® AG 800 BG: 840 AGU por kg harina (ex DSM, Países Bajos)

10

[0045] Las actividades de las preparaciones enzimáticas comerciales anteriormente mencionadas son especificadas en la tabla 2

15

Tabla 2

	Actividad enzimática
Novamyl® 10.000 BG	76.000 MAU/g
Bakezyme® AG 800 BG	42.000 AGU/g

[0046] Después de la mezcla, se dejó reposar la masa durante 30 min a temperatura ambiente.

Después, 1100 g piezas de masa fueron moldeadas, puestas en un molde, y fermentadas durante 50 min a 32°C.

Después de la fermentación, las piezas de masa fueron horneadas 50 min en un horno de pisos.

20

La temperatura de horno fue programada para permanecer a 260°C durante 10 minutos y para luego disminuir linealmente de 260 a 230°C durante los siguientes 40 min.

[0047] Los panes fueron almacenados en una bolsa de polietileno estándar a temperatura ambiente hasta 9 días.

25

[0048] La solidez de miga fue medida por un analizador de textura TA.XT Plus de Stable Micro Systems.

El método usado fue de la siguiente manera: un cilindro de miga de pan fue cortado del centro del pan horneado.

El diámetro del cilindro fue de 45 mm y la longitud fue de 30 mm.

El diámetro de la sonda de medición fue de 50 mm, la velocidad de prueba fue de 2 mM/seg, y la sonda se introdujo en la migaja de pan a 10 mm.

30

La fuerza requerida para hacer esto fue medida en g y dureza iguales.

[0049] Los resultados obtenidos para los dos productos diferentes, basados en 4 réplicas, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Tiempo de almacenamiento	Dureza de la miga (en g)	
	Producto I	Producto II
3 días	1574	1578
4 días	1817	1590
7 días	1905	1692
8 días	1985	1780
9 días	2075	1914

35

Ejemplo 2

[0050] Se preparó masa de trigo basándose en la receta mostrada en la tabla 4 y mediante la mezcla de los ingredientes en un mezclador de espiral Diosna durante 2 min lento, y 6 min rápido.

5

Tabla 4

	% en peso de harina
Harina de trigo tipo 550	100
Agua	58
Levadura comprimida	3,0
Margarina de panadería	3,0
Sal	2,0
Mejorador ácido ¹	1,0
Propionato de calcio	0,15
Enzima de antiendurecimiento	0,005 (50 ppm)
¹ Backsauer R22 de CSM Deutschland GmbH	

[0051] Dos masas diferentes fueron preparadas usando las siguientes enzimas de antiendurecimiento:

Producto I: 50 ppm Novamyl® 10.000 BG

Producto II: 6 ppm Novamyl® 10.000 BG + 7 ppm Bakezyme® AG 800 BG (ex DSM,, Países Bajos)

10

[0052] Después de la mezcla, la masa fue dejada reposar durante 10 minutos.

Después, 550g piezas de masa fueron moldeadas, puestas en un molde, y fermentadas durante 50 min a 32°C.

Después, las piezas de masa fueron horneadas 33 min en un horno de pisos Wachtel a 240 °C.

15

[0053] Los panes fueron almacenados en una bolsa de polietileno estándar a temperatura ambiente hasta 9 días.

[0054] La solidez de la miga fue medida con el mismo método que se describe en el ejemplo 1.

[0055] Los resultados obtenidos para los dos productos diferentes, basados en 4 réplicas, se muestran en la tabla 5.

20

Tabla 5

Tiempo de almacenamiento	Dureza de la miga (en g)	
	Producto I	Producto II
3 días	625	495
4 días	682	574
7 días	756	705
8 días	823	773
9 días	957	856

Ejemplo 3

25

[0056] La actividad de Spezyme GA 300 N (Genencor) fue determinada alrededor de 1994. La actividad medida fue 460 AGU/μl.

30

[0057] Gerrard et al. (The Role of Maltodextrins in the Staling of Bread, Journal of Cereal Science 26 (1997) 201-209) describen un experimento donde amilasa maltogénica (Novamyl®) y glucoamilasa (GA300N; Genencor) fueron añadidas a una masa de pan en una concentración de 0,8 mg por g harina y 20 μl por g harina, respectivamente. Ya que la amilasa maltogénica tiene una actividad de 11,4 MAU por mg, se puede calcular que en este experimento particular se aplicó amilogucosidasa en una cantidad que es muy superior a 3 AGU por unidad de actividad de MAU.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para preparar pan horneado mediante el horneado de una masa farinácea, donde dicho proceso comprende la incorporación en la masa de una combinación de dos o más enzimas incluyendo:
- amilasa maltogénica en una cantidad de 750-75.000 unidades de amilasa maltogénica (MAU) por kg de harina, donde dicha amilasa maltogénica tiene una temperatura óptima por encima de 50°C;
 - amiloglucosidasa en una cantidad de 0,01-3,0 unidades de amiloglucosidasa (AGU) por unidad de actividad de MAU,
- 10 donde la actividad amilasa maltogénica de una unidad de (MAU) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un nanomol de maltosa por segundo a una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa por ml de tampón de citrato 0,1 M, pH 5,0 a 37°C, y donde una unidad de actividad de amiloglucosidasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un nanomol de glucosa por segundo a una concentración de 10 mg de sustrato de maltosa por ml de tampón de citrato 0,1 M, pH 5,0 a 37°C.
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, donde la amiloglucosidasa es un polipéptido que se codifica con una secuencia de ADN que se encuentra en una cepa del hongo *Aspergillus niger*.
- 20 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la amiloglucosidasa tiene un pH óptimo en el rango de 1,5-5,5, preferiblemente de 2,0-4,5.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la amiloglucosidasa se incorpora en la masa en una cantidad de 40-40.000 AGU por kg de harina
- 25 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la amiloglucosidasa se incorpora en la masa en una cantidad de 0,05-0,50 AGU por unidad de actividad de MAU.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la temperatura óptima de la amiloglucosidasa es al menos 10°C inferior a la temperatura óptima de la amilasa maltogénica.
- 30 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la amilasa maltogénica tiene una temperatura óptima en el rango de 55-90°C.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la amilasa maltogénica es un polipéptido que se codifica con una secuencia de ADN que se encuentra en una cepa de *Geobacillus stearothermophilus*.
- 35 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la masa es una masa de harina de centeno/trigo mezclada.
- 40 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la masa se prepara por la combinación de harina, agua, levadura, la amilasa maltogénica, la amiloglucosidasa y opcionalmente otros ingredientes de panadería.
- 45 11. Proceso según la reivindicación 10, donde la masa es fermentada antes de hornearla.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la masa farinácea se hornea a una temperatura de más de 180 °C.
- 50 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la masa es preparada incorporando un mejorador de pan en la masa, donde dicho mejorador de pan comprende una combinación de dos o más enzimas incluyendo:
- amilasa maltogénica en una cantidad de 7.500-75.000.000 unidades de amilasa maltogénica (MAU) por kg de sustancia seca, donde dicha amilasa maltogénica tiene una temperatura óptima por encima de 50°C;
 - amiloglucosidasa en una cantidad de 0,01-3,0 unidades de amiloglucosidasa (AGU) por unidad de actividad de MAU.
- 55 14. Proceso según la reivindicación 13, donde el mejorador de pan es un polvo o un granulado con una dimensión de partícula media ponderada en función de la masa en el margen de 10 a 1.000 µm.
- 60 15. Pan horneado obtenido por un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-14.