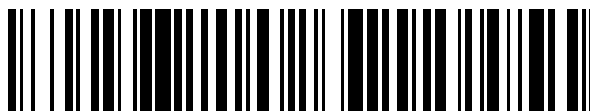


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 766**

51 Int. Cl.:

A21D 6/00 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2016 PCT/EP2016/057687**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16162454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2016 E 16717297 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021 EP 3280264**

54 Título: **Método de preparación de una masa**

30 Prioridad:

10.04.2015 EP 15163227

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

28.09.2021

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

HENNINK, HENK;

STRUBBE, LAMBERTUS GERHARD y

DIRKS, CORNELIUS ANTONIUS MARIA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 856 766 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

Método de preparación de una masa

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de preparación de una masa, en particular a un método de preparación de masa congelada.

Antecedentes de la invención

Para separar la producción y el horneado de masa y las ventas de productos de pan es común congelar los trozos de masa después de que se forme la masa. La masa que tiene una temperatura reducida inferior a 0 °C se denomina en el presente documento "masa congelada". Frecuentemente, la masa se pone en un congelador con una temperatura de aproximadamente -40 °C, de esta forma la temperatura del centro se reduce rápidamente y uniformemente hasta por debajo de -7 °C: este proceso se conoce como congelación rápida.

Después de la congelación rápida, la masa se almacena a una temperatura en un intervalo de -15 a -20 grados Celsius, por ejemplos a -18 a -19 grados Celsius, durante varias semanas o meses, periodo durante el cual puede tener lugar la distribución al sitio de horneado. Alternativamente, la temperatura de la masa se reduce más gradualmente hasta una temperatura reducida en el intervalo de -18 a -20 grados Celsius.

La masa congelada tiene varias ventajas para la industria panificadora, tales como una reducción del trabajo nocturno, mejor flexibilidad en la producción y permitir a las panaderías ofrecer un mayor surtido de panes recién hechos.

La masa congelada se somete a estrés debido a la congelación y frecuentemente muestra un comportamiento diferente en comparación con la masa que se mantiene a una temperatura superior a 0 °C durante todo el proceso de panificación. La masa congelada muestra frecuentemente tiempos de fermentación prolongados después de la descongelación, estabilidad reducida de la masa, volumen reducido del producto horneado, pérdida de forma, estructura de miga gruesa, formación de burbujas, elevado dorado de la corteza e irregular.

Para reducir el efecto negativo de la congelación, se aplican ingredientes especialmente desarrollados y/o seleccionados en la masa congelada. Para optimizar la fuerza del gluten, se usan elevados niveles de ingredientes oxidativos, tales como ácido ascórbico. También se usa comúnmente la enzima glucosa oxidasa (GOX), tal como la glucosa oxidasa de *Aspergillus* comercialmente disponible, en la masa congelada para mejorar la fuerza de la masa, para mejorar el aspecto del producto horneado, el volumen y/o la forma.

El documento de patente US2007/0014891 describe composiciones de masa desarrollada congelada y métodos relacionados. Las composiciones de masa descritas incluyen un ingrediente de levadura, una enzima que facilita la producción de peróxido de hidrógeno en la composición de masa (preferentemente glucosa oxidasa) y agente leudante químico de ácido y base opcional.

También se usa comúnmente xilanasa, tal como la xilanasa de *Aspergillus* comercialmente disponible, en la masa congelada, por ejemplo, para mejorar el volumen de un producto horneado.

El documento de patente EP 493 850 describe masa ultracongelada que comprende xilanasa.

El documento de patente WO 02/24926 describe xilanasas de *Talaromyces* y su uso en el horneado.

Los documentos de patente CN 101 744 181 A y WO 2012/130969 A1 describen el uso de tanto glucosa oxidasa como de xilanasa en masa congelada.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de preparación de una masa, método que comprende:

a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces* a al menos un ingrediente de la masa; y

b) enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto adicional no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la presente divulgación se refiere a una masa que comprende una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, en un aspecto adicional la masa es una masa congelada. En otro aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la presente divulgación también se refiere a un producto horneado, un método de preparación de un producto horneado.

La invención se refiere además al uso de una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se han definido anteriormente, para mejorar las propiedades de una masa que se ha almacenado congelada o un producto horneado preparado a partir de una masa que se ha almacenado congelada.

Descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de aminoácidos de una glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum*. Los aminoácidos 1 a 18 representan la secuencia señal usada para la secreción de la glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum* usada en la invención (aminoácidos 19 - 604).

SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de ADNc que codifica una glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum* representada usada en la invención. Los nucleótidos 1 a 54 codifican la secuencia señal, los nucleótidos 55 a 1816 codifican la glucosa oxidasa madura, que incluye una secuencia de terminación de la traducción (5'-TAAA-3') en el extremo 3'.

SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de aminoácidos de una xilanasa de *Talaromyces emersonii*. Los aminoácidos 1 a 22 representan la secuencia señal usada para la secreción de la xilanasa de *Talaromyces emersonii* usada en la invención (aminoácidos 23-408).

SEQ ID NO: 4 expone la secuencia de ADNc que codifica una xilanasa de *Talaromyces emersonii* representada usada en la invención. Los nucleótidos 1 a 66 codifican la secuencia señal, los nucleótidos 67 a 1227 codifican la xilanasa madura, que incluye una secuencia de terminación de la traducción (5'-TAA-3') en el extremo 3'.

Descripción detallada de la invención

En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender", "incluir" y "tener", y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye", se deben interpretar inclusivamente. Es decir, estas palabras pretenden dar a entender la posible inclusión de otros elementos o números enteros no citados específicamente, cuando el contexto lo permita.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

La presente invención se refiere a un método de mejora de las propiedades de una masa que se ha almacenado congelada y/o de productos horneados preparados a partir de dicha masa.

La presente invención se refiere a un método de mejora de una masa, método que comprende incluir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas de las cuales se definen en las reivindicaciones, en la masa durante la preparación de la masa.

La presente invención se refiere a un método de mejora de productos horneados preparados a partir de una masa que se ha almacenado congelada, método que comprende incluir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, en la masa durante la preparación de la masa.

En una realización del método según la invención, el método es un método de preparación de una masa, método que comprende las etapas:

a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces* a al menos un ingrediente de la masa; y

b) enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto del método según la invención, el método es un método en donde la masa se enfría como una masa no fermentada.

En un aspecto del método según la invención, el método es un método en donde la masa se enfría como una masa previamente fermentada. En este aspecto, la masa se fermenta previamente, y el método incluye fermentar previamente la masa antes de enfriar la masa. Antes de hornear la masa, y así después de la conservación congelada

y la descongelación de la masa, la masa se fermenta al máximo. Normalmente, la fermentación previa es fermentación hasta 30 % del tiempo de fermentación total. La fermentación previa puede durar, por ejemplo, 15 a 30 minutos.

En un aspecto del método según la invención, el método es un método de preparación de una masa, método que comprende las etapas:

- 5 a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasas de *Talaromyces* a al menos un ingrediente de la masa; y
- b) enfriar la masa a una temperatura en el intervalo de -40 a -30 grados Celsius, durante al menos 20 minutos, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasas de *Talaromyces* comprende
- 10 una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto de la etapa b), la masa se enfría a una temperatura en el intervalo de -40 a -30 grados Celsius, durante un periodo de tiempo desde 20 hasta 180 minutos, en un aspecto durante un periodo de tiempo desde 30 hasta 120 minutos, durante un periodo de tiempo desde 40 hasta 100 minutos, durante un periodo de tiempo desde 45 hasta 90 minutos.

En una realización del método según la invención, el método es un método de preparación de una masa congelada, método que comprende:

- a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasas de *Talaromyces* a al menos un ingrediente de la masa; y
- 20 b) enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasas de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.
- 25 En un aspecto del método según la invención, el método es un método de preparación de una masa congelada, método que comprende:
- a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasas de *Talaromyces* a al menos un ingrediente de la masa; y
- 30 b) enfriar la masa a una temperatura en el intervalo de -40 a -30 grados Celsius, durante al menos 20 minutos, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasas de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto de la etapa b), la masa se enfría a una temperatura en el intervalo de -40 a -30 grados Celsius, durante un periodo de tiempo desde 20 hasta 180 minutos, en un aspecto durante un periodo de tiempo desde 30 hasta 120 minutos, durante un periodo de tiempo desde 40 hasta 100 minutos, durante un periodo de tiempo desde 45 hasta 90 minutos.

El enfriamiento de la masa se hace normalmente poniendo la masa en un congelador establecido a una temperatura inferior a 0 °C. Tal como en un congelador establecido a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, en un aspecto en un congelador establecido a una temperatura en el intervalo de -40 a -15 grados Celsius, en un aspecto en un congelador establecido a una temperatura en el intervalo de -40 a -30 grados Celsius.

Una masa congelada se define en el presente documento como una masa que tiene una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius. En un aspecto, la masa congelada tiene una temperatura en el intervalo de -35 a -5 grados Celsius. En un aspecto, la masa congelada tiene una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius. En un aspecto, la temperatura de la masa se mide sobre la superficie de la masa usando, por ejemplo, un termómetro de infrarrojos. Si la temperatura de la superficie de la masa se determina como una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, la masa se denomina una masa congelada. Normalmente, una masa de aproximadamente 500 gramos que se ha puesto en un congelador establecido a -40 grados Celsius durante 90 minutos tiene una temperatura del centro inferior a -7 grados Celsius. El almacenamiento de la masa congelada puede ser entonces a una temperatura de, por ejemplo, -18 grados Celsius, por ejemplo en un congelador establecido a -18 grados Celsius.

En un aspecto del método según la invención, el método es un método de preparación de una masa que se va a almacenar congelada, método que comprende:

- a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasas de *Talaromyces* a al menos un ingrediente de la masa, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3; y

- 5 b) enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius.

Una masa que se almacena congelada o el almacenamiento congelado de una masa se define en el presente documento como una masa que se almacena a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente a una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius. Normalmente, el almacenamiento congelado de una masa es el almacenamiento en un congelador establecido a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente establecido a una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius.

La glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, se pueden añadir a al menos un ingrediente de la masa por separado o como una composición según la invención según las prácticas de panificación establecidas. Se puede dosificar una enzima adicional o enzimas adicionales según las prácticas de panificación establecidas.

- 15 En un aspecto del método según la invención, el método es un método en donde el al menos un ingrediente de la masa incluye harina y la glucosa oxidasa de *Penicillium* se incluye o se añade en una cantidad de 1 a 100 ppm basadas en el peso de harina.

En un aspecto del método según la invención, el método es un método en donde el al menos un ingrediente de la masa incluye harina y la xilanasa de *Talaromyces* se incluye o se añade en una cantidad de 1 a 60 ppm basadas en el peso de la harina.

En un aspecto del método según la invención, el método es un método de preparación de masa, método que comprende:

- a) preparar la masa que incluye la etapa de incorporar en una masa una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*; y
- 25 b) enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

30 La expresión "incorporar en la masa" o "incluir en la masa" se define en el presente documento como añadir la enzima según la invención a la masa, a cualquier ingrediente a partir del cual se va a preparar la masa (es decir, a cualquier ingrediente de la masa), y/o a cualquier mezcla de ingredientes de la masa a partir de los cuales se va a preparar la masa. En otras palabras, la enzima se puede añadir en cualquier etapa de la preparación de la masa y se puede añadir en una, dos o más etapas. La enzima se añade a los ingredientes de una masa que se amasa y se hornea para preparar el producto horneado usando métodos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 4.567.046, EP-A-426.211, JP-A-60-78529, JP-A-62-111629 y JP-A-63-258528.

Una enzima descrita en el presente documento se incorpora (o las enzimas se incorporan), incluye o añade en una cantidad eficaz. El término "cantidad eficaz" se define en el presente documento como una cantidad de la enzima que es suficiente para proporcionar un efecto medible sobre al menos una propiedad de interés de la masa y/o producto horneado. El experto está familiarizado con la determinación de una cantidad eficaz de una enzima, tal como la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*.

Se puede determinar la actividad de glucosa oxidasa usando ensayos, tales como espectrofotométricamente a 450 nm usando o-dianisidina como se describe por Witteveen et al. 1990 ("Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus niger*", Appl. Microbiol. Biotechnol 33:683-686) o un ensayo de glucosa oxidasa como se describe en el Código de Sustancias Químicas Alimentarias (FCC).

La actividad de glucosa oxidasa se determina preferentemente como la actividad expresada en UGO (unidades de glucosa oxidasa) como se describe en el presente documento.

Una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* incluye una cantidad en el intervalo de 1-100 ppm en peso de harina de una glucosa oxidasa de *Penicillium* que tiene una actividad de 3000-3200 unidades de glucosa oxidasa/gramo de enzima.

Una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* incluye una cantidad en el intervalo de 1-60 ppm en peso de harina de una glucosa oxidasa de *Penicillium* que tiene una actividad de 3000-3200 unidades de glucosa oxidasa/gramo de enzima.

Una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* incluye una cantidad en el intervalo de 1-100 ppm en peso de harina de una glucosa oxidasa de *Penicillium* que tiene una actividad de 3100-3200 unidades de glucosa oxidasa/gramo de enzima.

- 5 En un aspecto, una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* es desde 2 hasta 400 UGO/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* es desde 3 hasta 350 UGO/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* es desde 4 hasta 300 UGO/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* es desde 5 hasta 250 UGO/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de glucosa oxidasa de *Penicillium* es desde 2 hasta 200 UGO/kg de harina.

- 10 La actividad de xilanasa se determina preferentemente como la actividad expresada en UX (unidades de xilanasa) descrita en el presente documento.

Una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* incluye una cantidad en el intervalo de 1-100 ppm en peso de harina de una xilanasa de *Talaromyces* que tiene una actividad de 1400-1750 UX/gramo de enzima.

Una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* incluye una cantidad en el intervalo de 1-60 ppm en peso de harina de una xilanasa de *Talaromyces* que tiene una actividad de 1400-1750 UX/gramo de enzima.

- 15 Una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* incluye una cantidad en el intervalo de 1-60 ppm en peso de harina de una xilanasa de *Talaromyces* que tiene una actividad de 1400-1500 UX/gramo de enzima.

- 20 En un aspecto, una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* es desde 1 hasta 100 UX/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* es desde 1 hasta 80 UX/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* es desde 2 hasta 60 UX/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* es desde 5 hasta 40 UX/kg de harina. En un aspecto, una cantidad eficaz de xilanasa de *Talaromyces* es desde 1 hasta 30 UX/kg de harina.

XILANASA

En el contexto de la presente invención, "xilanasa" se refiere a glucosidasas (O-glucósido hidrolisasas EC 3.2.1.x) que catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilano.

- 25 En un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la xilanasa es una xilanasa de *Talaromyces*, preferentemente una xilanasa de *Talaromyces emersonii*, que también se puede denominar una xilanasa de *Rasamsonia emersonii*. Tanto la xilanasa de *Talaromyces* como la xilanasa de *Rasamsonia* son nombres, que se pueden usar indistintamente.

- 30 En un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la xilanasa es polipéptido de xilanasa de *Talaromyces emersonii* que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 2 como se describe en el documento de patente WO2002/24926, o una variante de la misma, que tiene al menos 75 % de identidad.

- 35 Según la invención, la xilanasa es el polipéptido de xilanasa de *Talaromyces emersonii* que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

- 40 La xilanasa (xilanasa de *Talaromyces* o, por ejemplo, *Aspergillus*) puede estar comprendida en una preparación de xilanasa que comprende o que consiste en xilanasa. La preparación de xilanasa que comprende xilanasa puede comprender entre 0,001 % y 100 % p/p de xilanasa basado en proteína total. Preferentemente, la preparación comprende entre 1 % y 70 % p/p de xilanasa basado en proteína total. En una realización, la preparación de xilanasa comprende entre 1 % y 50 % p/p de xilanasa basado en proteína total. En otra realización más, la preparación de xilanasa comprende entre 1 % y 30 % p/p de xilanasa basado en proteína total.

- 45 La xilanasa de *Talaromyces* puede ser, en un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, cualquier xilanasa de *Talaromyces*. Según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* tiene un aminoácido que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto de la invención, la xilanasa de *Talaromyces* es una xilanasa de *Talaromyces emersonii*.

En un aspecto de la invención, la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

- 50 Bakezyme® FXP 1500 de DSM, Países Bajos, comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

La xilanasa de *Talaromyces* usada en la invención puede ser una variante xilanasa que tiene al menos 90 % de identidad con, pero que no comprende todos los aminoácidos de las posiciones 23-408 de SEQ ID NO: 3. Por ejemplo,

la secuencia de aminoácidos puede ser más corta que la teóricamente codificada por la secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo en vista de la ausencia de aminoácidos del extremo N y/o C en comparación con la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 3.

5 La xilanasa de *Talaromyces* puede ser una variante del polipéptido de SEQ ID NO: 3, que comprende una sustitución, delección, truncación del extremo N y/o C y/o inserción en una o más posiciones de SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la secuencia de aminoácidos de la xilanasa de *Talaromyces* se ha modificado dando como resultado una expresión mejorada adicional según el método como se describe en el documento de patente WO2010/102982.

10 La xilanasa de *Talaromyces* se puede preparar por transformación de un *Aspergillus* con una construcción que comprende una secuencia de ADNc como se expone en SEQ ID NO: 4 y la expresión posterior de la enzima.

GLUCOSA OXIDASA

15 En el contexto de la presente invención, la "glucosa oxidasa" (EC 1.1.3.4) cataliza la siguiente reacción: β -D-glucosa + O₂ = D-glucono-1,5-lactona + H₂O₂. Solo para fin de ilustración, puede ser adecuada cualquier xilanasa de la familia 10 de GH (glucósido hidrolasa). Por tanto, en el presente documento también se describe solo para fin de ilustración, y no según la invención, un método de mejora de una masa, método que comprende incluir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de la familia 10 de GH en la masa durante la preparación de la masa.

Un método de preparación de una masa que se va a almacenar congelada solo para fin de ilustración, y no según la invención, puede comprender:

20 a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* como se describe en el presente documento y una xilanasa de la familia 10 de GH a al menos un ingrediente de la masa; y

b) enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius.

Una composición solo para fin de ilustración, y no según la invención, puede comprender una glucosa oxidasa de *Penicillium* como se describe en el presente documento y una xilanasa de la familia 10 de GH.

25 Un uso no según la invención y solo para fin de ilustración de una glucosa oxidasa de *Penicillium* como se describe en el presente documento y una xilanasa de la familia 10 de GH puede ser para mejorar las propiedades de una masa que se ha almacenado congelada o un producto horneado preparado a partir de una masa que se ha almacenado congelada.

30 La glucosa oxidasa (*Penicillium* o por ejemplo *Aspergillus*) puede estar comprendida en una preparación de glucosa oxidasa que comprende o que consiste en glucosa oxidasa. La preparación de glucosa oxidasa que comprende glucosa oxidasa puede comprender entre 0,001 % y 100 % p/p de glucosa oxidasa basado en proteína total. Preferentemente, la preparación comprende entre 1 % y 70 % p/p de glucosa oxidasa basado en proteína total. En una realización, la preparación de glucosa oxidasa comprende entre 1 % y 50 % p/p de glucosa oxidasa basado en proteína total. En otra realización más, la glucosa oxidasa de la preparación comprende entre 1 % y 30 % p/p de glucosa oxidasa basado en proteína total.

35 La glucosa oxidasa de *Penicillium* puede ser, en un aspecto no según la invención y solo para fin de ilustración, cualquier glucosa oxidasa de *Penicillium*. Según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* tiene un aminoácido que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

40 En un aspecto de la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* es una glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum*.

En un aspecto de la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

Bakezyme® Go Pure de DSM, Países Bajos, comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1.

45 La glucosa oxidasa de *Penicillium* usada en la invención puede ser una glucosa oxidasa de variante que tiene al menos 90 % de identidad con, pero que no comprende todos los aminoácidos de las posiciones 19-604 de SEQ ID NO: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede ser más corta que la teóricamente codificada por la secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo en vista de los aminoácidos que faltan del extremo N y/o C en comparación con la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 1.

La glucosa oxidasa de *Penicillium* puede ser una variante que tiene al menos 90 % de identidad del polipéptido de SEQ ID NO: 1, que comprende una sustitución, delección, truncación del extremo N y/o C y/o inserción en una o más posiciones de SEQ ID NO: 1.

- 5 En otro aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la secuencia de aminoácidos de la glucosa oxidasa de *Penicillium* se ha modificado dando como resultado una expresión mejorada adicional según el método que se describe en el documento de patente WO2010/102982.

La glucosa oxidasa de *Penicillium* se puede preparar por transformación de un *Aspergillus* con una construcción que comprende una secuencia de ADNc como se expone en SEQ ID NO: 2 y la posterior expresión de la enzima.

- 10 En un aspecto del método según la invención, la masa se almacena congelada durante al menos 1 semana, en un aspecto al menos 2 semanas, en un aspecto al menos 1 mes, en un aspecto al menos dos meses. En un aspecto, la masa se almacena a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius durante 3 meses o más. En un aspecto, la masa se almacena a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius durante 4 meses o más, en un aspecto 6 meses o más, en un aspecto 9 meses o más.
- 15 En un aspecto, la masa se almacena a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius durante 12 meses o más.

Después de que la masa se haya almacenado congelada, la masa se descongela y se hornea. Normalmente, la masa se fermenta después de la descongelación y antes del horneado. Normalmente tiene lugar el moldeado antes de la congelación.

- 20 El método según la invención para preparar una masa (una masa congelada o una masa que se va a almacenar congelada) da como resultado una propiedad mejorada de la masa y/o una propiedad mejorada del producto horneado preparado a partir de la masa.

- 25 En el presente documento, la expresión "producto horneado preparado a partir de la masa" significa un producto horneado preparado a partir de una masa que se descongeló después de congelarse. La masa congelada según la invención comprende una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones.

La masa congelada según la invención tiene al menos una propiedad mejorada como se describe en el presente documento o da como resultado al menos una propiedad mejorada en un producto horneado preparado a partir de dicha masa.

- 30 El uso según la invención de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3, en la preparación de una masa congelada da como resultado al menos una propiedad mejorada como se describe en el presente documento.
- 35

La propiedad mejorada es una propiedad que es relevante en la preparación de un producto horneado. La propiedad mejorada se demuestra en comparación con una referencia que se ha sometido a las mismas condiciones.

- 40 La propiedad mejorada se puede determinar después de descongelar la masa congelada según la invención, es decir, después de descongelar una masa congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, y comparándola con una masa de referencia que se ha sometido a las mismas condiciones.

La propiedad mejorada se puede determinar después de descongelar una masa congelada obtenida por cualquier método según la invención y compararla con una masa de referencia que se ha sometido a las mismas condiciones. En un aspecto, la propiedad mejorada de la masa congelada se determina después de descongelar la masa congelada.

- 45 La propiedad mejorada se puede determinar por comparación de una masa y/o un producto horneado preparado con y sin adición de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* según los métodos descritos en el presente documento.

- 50 La propiedad mejorada se determina en comparación con una referencia que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones. La referencia puede ser una masa preparada sin una glucosa oxidasa o puede ser una masa que comprende una glucosa oxidasa diferente tal como una glucosa oxidasa de *Aspergillus*. La referencia puede ser una masa sin una xilanasa o puede ser una masa que comprende una xilanasa diferente, tal como una xilanasa de *Aspergillus*. La referencia puede ser un producto horneado preparado a partir de una masa que se ha almacenado congelada que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasa de *Talaromyces*.

En todos los casos, la masa "de referencia" se ha almacenado congelada durante la misma cantidad de tiempo que la masa según la invención.

En todos los casos, el producto horneado de "referencia" es un producto horneado preparado a partir de una masa congelada de referencia que se ha almacenado congelada durante la misma cantidad de tiempo que la masa congelada según la invención.

La propiedad mejorada se puede demostrar preparando un producto horneado a partir de una masa que se ha almacenado congelada que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, y preparando otro producto horneado a partir de una masa que se ha almacenado congelada que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasa de *Talaromyces*, determinando la propiedad de ambos productos y comparando los resultados.

La propiedad mejorada puede incluir una cualquiera o más de las siguientes, pero no se limita a elasticidad elevada de la masa, elevada estabilidad de la masa, reducida pegajosidad de la masa, extensibilidad mejorada de la masa, elevado volumen del producto horneado, aroma mejorado del producto horneado, estructura de miga mejorada del producto horneado, firmeza reducida del producto horneado, elevada rotura y/o reducida formación de burbujas del producto horneado.

El producto horneado preparado a partir de una masa congelada en la que la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, se incluyeron durante la preparación de la masa, tiene elevado volumen cuando se compara con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasa de *Talaromyces*, en particular en comparación con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasa de *Aspergillus*.

En un aspecto, un producto horneado preparado a partir de una masa congelada en la que la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, se incluyeron durante la preparación de la masa, tiene elevada rotura cuando se compara con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasa de *Talaromyces*, en particular en comparación con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasa de *Aspergillus*.

En un aspecto, una masa que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, muestra elevada estabilidad de la masa en comparación con una masa que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasa de *Talaromyces*, en particular en comparación con una masa que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasa de *Aspergillus*.

El término "elevada elasticidad de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que tiene una mayor tendencia a recuperar su forma original después de someterse a una cierta deformación física.

El término "pegajosidad reducida de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que tiene menos tendencia a adherirse a las superficies, por ejemplo, en la maquinaria de producción de masas, y o se evalúa empíricamente por el panadero de prueba experto o se mide usando un analizador de textura (por ejemplo, TAXT2) como se conoce en la técnica.

El término "extensibilidad mejorada de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que se puede someter a elevada deformación o estiramiento sin rotura.

El "aroma" se evalúa por un panel de prueba cualificado.

"Firmeza" se refiere a la miga del producto horneado y se puede evaluar o empíricamente por el panadero de prueba experto o se mide usando un analizador de textura (por ejemplo, TAXT2) como se conoce en la técnica.

El término "estructura de miga mejorada del producto horneado" se define en el presente documento como la propiedad de un producto horneado con células más finas y/o paredes celulares más delgadas en la miga y/o distribución más uniforme/homogénea de células en la miga y se evalúa normalmente visualmente por el panadero o por análisis digital de imágenes como se conoce en la técnica (por ejemplo, C-Cell, Calibre Control International Ltd, Appleton, Warrington, R. U.).

El término "formación reducida de burbujas del producto horneado" se define en el presente documento como una reducción visualmente determinada de la formación de burbujas sobre la corteza del pan horneado. Una burbuja es una bolsa de aire sobre la superficie de la corteza del pan.

En el contexto de la presente invención, el término 'masa' se define como una mezcla de harina y otros ingredientes de la masa. En una realización, la masa es lo suficientemente firme como para ser amasada o estirada con un rodillo.

La masa se prepara normalmente a partir de los ingredientes básicos de la masa que incluyen harina (de cereales), tales como harina de trigo o harina de arroz, agua y opcionalmente sal. Los cereales en el presente documento incluyen

maíz, arroz, trigo, cebada, sorgo, mijo, avena, centeno, triticale, trigo sarraceno, quinoa, espelta, escanda, farro, trigo duro y kamut.

Para productos leudados, se usa principalmente levadura de cerveza, además de sistemas leudantes químicos tales como una combinación de un ácido o compuesto que genera ácido y bicarbonato. La masa se puede preparar usando una mezcla, que incluye una mezcla para pan.

Las masas congeladas tienen varias ventajas en comparación con las masas recién preparadas, por ejemplo las masas congeladas facilitan la distribución de la masa a panaderías más pequeñas. También facilita la planificación de la producción y permite a las panaderías producir pan a demanda. El tiempo de horneado, venta y consumo del producto horneado puede ser semanas o incluso meses después de la producción de la masa. En un aspecto, la masa para la preparación de una masa congelada no está fermentada y se congela inmediatamente después de la formación, el moldeo o la conformación de la masa. En otro aspecto, la masa para la preparación de una masa congelada se fermenta y se congela. En un aspecto, la masa que comprende una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasas de *Talaromyces* se congela rápidamente en un congelador rápido a aproximadamente -35 grados Celsius durante 45 minutos. Después de que la temperatura interna de la masa haya alcanzado una temperatura de -7 grados Celsius o inferior, los trozos de masa se ponen en bolsas de plástico y se almacenan en un congelador de almacenamiento. En un aspecto, los trozos de masa se ponen en bolsas de plástico y se almacenan en un congelador de almacenamiento, una vez la temperatura interna de los trozos de masa haya alcanzado una temperatura en el intervalo de -10 grados Celsius a -15 grados Celsius.

En un aspecto, la masa congelada preparada según el método de la invención tiene buenas propiedades de manipulación de la masa después de descongelar la masa congelada. Las propiedades de manipulación de la masa incluyen propiedades que son importantes para preparar convenientemente porciones de masa, acondicionar la masa y transportar la masa hasta el equipo de formación de la masa. En un aspecto, la masa congelada preparada según el método de la invención demuestra después de la descongelación una pegajosidad reducida de la masa a las máquinas usadas en el proceso de fabricación del pan en comparación con una masa de referencia.

El método de la invención puede dar como resultado un aumento de la estabilidad de la masa en comparación con una masa de referencia. Estabilidad de la masa en el presente documento es la estabilidad de la masa después de que se haya almacenado congelada y descongelado después. El "aumento de la estabilidad de la masa" también se puede denominar "aumento de la estabilidad de una masa".

En el contexto de la presente invención, el término "aumento de la estabilidad de la masa" significa que la masa es menos susceptible a formar fallos como consecuencia del proceso de almacenamiento congelado. Un fallo de formación puede ser un cambio no deseado en la forma de la masa o una grieta en la superficie de la masa.

El aumento de la estabilidad de la masa se pueden observar por la masa descongelada, fermentada y formada que mantiene mejor su forma durante el tiempo desde antes de entrar en el horno hasta después de hornearse cuando se compara con una masa de referencia. Si la forma de la masa en el periodo antes de entrar en el horno sigue siendo más similar en comparación con la masa de referencia, ha mejorado la estabilidad de la masa. Esto se puede determinar, por ejemplo, comparando la relación entre el diámetro y la altura de la masa al "comienzo del periodo antes de entrar en el horno" con la relación entre el diámetro y la altura de la masa al "final del periodo antes de entrar en el horno". Si estas relaciones son más similares en comparación con la masa de referencia, ha mejorado la estabilidad de la masa.

"El periodo antes de entrar en el horno" en el presente documento significa el periodo desde media hora hasta e incluyendo 1 minuto antes de entrar en el horno. En un aspecto, desde 15 minutos hasta 1 minuto antes de entrar en el horno.

El periodo antes de entrar en el horno normalmente incluye el transporte de la masa hasta el horno.

En otro aspecto, se pueden usar técnicas (avanzadas) de análisis de imágenes para medir y comparar la forma y/o el volumen de la masa en el periodo antes de entrar en el horno y compararla con la masa de referencia.

El aumento de la estabilidad de la masa se puede observar, por ejemplo, siendo la masa más capaz de, después del almacenamiento congelado y la descongelación, mantener su forma mientras que se transporta al horno. Si la diferencia de forma de la masa antes y después del transporte es más pequeña cuando se compara con la diferencia de forma de la masa de referencia antes y después del transporte, ha mejorado la estabilidad de la masa.

La entrada en el horno se puede evaluar alternativamente comparando la forma de la masa descongelada antes de que entre en el horno y la forma del producto horneado obtenida después del horneado. La estabilidad de la masa mejora si estas formas son más similares, es decir, se diferencian menos entre sí, que las diferencias de forma correspondientes de la referencia tratada en condiciones idénticas. Esto se puede determinar, por ejemplo, comparando la relación entre el diámetro y la altura de la masa y la relación entre el diámetro y la altura del producto horneado preparado a partir de la masa. Si estas relaciones son más similares en comparación con la masa de referencia y el producto horneado, ha mejorado la estabilidad de la masa.

La estabilidad de la masa se puede evaluar tocando la superficie de la masa y observando cómo la masa responde a este toque. Por ejemplo, presionando suavemente con uno o más dedos la masa y observando cómo desaparece la abolladura así obtenida. Cuanto más rápido desaparezca la abolladura, mayor será la estabilidad de la masa. Cuanto más desaparezca la abolladura, es decir, cuanto más vuelva la superficie de la masa a la forma que tenía antes de tocarla, mayor será la estabilidad de la masa. Si la abolladura desaparece en mayor medida y/o más rápidamente en comparación con la masa de referencia, ha mejorado la estabilidad de la masa.

El volumen del producto horneado se mide preferentemente como el volumen de una hogaza dada de producto horneado determinado por un analizador automático de volumen (por ejemplo, BVM-3, TexVol Instruments AB, Viken, Suecia, o un Volscan Profiler 600, Texture technologies, Hamilton, EE. UU.). Dicho analizador proporcionará normalmente datos del volumen de un producto horneado usando ultrasonidos o detección láser, como se conoce en la técnica. En caso de que el volumen del producto horneado sea mayor en comparación con el producto horneado de referencia, el volumen mejora. Alternativamente, se puede usar la altura del producto horneado después del horneado en un molde como una indicación del volumen de producto horneado. En caso de que aumente la altura del producto horneado, el volumen del producto horneado es mayor y mejora el volumen.

Si el volumen del producto horneado es mayor en comparación con la referencia, ha mejorado el volumen.

La rotura es cuánto se abre de golpe el producto horneado, tal como una baguette, durante el proceso de horneado. En algunos tipos de pan la rotura es una propiedad deseada y se induce de un modo definido greñando la masa antes de que se hornee. El greñado es un término que se refiere al proceso de cortar a través la piel de la masa con un cuchillo afilado. Las baguettes se fabrican normalmente con 3 o 5 greñas diagonales.

La rotura, también denominada la abertura de la corteza, del producto horneado se puede determinar midiendo la abertura de la corteza a la mayor anchura de la abertura de la corteza después de hornear la masa y enfriar el producto horneado hasta temperatura ambiente. Una mayor anchura indica un aumento de la rotura. La rotura también se puede evaluar por inspección visual, por ejemplo, por un panadero experimentado que determina o que clasifica la rotura. Una rotura mayor se considera normalmente una rotura mejorada.

Para algunos productos horneados se desea una rotura que tiene un borde más irregular, dentado o serrado y se considera una rotura mejorada.

En un aspecto del método no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto del método según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto del método según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto del método según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto del método según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto del método según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* es una glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum*.

En un aspecto del método no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto del método según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto del método según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto del método según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto del método según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto del método según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* es una xilanasa de *Talaromyces emersonii*.

5 La invención se refiere además a una composición que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones.

La composición se puede usar en los métodos de la invención. La composición se puede usar en un método de mejora de una masa que incluye una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, en forma de una composición en la masa durante la preparación de la masa.

10 La masa que comprende la composición según la invención, que comprende glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, muestra aumento de la estabilidad de la masa después de que se haya almacenado congelada en comparación con una masa de referencia que no comprende dicha composición, en particular en comparación con una masa de referencia que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasa de *Aspergillus*.

15 La composición se puede usar en un método de mejora de productos horneados preparados a partir de la una masa que se ha almacenado congelada, método que comprende incluir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, como una composición en la masa durante la preparación de la masa.

20 El producto horneado preparado a partir de una masa congelada en el que la composición según la invención, que comprende glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, se incluyó durante la preparación de la masa, tiene un volumen elevado cuando se compara con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada de referencia que no comprende dicha composición, en particular en comparación con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasa de *Aspergillus*.

25 El producto horneado preparado a partir de una masa congelada en el que la composición según la invención, que comprende glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, se incluyó durante la preparación de la masa, puede tener una rotura elevada cuando se compara con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que no comprende dicha composición, en particular en comparación con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasa de *Aspergillus*.

30 En un aspecto de la composición no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1.

35 En un aspecto de la composición según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto de la composición según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* es una glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum*.

En un aspecto de la composición según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

40 En un aspecto de la composición según la invención, la glucosa oxidasa de *Penicillium* tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto de la composición no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.

45 En un aspecto de la composición según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto de la composición según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* es una xilanasa de *Talaromyces emersonii*.

50 En un aspecto de la composición según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto de la composición según la invención, la xilanasa de *Talaromyces* tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 23-408 de SEQ ID NO: 3.

En una realización de la composición según la invención, la composición comprende además al menos un ingrediente de la masa.

5 La masa se prepara usando ingredientes de la masa.

Un ingrediente de la masa en el presente documento incluye sin limitación harina (de cereales), una fuente de lecitina que incluye huevo, agua, sal, azúcar, aromas, una fuente de grasa que incluye mantequilla, margarina, aceite y manteca, levadura de cerveza, sistemas de leudado químicos tales como una combinación de un ácido (compuesto generador de ácido) y bicarbonato, una fuente de proteínas que incluye leche, harina de soja, oxidantes no químicos (que incluyen ácido ascórbico, bromato y azodicarbonamida (ADA)), agentes reductores (que incluyen L-cisteína), emulsionantes (que incluyen mono/diglicéridos, monoglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil-lactilato de sodio (SSL), estearoil-lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y ésteres de ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos (DATEM), gomas (que incluyen goma guar y goma xantana), aromas, ácidos (que incluyen ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (que incluyen glicerol), conservantes y una o más enzimas adicionales.

La una o más enzimas adicionales se pueden seleccionar de enzimas como una proteasa, tal como una endoproteasa o una exoproteasa; una peptidasa, tal como una exopeptidasa o una endopeptidasa; una enzima lipolítica, tal como una triacilglicerol-lipasa, una fosfolipasa, una galactolipasa o una enzima que tiene tanto actividad de fosfolipasa como de galactolipasa; o una carbohidrasa, tal como una celulasa, una hemicelulasa, en particular una pentosanasa tal como una xilanasa; una enzima de reticulación, tal como una transglutaminasa; una alfa-amilasa maltogénica; una alfa-amilasa o una beta-amilasa; una amiloglucosidasa, una oxidasa, tal como una sulhidroxidasa, una piranosa oxidasa; una peroxidasa, una hexosa oxidasa, una lacasa; una disulfuro isomerasa de proteína; una asparaginasa.

En un aspecto de la composición según la invención, el al menos un ingrediente de la masa incluye ácido ascórbico y/o una enzima adicional como se describe en el presente documento.

25 En un aspecto de la composición según la invención, el al menos un ingrediente de la masa incluye ácido de harina y/o una enzima adicional como se describe en el presente documento.

En una realización de la composición según la invención, el al menos un ingrediente de la masa incluye harina y/o ácido ascórbico.

En un aspecto de la composición según la invención, el al menos un ingrediente de la masa incluye ácido ascórbico.

30 En un aspecto de la composición según la invención, el al menos un ingrediente de la masa incluye harina.

En un aspecto de la composición según la invención, el ingrediente de la masa incluye harina y

a) 1 a 100 ppm de la glucosa oxidasa de *Penicillium* como se describe en las reivindicaciones en peso de harina; y

b) 1 a 60 ppm de la xilanasa de *Talaromyces* como se describe en las reivindicaciones en peso de harina.

35 Un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración se refiere además a una masa.

En una realización de la masa según la invención, la masa comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* como se describen en el presente documento. Dicha masa puede tener el beneficio de estabilidad mejorada de la masa después de que la masa se haya almacenado congelada.

La masa se prepara a partir de la composición como se describe en el presente documento.

40 Un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración se refiere a una masa congelada preparada por un método según la invención.

Un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración se refiere a una masa congelada que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* como se define en el presente documento.

45 Un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración se refiere además a un producto horneado preparado a partir de una masa congelada.

El producto horneado preparado a partir de una masa congelada en el que la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* se incluyeron durante la preparación de la masa tiene un volumen elevado cuando se compara con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que se preparó sin la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, en particular en comparación con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasa de *Aspergillus*.

El producto horneado preparado a partir de una masa congelada en el que la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces* se incluyeron durante la preparación de la masa puede tener una rotura elevada cuando se compara con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que se preparó sin la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces*, en particular en comparación con un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Aspergillus* y una xilanasas de *Aspergillus*.

Los ejemplos de productos horneados, ya sean de tipo blanco, moreno o integral, que se pueden producir ventajosamente por la presente invención incluyen pan (en particular pan blanco, integral o de centeno), normalmente en forma de hogazas o bollos, pan de tipo baguette francesa que incluye baguette y bastardo, hojaldres, cruasanes, brioche, panetones, pasta, noodles (cocidas o fritas (salteado)), pan de pita y otros panes planos, tortillas, tacos, bizcochos, tortitas, cookies, en particular galletas saladas, donuts, que incluyen donuts fermentados con levadura, bagels, cortezas de pastel, pan al vapor, pan crujiente, brownies, bizcochos, snacks (por ejemplo, bretzel, nachos, snacks fabricados, patatas fritas fabricadas). El término producto horneado incluye pan que contiene desde 2 hasta 30 % en peso de azúcar, pan que contiene frutas, cereales para el desayuno, barritas de cereales, pastel sin huevo, panes blandos y pan sin gluten. Pan sin gluten en el presente documento y más adelante es pan que contiene como máximo 20 ppm de gluten. Varios granos y fuentes de almidón se consideran aceptables para una dieta sin gluten. Las fuentes frecuentemente usadas son patatas, arroz y tapioca (derivada de yuca). El producto horneado incluye sin limitación pan de molde, hogazas de pan, trenzas, panecillos, tales como panecillos de hamburguesa o panecillos al vapor, chapatas, tostada Melba, rebanada de panecillo al vapor secada, miga de pan, pan ácimo, focacha, biscotes, biscote alemán, picatostes, bretzels blandos, pan blando y duro, palitos de pan, pan leudado con levadura y leudado químicamente, productos de masa laminada tales como pastel danés, cruasanes o productos de hojaldre, muffins, bagels daneses, recubrimientos de pastelería, galletas saladas, obleas, corteza de pizza, tortillas, productos de pasta, crepes, gofres y productos precocidos. Un ejemplo de un producto precocido incluye, sin limitación, pan parcialmente horneado que se termina en el momento de la venta o consumo con un segundo y corto proceso de horneado.

El pan puede ser pan de molde blanco o moreno y se puede fabricar, por ejemplo, usando un denominado método esponja de estilo americano o de masa o un método directo de estilo americano.

En un aspecto, el pan es un pan de suelo, es decir, un pan que se hornea en una bandeja de horno.

El término tortilla en el presente documento incluye tortilla de maíz y tortilla de trigo. Una tortilla de maíz es un tipo de pan plano fino, normalmente no leudado, preparado a partir de maíz ("maize") finamente molido (normalmente denominado "maíz" ("corn") en los Estados Unidos). Una tortilla de harina es un tipo de pan plano fino, normalmente no leudado, preparado a partir de harina de trigo finamente molida. El término tortilla incluye además un pan similar de Sudamérica denominado arepa, aunque las arepas son normalmente mucho más gruesas que las tortillas. El término tortilla incluye además un laobing, una "tortita" gruesa en forma de pizza de China y un roti indio, que está hecho esencialmente de harina de trigo. Una tortilla tiene normalmente una forma redonda u ovalada y puede variar en diámetro desde aproximadamente 6 hasta más de 30 cm.

En un aspecto, el producto horneado es un pan crujiente que tiene una corteza crujiente y un núcleo blando. Los ejemplos de pan crujiente incluyen, pero no se limitan a, baguette, flauta, pistola, chapata, bastardo, pan vienés, pan redondo, panini y maraguetta.

La invención se refiere además a un método de preparación de un producto horneado que comprende las etapas de

- a. preparar una masa que incluye la etapa de añadir la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, a al menos un ingrediente de la masa; y
- b. enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius para obtener una masa congelada; y
- c. descongelar la masa congelada para obtener una masa descongelada; y
- d. hornear la masa congelada.

En una realización de un método según la invención, el método es un método de preparación de un producto horneado que comprende las etapas de

- a. preparar una masa que incluye la etapa de añadir la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, a al menos un ingrediente de la masa; y
- b. enfriar la masa a una temperatura en el intervalo de -40 a -30 grados Celsius, durante al menos 20 minutos; y
- c. descongelar la masa congelada para obtener una masa descongelada; y
- d. hornear la masa congelada.

En un aspecto de la etapa b), la masa se enfría a una temperatura en el intervalo de -40 a -30 grados Celsius, durante un periodo de tiempo desde 20 hasta 180 minutos, en un aspecto durante un periodo de tiempo desde 30 hasta 120

minutos, durante un periodo de tiempo desde 40 hasta 100 minutos, durante un periodo de tiempo desde 45 hasta 90 minutos.

En una realización, el método de la invención es un método de preparación de un producto horneado que comprende las etapas de

- 5 a. descongelar una masa congelada que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, y
b. hornear la masa congelada.

En una realización, el método de la invención es un método de preparación de un producto horneado que comprende las etapas de

- 10 a. descongelar una masa que se ha almacenado congelada que comprende una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, y
b. hornear la masa congelada.

La presente invención se refiere al uso de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, en la preparación de una masa congelada. El uso según la invención de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* como se define en el presente documento puede ser por la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, como parte de una composición. Dicho uso puede estar en forma de una composición como se describe en el presente documento.

En un aspecto del uso según la invención, la masa se ha almacenado congelada durante al menos 1 semana, en un aspecto al menos 2 semanas, en un aspecto al menos 1 mes, en un aspecto al menos dos meses. En un aspecto, la masa se ha almacenado a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius durante 3 meses o más. En un aspecto, la masa se ha almacenado a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius durante 4 meses o más, en un aspecto 6 meses o más, en un aspecto 9 meses o más. En un aspecto, la masa se ha almacenado a una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius, preferentemente hasta una temperatura en el intervalo de -35 a -15 grados Celsius durante 12 meses o más.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, para mejorar al menos una propiedad de una masa que se ha almacenado congelada o de un producto horneado preparado a partir de una masa que se ha almacenado congelada.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, para mejorar el volumen y/o la rotura de un producto horneado preparado a partir de una masa que se ha almacenado congelada.

En un aspecto del uso según la invención, dicho uso es un uso de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, para proporcionar un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que tiene un volumen mejorado en comparación con un producto horneado de referencia preparado a partir de una masa congelada.

En un aspecto del uso según la invención, dicho uso es un uso de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, para proporcionar un producto horneado preparado a partir de una masa congelada que tiene una abertura de la corteza mejorada en comparación con un producto horneado de referencia preparado a partir de una masa congelada.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en las reivindicaciones, para mejorar la estabilidad de la masa de una masa que se ha almacenado congelada.

La glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* como se describen en el presente documento se pueden obtener por cualquier medio adecuado. En una realización, se aísla de una fuente, en particular un microorganismo procariota o eucariota, que contiene la enzima. Los ejemplos adecuados de microorganismos son microorganismos de mamífero, de planta, fúngicos, bacterianos y de algas, como se menciona más adelante.

En un aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la glucosa de *Penicillium* se aísla de una especie de *Penicillium*, en particular de *Penicillium chrysogenum*. Un ejemplo adecuado de dicha glucosa oxidasa de *Penicillium* es una glucosa oxidasa de *Penicillium* que comprende una secuencia de aminoácidos según los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1 o una glucosa oxidasa con una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 75 % de identidad con los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1. En una realización, la glucosa oxidasa tiene

una secuencia de aminoácidos que muestra al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto no según la invención y solo presente para fin de ilustración, la glucosa oxidasa de *Penicillium* se genera usando técnicas habituales de biología molecular para proporcionar una glucosa oxidasa que por lo demás también sería obtenible de un hongo *Penicillium*, por ejemplo por síntesis *de novo* de una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con los aminoácidos 19-604 de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, se usa una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 2. El documento de patente WO2010121933 describe la clonación y la expresión de glucosa oxidasa de *Penicillium*. Dicha secuencia de nucleótidos se puede usar entonces para la transformación de un microorganismo hospedador. En otra realización, la glucosa oxidasa de *Penicillium* se genera usando mutagénesis de saturación del sitio, mutagénesis de barrido, mutagénesis insercional, mutagénesis al azar, mutagénesis dirigida al sitio y evolución dirigida de una glucosa oxidasa existente, por ejemplo de la representada en los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, así como diversos otros enfoques de recombinación conocidos por un experto en la técnica. Las glucosa oxidasas (EC 1.1.3.4) catalizan la oxidación de glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno usando oxígeno atmosférico.

La xilanasas de *Talaromyces* se puede obtener como se describe en el documento de patente WO2002/24926.

En el contexto de la presente invención, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. Para optimizar el alineamiento entre las dos secuencias, se pueden introducir huecos en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Dicho alineamiento se puede llevar a cabo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Alternativamente, el alineamiento se puede llevar a cabo a lo largo de una longitud más corta, por ejemplo a lo largo de aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/bases o aminoácidos. La identidad de secuencia es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias a lo largo de la región alineada informada. Tras el alineamiento de las dos secuencias, las posiciones alineadas resultantes de los aminoácidos se denominan normalmente posiciones correspondientes. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para el alineamiento de dos secuencias (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Ambas secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos se pueden alinear por el algoritmo. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE. Con el fin de la presente invención, se usó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) p. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para secuencias de proteínas se usa EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. Para secuencias de nucleótidos, se usa EDNAFULL. Los parámetros opcionales usados son una penalización por abertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5. El experto apreciará que todos estos parámetros diferentes darán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan diferentes algoritmos.

Después del alineamiento por el programa NEEDLE como se ha descrito anteriormente, se calcula el porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de búsqueda y una secuencia de la invención del siguiente modo: Número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestran un aminoácido idéntico o nucleótido idéntico en ambas secuencias dividido entre la longitud total del alineamiento después de la resta del número total de huecos en el alineamiento. La identidad como se define en el presente documento se puede obtener a partir de NEEDLE usando la opción NOBRIEF y se etiqueta en la salida del programa como la "identidad más larga".

Las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de la presente invención se pueden usar además como "secuencia de búsqueda" para realizar una búsqueda por comparación con bases de datos públicas para identificar, por ejemplo, otros miembros de familias o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos similares a las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos similares a las moléculas de proteínas de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase la página de inicio del Centro Nacional para Información Biotecnológica en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Se puede usar cualquier microorganismo como célula hospedadora recombinante para producir una glucosa oxidasa de *Penicillium* o xilanasas de *Talaromyces* para su uso según la invención. En una realización, el microorganismo es una célula procariota, tal como una bacteria Gram-negativa o Gram-positiva. Las bacterias adecuadas incluyen *Escherichia*, *Anabaena*, *Caulobacter*, *Cyanobacteria*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* o

Thermoactinomyces. En otra realización, el microorganismo es una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, célula de insecto, célula de planta, célula fúngica o célula de alga. Los ejemplos adecuados de células de mamífero son células CHO, células COS, células 293, células Per.C6® e hibridomas. Los ejemplos adecuados de células de insecto incluyen células Sf9 y Sf21 y derivados de las mismas. Los ejemplos adecuados de células fúngicas incluyen células de levadura, tales como cepa de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; más preferentemente *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*, u hongos filamentosos. Los hongos filamentosos incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define por Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, R. U.). Las cepas fúngicas filamentosas incluyen cepas de *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Filbasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Rasamsonia*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* y *Trichoderma*. Las células fúngicas filamentosas preferidas pertenecen a una especie de un género *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Rasamsonia*, *Thermoascus* o *Trichoderma*, y lo más preferentemente una especie de *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Rasamsonia emersonii*, *Trichoderma reesei*, *Talaromyces emersonii*, *Thermoascus aurantiacus* o *Penicillium chrysogenum*. Algae es el grupo de organismos fotosintéticos eucariotas unicelulares y multicelulares, que incluye microalgas, tales como *Dunaliella*, *Spirulina* y *Chlorella*. En una realización, la célula hospedadora recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos o una molécula de ácido nucleico según la invención es una especie de *Aspergillus*, *Bacillus*, *Chrysosporium*, *Escherichia*, *Kluyveromyces*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rasamsonia*, *Saccharomyces*, *Streptomyces* o *Talaromyces*, preferentemente una especie de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Myceliophthora thermophila*, *Rasamsonia emersonii* o *Trichoderma reesei*. La célula hospedadora recombinante es preferentemente capaz de expresar o expresar en exceso la glucosa oxidasa o xilanasas, por ejemplo, como se describe en los documentos de patente WO 2010/121933 o WO 2012/001169. La célula hospedadora recombinante puede comprender además una o más modificaciones en su genoma de forma que la célula hospedadora microbiana recombinante sea deficiente en la producción de al menos un producto seleccionado de glucoamilasa (glaA), alfa-amilasa estable ácida (amyA), alfa-amilasa neutra (amyBI y amyBII), ácido oxálico hidrolasa (oahA), una toxina, preferentemente ocratoxina y/o fumonisina, un regulador transcripcional de proteasa prtT, PepA, un producto codificado por el gen hdfA y/o hdfB, una péptido sintasa no ribosómica *npsE*, *agsE* o *amyC* si se compara con una célula hospedadora parental y se mide en las mismas condiciones. Los métodos adecuados de producción de dichas células hospedadoras incluyen los descritos en los documentos de patente WO2012/001169 y WO2014013074.

La glucosa oxidasa y/o la xilanasas usadas en la presente invención pueden ser proteínas de fusión. Se conocen en la técnica las técnicas de producción de polipéptidos de fusión, e incluyen unir las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de manera que estén en marco. La expresión del polipéptido fusionado está bajo el control del (de los mismos) promotor(es) y terminador. Los polipéptidos híbridos pueden comprender una combinación de secuencias de polipéptidos parciales o completas obtenida de al menos dos polipéptidos diferentes en donde uno o más pueden ser heterólogos a una célula hospedadora. Dichos polipéptidos de fusión de al menos dos polipéptidos diferentes pueden comprender un dominio de unión de un polipéptido, tal como un dominio de unión a almidón o un dominio de unión a hidrato de carbono, operativamente unido a un dominio catalítico de un segundo polipéptido. Los ejemplos de polipéptidos de fusión y fusiones de la secuencia señal son, por ejemplo, como se describen en los documentos de patente WO2010/121933, WO2013/007820 y WO2013/007821.

En el contexto de la presente invención, el término 'polipéptido' se refiere a una molécula que contiene un esqueleto de una cadena de al menos diez aminoácidos, en donde los aminoácidos se unen covalentemente entre sí por enlaces peptídicos. Estos grupos de aminoácidos del esqueleto se pueden unir a otros grupos, tales como otras secuencias de aminoácidos, grupos de azúcar o grupos de lípidos. El polipéptido puede tener características estructurales, tales como hélices alfa, hojas plegadas en beta o puentes disulfuro. Un polipéptido usado según la presente invención puede comprender un dominio catalítico y uno o más dominios de unión, tales como un dominio de unión a almidón o hidrato de carbono. En el contexto de la presente invención, la secuencia de aminoácidos también se denomina 'secuencia de polipéptidos' o 'secuencia de proteínas'. El término 'polipéptido' incluye proteínas.

En las figuras y en otros sitios de la descripción de la presente invención donde se usa el código unilítero para aminoácidos, A representa Alanina, C Cisteína, D Ácido aspártico, E Ácido glutámico, F Fenilalanina, G Glicina, H Histidina, I Isoleucina, K Lisina, L Leucina, M Metionina, N Asparagina, P Prolina, Q Glutamina, R Arginina, S Serina, T Treonina, V Valina, W Triptófano, Y Tirosina. Dichos códigos unilíteros se conocen comúnmente en la técnica, véase, por ejemplo Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

En lo sucesivo, la invención se ilustra por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS**MATERIALES Y MÉTODOS**Actividad expresada en UGO (unidades de glucosa oxidasa)

- 5 Se determina la actividad de glucosa oxidasa en un ensayo en el que se valora el ácido glucónico formado. Para esto, se añade 1 mL de glucosa oxidasa diluida a 25 mL de disolución precalentada de 30 g/l de glucosa monohidratada a 35 °C. Se prepararon diluciones de muestra y sustrato en tampón HAc 50 mM a pH 5,1, que contenía NaCl 50 mM. Después de 15 minutos de incubación a 35 °C, la reacción se termina mediante la adición de 10 mL de NaOH 0,1 N, al mismo tiempo que se neutraliza el ácido glucónico formado. Se valora el exceso de NaOH con HCl 0,05 M. La diferencia en el consumo de HCl entre una serie de muestras y de blanco es una medida de la cantidad de actividad de glucosa oxidasa. Una unidad de glucosa oxidasa (UGO) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 3 mg de glucosa en ácido glucónico en condiciones del ensayo.

Actividad expresada en UX (unidades de xilanasa)

- 15 Se mide la actividad de xilanasa por la liberación de para-nitrofenol (pNP) de p-nitrofenil-beta-D-xilopiranosido (pNP-X, Sigma-Aldrich N2132), usando un analizador clínico Konelab Arena 30. Se incuban muestras de enzima con el sustrato durante 16 minutos y 40 segundos, después de lo cual se termina la reacción (y se desarrolla el color) mediante la adición de una disolución de parada alcalina.

- 20 Se prepara el sustrato pNP-X disolviendo 100 mg de pNP-X en 50 mL de tampón acetato sódico (30 mM) a pH 4,5. Se diluyen muestras enzimáticas hasta un intervalo entre 0,25 - 1,5 NTXU/mL en tampón acetato sódico 30 mM a la que se añaden 0,2 % de Triton X-100. Se precalientan 156 µL de sustrato en el analizador durante 5 minutos a 37 °C, después de lo cual la reacción empieza mediante la adición de 13 µL de muestra adecuadamente diluida. Después de la incubación, se añaden 80 µL de una disolución 300 mM de carbonato sódico y se mide a 405 nm el aumento de absorbancia resultante como resultado de la actividad enzimática. La actividad se calcula a partir de una calibración de pNP (usando una disolución de pNP de concentración conocida) realizada en el mismo equipo, con los mismos reactivos.

- 25 Se define una XU como la cantidad de enzima que libera 0,06 micromoles de p-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo (pH 4,5, 37 °C)

Rendimiento del horneado

- 30 Se determinó la estabilidad de la masa después de descongelar la masa congelada y fermentar la masa hasta el máximo (como se evalúa por un panadero con experiencia). La estabilidad de la masa se evaluó por un panadero con experiencia tocando la superficie de la masa completamente fermentada y observando cómo la masa respondía a este toque.

Esto se hizo presionando suavemente con uno o más dedos la masa y observando cómo desaparecía la abolladura así obtenida. Cuanto más rápido y más lejos volvió la superficie de la masa a la forma que tenía antes de tocarla, más alta se consideró la estabilidad de la masa.

- 35 La estabilidad de la masa se evaluó en una escala de 1 a 10: con 1 como no estable y 10 como muy estable. Por lo tanto, un mayor número de estabilidad de la masa indica una mayor estabilidad de la masa. Una estabilidad de la masa mayor que la referencia se considera una estabilidad de la masa mejorada. Una estabilidad de la masa de 6 se considera una estabilidad de la masa suficiente.

- 40 Se determinó el volumen del producto horneado usando un Volscan Profiler 600, Texture technologies, Hamilton, EE. UU. Un volumen mayor que la referencia se considera un volumen mejorado.

La rotura del producto horneado se determinó por inspección visual por un panadero con experiencia que evalúa la rotura. Se evaluó la rotura en una escala de 1 a 10: con 1 como cerrada y 10 como muy abierta. Por lo tanto, un número de rotura mayor indica una mayor rotura. Una rotura mayor que la referencia se considera una rotura mejorada. Una rotura de 6 se considera una rotura suficiente.

- 45 **Ejemplo 1 El efecto de glucosa oxidasa de *Penicillium* y xilanasa de *Talaromyces* sobre la baguette preparada a partir de masa congelada.**

Se preparó una masa de pan mezclando y amasando los ingredientes listados en la Tabla 1 junto con las enzimas listadas en la Tabla 2 a 4.

Tabla 1 Receta básica de pan

Ingrediente	Gramos	% basado en peso de harina	Tipo
Harina para pan	3000	100	Epi-B, Paniflour, Bélgica
Levadura	105	3,5	Koningsgist, AB Mauri, Países Bajos
Sal	54	1,8	NaCl
Ácido ascórbico	150 ppm		DSM / DNP Suiza
Alfa-amilasa fúngica	1 ppm		BakeZyme® P500 BG, DSM, Países Bajos
Amiloglucosidasa fúngica	100 ppm		BakeZyme® AG1100 BG, DSM, Países Bajos
Agua	1740	58	

Se usaron dos glucosa oxidasas, una glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum* (Bakezyme® Go Pure de DSM, Países Bajos) y, no según la invención, glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (BakeZyme® GO10.000 BG, de DSM, Países Bajos).

Se usaron dos xilanasas, una xilanasas de *Talaromyces* (Bakezyme® FXP 1500 de DSM, Países Bajos) y, no según la invención, xilanasas de *Aspergillus niger* (Bakezyme® HSP6000 de DSM, Países Bajos).

Los ingredientes se amasaron en una masa bien desarrollada con una temperatura interna de 20 °C (+/- 0,5 °C) usando una Diosna SP-12, 1ª velocidad: 400 revoluciones o 17 Wh para 3 kg de harina y después la 2ª velocidad: 112 Wh para 3 kg de harina.

Todas las recetas con combinación de enzimas como se especificaron en las Tablas 2-4 se amasaron en las mismas condiciones.

Entonces, la masa se dividió en trozos de masa (20 trozos de 250 gramos) y se formaron. Los trozos de masa formados se pusieron en una bandeja y se pusieron en un congelador Hein Shock establecido a -35 grados Celsius durante 90 minutos. Los trozos de masa se metieron en una bolsa de plástico (10 por bolsa) y se almacenaron en un congelador establecido a -18 grados Celsius.

Después de 1 semana, 5 semanas y 15 semanas de almacenamiento congelado, los trozos de masa se sacaron del congelador, se descongelaron lentamente y se calentaron hasta 20 °C con control de humedad (85 % de HR), a la que se fermentaron hasta el volumen deseado. Se evaluó la estabilidad de la masa de los trozos de masa formados como se ha descrito anteriormente en Métodos y materiales. Después de evaluar la estabilidad de la masa, se greñaron los trozos de masa (cortar 3 veces diagonalmente a través de la piel de la masa), con un cuchillo afilado.

Cada trozo de masa se horneó durante 25 minutos a 240 °C con vapor de agua inyectado inmediatamente después de la fermentación. Se sacaron del horno las baguettes así obtenidas y se dejó que se enfriaran sobre una rejilla a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. Se evaluó el volumen y la rotura del producto horneado como se ha descrito anteriormente en Métodos y materiales.

Los resultados se listan en las Tablas 2-4 a continuación.

ppm significa mg/kg, por ejemplo 20 ppm significa 20 mg del producto indicado por kg de harina.

Se usan las siguientes abreviaturas en las Tablas 2-4:

HSP: Bakezyme® HSP 6000: xilanasas de *Aspergillus niger*, de DSM Food Specialties, Países Bajos.

FXP: Bakezyme® FXP 1500: xilanasas de *Talaromyces emersonii*, de DSM Food Specialties, Países Bajos.

GOPure: Bakezyme® Go Pure: glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum*, de DSM Food Specialties, Países Bajos.

Bkz GO 10000: Bakezyme® GO10.000 BG, glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, de DSM Food Specialties, Países Bajos.

GOPure: Bakezyme® Go Pure: glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum*, de DSM Food Specialties, Países Bajos.

Tabla 2 Volumen de baguette preparada a partir de masa congelada almacenada a -18 grados Celsius durante diversos periodos de tiempo (1, 5, 15 semanas). El volumen medido para HSP6000 30 ppm se establece al 100 % para cada uno de los diferentes periodos de congelación.

	Volumen		
	1 semana	5 semanas	15 semanas
HSP6000 30 ppm	100,0 %	100,0 %	100,0 %
HSP6000 30 ppm + 20 ppm de GOPure	103,6 %	106,8 %	104,4 %
HSP6000 30 ppm + 20 ppm de Bkz GO 10000	106,5 %	106,6 %	105,9 %
FXP 30 ppm	96,9 %	94,9 %	84,9 %
FXP 30 ppm + 20 ppm de GOPure	107,7 %	108,4 %	109,4 %
FXP 30 ppm + 20 ppm de Bkz GO 10000	99,9 %	99,0 %	93,7 %
(1 semana significa 1 semana de almacenamiento congelado después de la fecha de producción de la masa, etc.).			

- 5 En la Tabla 2 se puede observar (muestra con tanto FXP como GOPure según la invención, las otras muestras son comparativas) que el volumen de la baguette preparada a partir de una masa que se ha almacenado congelada, es decir, la baguette preparada a partir de una masa congelada que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces* (20 ppm de GOPure + FXP 30 ppm resp.), es mayor que el volumen de la referencia. La referencia que es la baguette preparada a partir de la una masa que se ha preparado a partir de una masa congelada
- 10 que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasas de *Talaromyces*. Por tanto, el producto horneado preparado a partir de una masa que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces* tiene un volumen mejorado en comparación con la referencia.

Tabla 3 Abertura / rotura de la corteza de la baguette preparada a partir de masa congelada almacenada a -18 grados Celsius durante diversos periodos de tiempo (1, 5, 15 semanas).

Abertura / rotura de la corteza			
	1 semana	5 semanas	15 semanas
HSP6000 30 ppm	6	6	5
HSP6000 30 ppm + 20 ppm de GOPure	7,5	7	6
HSP6000 30 ppm + 20 ppm de Bkz GO 10000	7,5	7	6
FXP 30 ppm	6	6	5
FXP 30 ppm + 20 ppm de GOPure	8,5	8	6,5
FXP 30 ppm + 20 ppm de Bkz GO 10000	7,5	7	6
(1 semana significa 1 semana de almacenamiento congelado después de la fecha de producción de la masa, etc.).			

- 15 En la Tabla 3 se puede observar (muestra tanto FXP como GOPure según la invención, las otras muestras son comparativas) que la rotura de la baguette preparada a partir de una masa que se ha almacenado congelada, es decir, una baguette preparada a partir de una masa congelada que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces* (20 ppm de GOPure + FXP 30 ppm resp.), es mayor que la rotura de la referencia. La referencia que es la baguette preparada a partir de la una masa que se ha preparado a partir de una masa congelada que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasas de *Talaromyces*. Por tanto, el producto horneado preparado a partir de una masa que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasas de *Talaromyces* tiene una rotura mejorada en comparación con la referencia.
- 20

Tabla 4 Estabilidad de la masa de masa que se ha almacenado congelada a -18 grados Celsius durante diversos periodos de tiempo (1, 5, 15 semanas).

Estabilidad de la masa			
	1 semana	5 semanas	15 semanas
HSP6000 30 ppm	6	6	5
HSP6000 30 ppm + 20 ppm de GOPure	7,5	7	6
HSP6000 30 ppm + 20 ppm de Bkz GO 10000	7,5	6,5	6
FXP 30 ppm	6	6	5
FXP 30 ppm + 20 ppm de GOPure	8	7,5	7
FXP 30 ppm + 20 ppm de Bkz GO 10000	7,5	7	6
(1 semana significa 1 semana de almacenamiento congelado después de la fecha de producción de la masa, etc).			

En la Tabla 4 se puede observar (muestra con tanto FXP como GOPure según la invención, las otras muestras son comparativas) que la estabilidad de la masa de una masa que se ha almacenado congelada, por lo que la masa comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* (20 ppm de GOPure + FXP 30 ppm resp.), es mayor que la estabilidad de la masa de la referencia. Siendo la referencia la masa que no comprende ni la glucosa oxidasa de *Penicillium* ni la xilanasa de *Talaromyces*. Por tanto, la masa que comprende la glucosa oxidasa de *Penicillium* y la xilanasa de *Talaromyces* tiene estabilidad mejorada de la masa en comparación con la referencia.

Ejemplo 2 (comparativo)

Glucosa oxidasa de *Penicillium*, glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* y blanco.

Se preparó masa de pan mezclando y amasando los ingredientes listados en la Tabla 5 junto con las enzimas listadas en las Tablas 6 a 8. Se siguió el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 1.

Tabla 5 Receta básica de pan

Ingrediente	Gramos	% basado en peso de harina	Tipo
Harina para pan	3000	100	Epi-B, Paniflour, Bélgica
Levadura	105	3,5	Koningsgist, AB Mauri, Países Bajos
Sal	54	1,8	NaCl
Ácido ascórbico	150 ppm		DSM / DNP Suiza
Alfa-amilasa fúngica	1 ppm		BakeZyme® P500 BG, DSM, Países Bajos
Amiloglucosidasa fúngica	100 ppm		BakeZyme® AG1100 BG, DSM, Países Bajos
Agua	1740	58	

Todas las recetas que se especificaron en las siguientes Tablas 6-8 se amasaron en las mismas condiciones. Se evaluó la estabilidad de la masa de los trozos de masa formados como se ha descrito anteriormente en Métodos y materiales. Se evaluó el volumen y la rotura del producto horneado como se ha descrito anteriormente en Métodos y materiales. Los resultados se listan en las Tablas 6-8. ppm significa mg/kg, por ejemplo, 20 ppm significa 20 mg del producto indicado por kg de harina.

Se usan las siguientes abreviaturas en las Tablas 6-8:

Bkz GO 10000: BakeZyme® GO10.000 BG, glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, de DSM Food Specialties, Países Bajos.

GOPure: Bakezyme® Go Pure: glucosa oxidasa de *Penicillium chrysogenum*, de DSM Food Specialties, Países Bajos.

Blanco significa que no se añadieron HSP, FXP, Bkz GO 10000 y/o GOPure. (HSP: Bakezyme® HSP 6000; FXP: Bakezyme® FXP 1500, véanse los detalles en el Ejemplo 1.)

- 5 **Tabla 6** Volumen de baguette preparada a partir de masa congelada almacenada a -18 grados Celsius durante diversos periodos de tiempo (1, 5, 15 semanas). El volumen medido para HSP6000 30 ppm (como se determinó en el Ejemplo 1) se establece a 100 % para cada uno de los diferentes periodos de congelación.

	Volumen		
	1 semana	5 semanas	15 semanas
Blanco	82,1 %	81,1 %	82,4 %
20 ppm de GoPure	83,8 %	82,3 %	84,2 %
20 ppm de Bkz GO 10000	88,1 %	86,6 %	87,6 %
(1 semana significa 1 semana de almacenamiento congelado después de la fecha de producción de la masa, etc).			

- 10 **Tabla 7** Abertura / rotura de la corteza de la baguette preparada a partir de masa congelada almacenada a -18 grados Celsius durante diversos periodos de tiempo (1, 5, 15 semanas).

Abertura / rotura de la corteza			
	1 semana	5 semanas	15 semanas
Blanco	5	5	5
20 ppm de GoPure	6	6	6,5
20 ppm de Bkz GO 10000	6	6,5	7
(1 semana significa 1 semana de almacenamiento congelado después de la fecha de producción de la masa, etc).			

Tabla 8 Estabilidad de la masa de masa que se ha almacenado congelada a -18 grados Celsius durante diversos periodos de tiempo (1, 5, 15 semanas).

Estabilidad de la masa			
	1 semana	5 semanas	15 semanas
Blanco	5	5	5
20 ppm de GoPure	7,5	7	7
20 ppm de Bkz GO 10000	7	6,5	7
(1 semana significa 1 semana de almacenamiento congelado después de la fecha de producción de la masa, etc).			

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> MÉTODO DE PREPARACIÓN DE UNA MASA

20 <130> 31090-WO-PCT

<160> 4

<170> BiSSAP 1.2

5 <210> 1

<211> 604

<212> PRT

<213> *Penicillium chrysogenum*

10 <220>

<221> SEÑAL

<222> 1..18

<400> 1

15

```

Met Lys Ser Thr Ile Ile Thr Ser Ile Leu Phe Ser Val Ala Ala Val
1      5      10      15
Gln Ala Tyr Ser Pro Ala Glu Gln Ile Asp Val Gln Ser His Leu Leu
20      25      30
Ser Asp Pro Thr Lys Val Glu Gly Glu Thr Tyr Asp Tyr Val Ile Ala
35      40      45
Gly Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Val Ala Ala Lys Leu Ser Glu Asn
50      55      60
Pro Lys Ile Lys Val Leu Val Ile Glu Lys Gly Phe Tyr Glu Ser Asn
65      70      75      80
Asp Gly Pro Ile Ile Glu Asp Pro Asn Ala Tyr Gly Glu Ile Phe Gly
85      90      95
Thr Ser Val Asp Gln Asn Tyr Leu Thr Val Pro Leu Ile Asn Asn Arg
100     105     110
Thr Gly Glu Ile Lys Ser Gly Leu Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Ile
115     120     125
Asn Gly Asp Ser Trp Thr Arg Pro Asp Lys Val Gln Ile Asp Ser Trp
130     135     140
Glu Lys Val Phe Gly Met Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Phe Gln
145     150     155     160
Tyr Met Gln Lys Ala Glu Arg Ser Arg Pro Pro Thr Ala Ala Gln Ile
165     170     175
Glu Ala Gly His Phe Tyr Asp Pro Ala Cys His Gly Thr Asp Gly Thr
180     185     190
Val His Ala Gly Pro Arg Asp Asn Gly Lys Pro Trp Ser Pro Leu Met
195     200     205
Arg Ala Leu Met Asn Thr Val Ser Ala Phe Gly Val Pro Val Gln Lys
210     215     220
Asp Phe His Cys Gly His Pro Arg Gly Val Ser Met Ile Pro Asn Asn
225     230     235     240
Leu His Glu Asn Gln Ile Arg Ala Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu
245     250     255
Pro Asn Tyr Gln Arg Asp Asn Leu Gln Ile Leu Thr Gly Gln Lys Val
260     265     270
Gly Lys Val Leu Phe Asn Gln Thr Ala Ser Gly Pro Lys Ala Val Gly
275     280     285
Val Asn Phe Gly Thr Asn Lys Ala Val Asn Phe Asn Val Tyr Ala Lys
290     295     300
Gln Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Ile Ser Pro Leu Ile Leu
305     310     315     320

```

ES 2 856 766 T3

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Ile Lys Ser Val Leu Asp Lys Ala Gly Val
 325 330 335
 Lys Gln Leu Leu Glu Leu Pro Val Gly Leu Asn Met Gln Asp Gln Thr
 340 345 350
 Thr Thr Thr Val Arg Ser Arg Ala Asn Asn Ala Pro Gly Gln Gly Gln
 355 360 365
 Ala Ala Tyr Phe Ala Asn Phe Thr Glu Val Leu Gly Asp His Ala Ala
 370 375 380
 Gln Gly Ile Lys Leu Leu Asp Thr Lys Leu Asp Gln Trp Ala Glu Glu
 385 390 395 400
 Thr Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Val Thr Ala Leu Lys Ile Gln
 405 410 415
 Tyr Glu Asn Tyr Arg Asn Trp Leu Leu Asp Glu Asp Val Ala Phe Ala
 420 425 430
 Glu Leu Phe Phe Asp Thr Glu Gly Lys Ile Asn Phe Asp Ile Trp Asn
 435 440 445
 Leu Ile Pro Phe Thr Arg Gly Ser Val His Ile Leu Ser Ser Asp Pro
 450 455 460
 Tyr Leu Trp Gln Tyr Ala Asn Asp Pro Lys Phe Phe Met Asn Glu Leu
 465 470 475 480
 Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Lys Leu Gly Arg Glu Leu Ser
 485 490 495
 Ser Ala Gly Glu Met Lys Lys Tyr Tyr Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly
 500 505 510
 Asp Asn Leu Pro Gln Asp Ala Thr Val Glu Gln Trp Glu Asp Tyr Val
 515 520 525
 Met Met Asn Phe Arg Pro Asn Trp His Ala Val Ser Thr Cys Ser Met
 530 535 540
 Met Ser Arg Glu Leu Gly Gly Val Val Asp Ala Thr Ala Lys Val Tyr
 545 550 555 560
 Gly Thr Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln
 565 570 575
 Val Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Gly Met Ala Leu Arg Ile
 580 585 590
 Ala Glu Ser Val Leu Glu Asp Tyr Ala Lys Lys Ala
 595 600

<210> 2

<211> 1816

5 <212> ADN

<213> *Penicillium chrysogenum*

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1816

<223> /organismo="*Penicillium chrysogenum*" /tipo_moles="ADN sin asignar"

<220>

<221> péptido_señal

15 <222> 1..54

<220>

<221> terminador

<222> 1813..1816

ES 2 856 766 T3

<400> 2

atgaagtcca ctattatcac ctccattctc ttctctgtgg ctgccgtcca ggcctatagc	60
ccggccgagc agatcgacgt ccagtctcac ctgctttctg accccaccaa ggtcgaggga	120
gagacttacg actatgtcat tgctgggtgg ggtttgactg gtctgaccgt ggctgccaaag	180
ctgtctgaaa acccgaagat caaagtcctt gtgattgaga agggattcta cgaatccaac	240
gatggaccga tcatcgagga cccaacgcc tatggggaga tctttggaac tagtgtggat	300
cagaattatc tcacagttcc cctcatcaac aaccgaactg gggaaattaa gtctggcctc	360
ggtcttggtg gctcgacctt gatcaacggc gattcctgga cccgccccga caaggtccag	420
atcgactcat gggaaaaggc ctttggcatg gagggctgga actgggacaa tgtcttccag	480
tacatgcaga aagctgagcg ctgcgcggcc cggactgccg cccagattga agccggtcac	540
ttctacgacc ctgcctgtca tggaacagac ggaaccgttc atgccggccc tcgcgacaac	600
ggcaagcctt ggtccccact gatgcgagcc ctcatgaaca ccgtctccgc tttcgggtgc	660
cccgctccaga aggacttcca ctgcgggtcac ccccggtggtg tctcgatgat cccgaacaac	720
ctccatgaga accagatccg ggctgatgcc gctcgcgaat ggcttcttcc caactaccag	780
cgcgataacc tgcagatcct gactggccag aaggctcgaa aggttttgtt caaccagacc	840
gcatctggac ctaaggctgt tgggtgtgaac ttcggtagca acaaggctgt taacttcaat	900
gtctacgcca agcaagaagt tctgttggcc gccggatctg ccatttctcc tttgatcctt	960
gaatactccg gtattggtat caagtccgtc cttgacaagg ccggtgttaa gcagctcctc	1020
gaactccctg ttggtctcaa catgcaagac cagaccacta ccaactgttcg gtcccgcgcc	1080
aacaacgcac ctggacaagg ccaggccgct tactttgcca acttcaccga ggttctcggc	1140
gaccacgccg cccagggtat taagttgctg gacaccaagc ttgaccagtg ggccgaggag	1200
accggtgccc gcggtggctt ccacaatgtg actgccctca agatccagta tgagaactac	1260
cgtaactggc tccttgatga ggacgttgca tttgccgagc tcttcttcga cactgagggc	1320
aagatcaact ttgatatctg gaatcttatc cccttcactc gcggttccgt ccacatcctc	1380
agcagtgacc cttacctctg gcaatacgca aatgacccca agttcttcat gaacgagctg	1440
gatcttctcg gccaggccgc tgctactaag ctgggtcgtg agctctctag cgctggtgag	1500
atgaagaagt actacgctgg cgagaccatc cccggcgaca acctgccccca ggatgccacc	1560
gtcgagcagt gggaggacta cgtgatgatg aacttccgtc ctaactggca cgctgttagc	1620
acctgctcta tgatgtcccg cgagcttggt ggtgtcgtcg acgctactgc caaggtctac	1680
ggtactcagg gcctccgtgt cattgacgga tctatccctc ccaactcaggt gtcctctcac	1740
gttatgaccg ttttctacgg tatggccttg cggatcgccg aatccgtcct tgaagactat	1800
gccaagaaag cttaaa	1816

5

<210> 3

<211> 408

<212> PRT

<213> Xilanasa de Talaromyces emersonii

<220>

5

<221> SEÑAL

<222> 1..22

<400> 3

```

Met Val Arg Leu Ser Pro Val Leu Leu Ala Ser Ile Ala Gly Ser Gly
1      5      10      15
Leu Pro Leu Ala Gln Ala Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Ile
20      25      30
Gly Leu Lys Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp
35      40      45
Thr Ala Tyr Glu Thr Gln Leu Asn Asn Thr Gln Asp Phe Gly Gln Leu
50      55      60
Thr Pro Ala Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Glu Gln Asn
65      70      75      80
Val Phe Thr Phe Ser Ala Gly Asp Gln Ile Ala Asn Leu Ala Lys Ala
85      90      95
Asn Gly Gln Met Leu Arg Cys His Asn Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu
100     105     110
Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Ser Trp Thr Asn Glu Thr Leu Leu Ala
115     120     125
Ala Met Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Gln
130     135     140
Cys Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr
145     150     155     160
Tyr Arg Ser Asn Val Phe Tyr Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro
165     170     175
Ile Ala Phe Ala Thr Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr
180     185     190
Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile Glu Tyr Pro Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala
195     200     205
Gln Asn Leu Val Lys Leu Val Gln Ser Tyr Gly Ala Arg Ile Asp Gly
210     215     220
Val Gly Leu Gln Ser His Phe Ile Val Gly Glu Thr Pro Ser Thr Ser
225     230     235     240
Ser Gln Gln Gln Asn Met Ala Ala Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val
245     250     255
Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Met Gln Leu Pro Glu Thr Glu Ala
260     265     270
Leu Leu Thr Gln Gln Ala Thr Asp Tyr Gln Ser Thr Val Gln Ala Cys
275     280     285
Ala Asn Thr Lys Gly Cys Val Gly Ile Thr Val Trp Asp Trp Thr Asp
290     295     300
Lys Tyr Ser Trp Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Asp Ala Cys
305     310     315     320
Pro Trp Asp Ala Asn Tyr Gln Lys Lys Pro Ala Tyr Glu Gly Ile Leu
325     330     335
Thr Gly Leu Gly Gln Thr Val Thr Ser Thr Thr Tyr Ile Ile Ser Pro
340     345     350
Thr Thr Ser Val Gly Thr Gly Thr Thr Thr Ser Ser Gly Gly Ser Gly
355     360     365
Gly Thr Thr Gly Val Ala Gln His Trp Glu Gln Cys Gly Gly Leu Gly
370     375     380
Trp Thr Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Tyr Thr Cys Thr Val Ile
385     390     395     400
Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
405

```

10

<210> 4

<211> 1227

<212> ADN

<213> Xilanasa de Talaromyces emersonii

5

<220>

<221> fuente

<222> 1..1227

<223> /organismo="Xilanasa de Talaromyces emersonii" /tipo_moles="ADN sin asignar"

10

<220>

<221> péptido_señal

<222> 1..66

<220>

15

<221> terminador

<222> 1225..1227

<400> 4

ES 2 856 766 T3

atggttcgcc tcagtcacagt cttgctcgcc tccatcgag gctctggcct gcctctagcc	60
caagcagcag gcctcaacac agccgccaaa gccatcggcc tgaataactt tggcacagcg	120
accgacaacc ccgagctgag cgacaccgag tacgagacgc agctcaacaa cacgcaggat	180
ttcgggcagt tgacgccggc gaattcgatg aagtgggatg ccaccgagcc cgagcagaat	240
gtcttcacgt ttagcgccgg cgatcagatt gccaaacttg ccaaggcgaa tggccagatg	300
ttgcgggtgtc ataatcttgt ttggtacaat cagttgccgt cgtgggtcac cagtggctcc	360
tggaccaacg agacgctgct tgctgccatg aagaatcaca tcaccaacgt cgttacccat	420
tacaagggcc agtgctacgc atgggatgtc gttaatgagg ccctcaacga cgacggcacc	480
taccgcagca acgtcttcta ccagtacatc ggtgaggcgt acatcccat cgccttcgag	540
acggccgccc ccgccgaccc caacgccaaag ctgtactaca acgactacaa catcgagtac	600
ccggggggcca aggcgacggc ggcgcagaac ctggtcaagc tggcgagtc gtacggcgag	660
cgcacgcagc gcgtcgccct gcagtcgcac ttcacgtgg gcgagacgcc cagcaccagc	720
tcccagcagc agaacatggc cgccttcacg gcgctgggag tcgaggtcgc catcaccgag	780
ctcgacatcc gcatgcagct gcccgagacg gaagccctgc tgacgcagca ggccaccgac	840
taccagagca ccgtgcaggc ctgcgccaac accaaggggt gcgtcggcat caccgtctgg	900
gactggaccg acaagtactc gtgggtgccc agcaccttct cgggctatgg cgacgcctgt	960
ccctgggacg ccaactacca gaagaagccc gcgtacgaag gcatcctcac tgggcttgga	1020
cagacggtca ccagcaccac ctacatcatc tcgccgacga cgtctgtcgg aacgggcacg	1080
acgacctcga gcggcggaag cggcggcacg actggcgtgg cccagcattg ggagcagtgc	1140
ggtggactgg gctggactgg tccgacggtt tgcgcaagtg gctacacttg cactgtcatc	1200
aatgagtatt actcgacgtg tctgtaa	1227

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una masa, método que comprende:
 - a) preparar la masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces* a al menos un ingrediente de la masa; y
 - b) enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius,
 en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.
2. Una composición que comprende una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, en donde la glucosa oxidasa de *Penicillium* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 19 a 604 de SEQ ID NO: 1, y en donde la xilanasa de *Talaromyces* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID NO: 3.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde la composición comprende además al menos un ingrediente de la masa.
4. La composición según la reivindicación 3, en donde el al menos un ingrediente de la masa incluye harina y/o ácido ascórbico.
5. Un método de preparación de un producto horneado que comprende las etapas de
 - a. preparar una masa que incluye la etapa de añadir una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en la reivindicación 1, a al menos un ingrediente de la masa; y
 - b. enfriar la masa hasta una temperatura en el intervalo de -40 a -5 grados Celsius para obtener una masa congelada; y
 - c. descongelar la masa congelada para obtener una masa descongelada; y
 - d. hornear la masa congelada.
6. Uso de una glucosa oxidasa de *Penicillium* y una xilanasa de *Talaromyces*, ambas como se definen en la reivindicación 1, para mejorar al menos una propiedad de una masa que se ha almacenado congelada o de un producto horneado preparado a partir de una masa que se ha almacenado congelada.
7. El uso según la reivindicación 6 para mejorar el volumen y/o la rotura de un producto horneado preparado a partir de una masa que se ha almacenado congelada.
8. El uso según la reivindicación 7 para mejorar la estabilidad de la masa de una masa que se ha almacenado congelada.