



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 641**

51 Int. Cl.:
A23L 1/27 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05701014 .2**
96 Fecha de presentación : **13.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1703808**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Nuevo proceso para blanquear productos alimentarios.**

30 Prioridad: **13.01.2004 EP 04075123**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:
Mutsaers, Johanna, Henrica, Gerdina, Maria;
Wenzel, Thibaut, José;
De Boer, Lex;
Van Dijk, Albertus, Alard y
Van Rooijen, Rutger, Jan

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 361 641 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).

DESCRIPCION

Nuevo proceso para blanquear productos alimentarios.

La presente invención se refiere a un método para preparar un producto alimentario más blanco y al producto alimentario obtenido.

5 En algunos tipos de productos alimentarios se considera deseable que al menos parte del producto alimentario sea de color blanco, por ejemplo, en productos lácteos como quesos, suero lácteo, mantequilla y leche en polvo, y en productos a base de harina como el pan y los fideos.

10 Sin embargo, las materias primas o los productos intermedios de dichos productos alimentarios pueden comprender pigmentos que pueden hacer que el color del producto alimentario sea entre blanquecino y amarillo. Algunos ejemplos de estos pigmentos son carotenoides (carotenos y xantófilos) y flavonas.

15 En el pan blanco, por ejemplo, la miga blanca se considera una propiedad deseable. Se puede obtener una miga más blanca utilizando enzimas tales como catalasa, peroxidasa, lipasa y/o lipoxigenasa, remítase, por ejemplo, a 'Oxido-reductases and Lipases as Dough- Bleaching Agent' de P. Gélinas *et al.*, Cereal Chem, 75 (6), 810-814 (1998). Todas las enzimas mencionadas ejercen un efecto blanqueador sobre la miga. En la actualidad, la industria de los productos horneados emplea mayoritariamente harina de soja con enzima activa, que contiene lipoxigenasas. Las lipoxigenasas de la harina de soja son capaces de blanquear pigmentos de la harina de trigo como resultado de la acción de radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno que se forman durante la oxidación de ácidos grasos por parte de la lipoxigenasa. Esta reacción se denomina oxidación conjunta. En la harina de soja, se encuentran tres lipoxigenasas: L1, L2 y L3, entre las cuales L2 y L3 poseen la mejor actividad blanqueadora (W. Grosch, G. Laskawy y F. Weber, J. Agric. Food Chem 24 (1976), 456). La harina de soja no solo contiene lipoxigenasas sino que también los ácidos grasos que se necesitan para el efecto blanqueador, lo cual da como resultado un mejor efecto blanqueador.

20 Un inconveniente asociado con el uso de la soja como fuente de lipoxigenasa es que hoy en día la mayoría de la soja está modificada genéticamente (OMG). Como los consumidores prefieren a nivel mundial utilizar aditivos para mejorar el pan derivados de productos que no sean OMG, se necesita con urgencia encontrar una alternativa a la lipoxigenasa de la soja.

25 Las enzimas conocidas diferentes de las lipoxigenasas L2 y L3 de la soja presentan el inconveniente de que su rendimiento no es tan bueno como el de las lipoxigenasas de la soja. En la práctica, para obtener la blancura deseada, estas enzimas se deben combinar con cofactores u otras enzimas para alcanzar el nivel deseado de blancura de la miga.

30 Las peroxidasas catalizan de forma no enzimática la oxidación, por acción del oxígeno molecular, de compuestos insaturados, p. ej., ácidos grasos insaturados. (C. E. Eriksson *et al.*, JAOS 48 (1971) 442). Estos ácidos grasos oxidados generan radicales que probablemente reaccionan con los pigmentos de la harina para obtener productos menos coloreados de forma similar a los productos de la reacción con lipoxigenasa.

35 Es el objetivo de la presente invención proporcionar un producto alimentario nuevo que sea más blanco al menos en parte. Este objetivo se logra mediante un proceso nuevo de producción de un producto alimentario en el que una forma intermedia de dichos productos alimentarios comprende un pigmento y dicho proceso comprende añadir al menos una enzima que convierte directamente dicho pigmento de forma eficaz en una forma que produce un aumento de la blancura de al menos parte del producto alimentario en comparación con el producto alimentario al que no se le añade dicha enzima durante su producción.

40 En la presente y en lo sucesivo, se hace referencia a las enzimas capaces de convertir directamente el pigmento en una forma que produce un aumento de la blancura como enzimas blanqueadoras. Estas enzimas pueden ejercer un efecto blanqueador directo sobre los pigmentos de varias formas. Por ejemplo, los pigmentos se pueden convertir directamente saturando los enlaces insaturados de los pigmentos, por ejemplo, por hidrogenación, o los pigmentos se pueden escindir directamente para formar productos de degradación. El término directa/o quiere decir que estas enzimas actúan sobre el pigmento como sustrato en sí. No se excluye específicamente el uso de cofactores para lograr la conversión.

45 En la presente y en lo sucesivo, se hace referencia a las enzimas capaces de escindir directamente los pigmentos como enzimas escisoras. Las enzimas escisoras adecuadas de acuerdo con la invención son enzimas que son capaces de escindir carotenoides (carotenos y xantófilos) y flavonas. Los carotenoides se pueden escindir de dos formas diferentes, central y excéntrica.

50 La escisión central de carotenoides da como resultado la formación de retinoides (C₂₀-compuestos).

La escisión excéntrica puede proporcionar un grupo más diverso de compuestos, como por ejemplo, ácido abscísico. Una enzima capaz de llevar a cabo la escisión central de carotenoides es, por ejemplo, (β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (EC 1.14.99.36) como se describe, por ejemplo, en EP-A-1031623 y J. Lintig y K Vogt (2000) J. Biol. Chem. 275, 11915. Esta enzima se conocía anteriormente como beta-caroteno 15,15'-dioxigenasa = EC 1.13.11.21.

5 Una ventaja adicional del uso de enzimas que son capaces de llevar a cabo la escisión central es la formación de retinoides. Estos son componentes esenciales de la visión. El β -caroteno se escinde en dos moléculas de retinal. Este retinal se puede modificar para obtener retinol, también conocido como vitamina A. Los ejemplos de enzimas capaces de llevar a cabo la escisión excéntrica de carotenoides son la 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (p. ej., X. Qin y J. A. D. Zeevaart (1999), Proc. Nat. Acad. Science, 96, 15354) y la β -caroteno 9', 10'-dioxigenasa (p. ej., Kiefer *et al.* (2001), J.

10 Biol. Chem. 287, 14110).

En la presente, se define una forma intermedia del producto alimentario como cualquier forma producida durante el proceso de producción antes de obtener la forma final del producto alimentario. La forma intermedia puede comprender las materias primas individuales empleadas y/o una de sus mezclas, y/o mezclas con aditivos y/o aditivos de procesado, o una de sus formas procesadas posteriormente.

15 La enzima se añade en cantidades eficaces. Un experto puede determinar fácilmente esta cantidad eficaz, variando la dosis de enzima y midiendo la degradación de los pigmentos y/o el aumento de blancura del producto alimentario final. En el caso en que la enzima sea capaz de convertir beta-caroteno, la cantidad eficaz de la enzima se puede expresar en términos de unidades beta-degradantes (p. ej., unidades de Aziz o Zorn – remítase a Materiales y métodos).

20 El producto alimentario puede obtenerse a partir de al menos una materia prima de origen vegetal, tal como harina de trigo. Esta última se sabe que contiene pigmentos tales como carotenoides (carotenos y xantófilos) y flavonas, que son responsables de, por ejemplo, el color de la miga del pan horneado. Como alternativa, estos pigmentos pueden provenir de otras fuentes que no sean materias primas vegetales, p. ej., de la leche. Los ejemplos de carotenoides son otras sustancias con un esqueleto de caroteno, en particular con un esqueleto de beta-caroteno o capsantina, más particularmente alfa- y beta-caroteno, luteína, licopeno, anteraxantina, capsantina, zeaxantina, violaxantina, astaxantina, cantaxantina, luteoxantina, neoxantina y los respectivos apo-carotenoides.

25 Un producto alimentario preferido para el proceso de acuerdo con la invención es pan horneado y otros productos horneados obtenidos a partir de harina de trigo y/o harinas procedentes de otros cereales.

30 Por ejemplo, cuando el producto alimentario es pan horneado, las formas intermedias comprenden, por ejemplo, harina de trigo, su mezcla inicial con otros ingredientes del pan, como por ejemplo, agua, sal, levadura y composiciones que mejoran el pan, la masa mezclada, la masa amasada, la masa levada y la masa parcialmente horneada. En el caso en que la enzima sea capaz de convertir beta-caroteno, la enzima se añade a la harina de trigo y/o harinas procedentes de otros cereales o a cualquier mezcla inicial con otros ingredientes del pan, en una cantidad tal que se obtengan de entre 1 y 5000 unidades de Zorn por kg de harina, preferentemente de entre 5 y 1000 unidades de Zorn por kg de harina, más preferentemente de entre 10 y 500 unidades de Zorn por kg de harina y de la forma más preferente de entre 25 y 250 unidades de Zorn por kg de harina. La enzima también se puede añadir junto con una mezcla para mejorar el pan, o como integrante de esta, con otra masa y/o aditivos para mejorar el procesado del pan conocidos en la técnica, tales como una o más enzimas conocidas en la técnica (p. ej., enzimas amilolíticas tales como alfa-amilasa, beta-amilasa, amiloglucosidasa, alfa-amilasa maltogénica antienviejecimiento, enzimas lipolíticas tales como lipasa, fosfolipasa, galactolipasa, enzimas oxidantes tales como glucosa oxidasa, hexosa oxidasa, lacasa, piranosa oxidasa, carbohidrato oxidasa, enzimas hemicelulolíticas tales como xilanasas, arabinofuranosidasa, enzimas celulolíticas tales como endo-glucanasas (como celulasas), celobiohidrolasas, proteasas y/o aditivos de procesado químico conocidos en la técnica tales como agentes reductores y oxidantes (p. ej., ácido ascórbico, glutatión), emulsionantes (p. ej., DATEM) etcétera.

35 En algunos tipos de fideos, un producto blanco se considera deseable. Por ejemplo, para fideos, las formas intermedias comprenden, por ejemplo, harina de trigo, su mezcla inicial con agua, sal y otros ingredientes de los fideos, la masa mezclada y los fideos obtenidos como producto final que pueden ser frescos, estar secos, hervidos, cocidos al vapor y/o fritos.

40 El producto alimentario también puede ser un producto lácteo. Producto lácteo se refiere a los productos que contienen al menos un 10% en peso, preferentemente al menos un 30% en peso, más preferentemente al menos un 50% en peso, aún más preferentemente al menos un 70% en peso o de la forma más preferida al menos un 80% en peso en base sólida seca de componentes que provienen de la leche, preferentemente de leche de vaca. Los componentes que provienen de la leche son, por ejemplo, grasas, proteínas, por ejemplo, cuajada de queso a base de

suero láctico y caseína, etc. La leche, especialmente la leche de vaca, puede contener de forma natural compuestos colorantes tales como carotenoides, por ejemplo, beta-caroteno.

La blancura desempeña una función fundamental, por ejemplo, en el queso, la mantequilla fundida, la leche en polvo o productos a base de suero lácteo. Por ejemplo, para quesos como el Feta, Mozzarella, Ricotta y queso azul, por ejemplo, el Danish Blue, Roquefort o Gorgonzola, la blancura se considera deseable. En quesos en los que la leche de cabra u oveja se sustituye al menos parcialmente por leche de vaca, la blancura del queso puede suponer un problema debido al β -caroteno que está presente en la leche de vaca.

Para algunos quesos se emplean agentes colorantes alimentarios naturales como el annatto o el beta-caroteno. Sin embargo, este agente colorante también estará presente en el suero lácteo. Cuando este suero lácteo se procesa aún más, por ejemplo, para obtener un preparado para lactantes, el color del producto a base de suero lácteo puede que no sea deseable. Para el producto alimentario queso de pasta blanda, los productos intermedios comprenden, p. ej., lecho y cuajada de queso.

La enzima se puede añadir como un preparado enzimático o puede ser producida *in situ* por un microorganismo capaz de producir dicha enzima. El preparado enzimático se puede derivar de varias fuentes, por ejemplo, plantas, animales y microorganismos. Preferentemente, el preparado enzimático se deriva de un microorganismo, ya que los microorganismos hacen que sea posible obtener la enzima a escala industrial de una forma controlada. El preparado enzimático derivado de un microorganismo se puede obtener mediante procesos de fermentación clásicos de una cepa microbiana seleccionada o mediante la fermentación de un microorganismo que sobreexpresa la enzima. El microorganismo puede ser una bacteria, un hongo o una levadura. Los ejemplos de microorganismos adecuados son *Microcystis*, *Lepista*, por ejemplo, *L. irina*, *Cyathus*, por ejemplo, *C. pallidus*, *Ganoderma*, por ejemplo, *G. applanatum*, *Ischnoderma*, por ejemplo, *I. benzoinum*, *Marasmius*, por ejemplo, *M. scorodoni*, *Trametes*, por ejemplo, *T. suaveolens* de *T. versicolour*, *Cryptococcus*, por ejemplo, *C. laurentii*, *Hypomyces*, por ejemplo, *H. odoratus* o *Phaffia*, por ejemplo, *P. rhodozyma*, *Phanerochaete*, por ejemplo, *P. chrysosporium*, *Lentinula*, por ejemplo, *L. edodes*, *Coprins*, por ejemplo, *C. cinereus*, *Gloeophyllum*, por ejemplo, *G. trabeum*, *Ophiostoma*, por ejemplo, *O. piliferum*, *Aspergillus*, por ejemplo, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *Thermomyces*, por ejemplo, *T. Lanuginosa*, *Sporotrichum*, por ejemplo, *S. thermophile*, *Aureobasidium*, por ejemplo, *A. pullulans*, *Amorphotheca*, por ejemplo, *A. resiniae*, *Leucosporidium*, por ejemplo, *L. scottii*, *Cunninghamella*, por ejemplo, *C. elegans*.

La medida de la blancura de un producto se puede realizar de modo visual o mediante una medida de reflexión, por ejemplo, mediante escaneo. En la medida de reflexión, los colores se cuantifican con tres parámetros: factor L (de negro = 0 a blanco = 100), factor a (de verde = -60 a rojo = +60) y factor b (de azul = -60 a amarillo = +60). En el caso de los carotenoides, el factor b del producto obtenido es preferentemente lo más próximo que sea posible a 0, preferentemente de entre 10 y 0, más preferentemente de entre 5 y 0, e incluso más preferentemente menor de 1 y de la forma más preferente menor de 0,5.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un producto alimentario que se puede obtener mediante el proceso de la invención como se describe anteriormente en la presente. Estos productos alimentarios se caracterizan por que son significativamente más blancos al menos en partes en comparación con productos alimentarios que se pueden obtener mediante procesos de producción que no comprenden añadir una o más enzimas capaces de convertir pigmentos en productos intermedios.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de enzimas que son capaces de convertir pigmentos para blanquear productos alimentarios, por ejemplo, productos a base de harina o derivados lácteos. Sorprendentemente, se descubrió que estas enzimas se pueden emplear de forma conveniente como quitamanchas en detergentes de uso doméstico. En particular, las enzimas resultaron ser muy eficaces a la hora de eliminar manchas de colores, por ejemplo, manchas de verdín, café y té, tanto de tejidos sintéticos como de algodón (p. ej., poliéster). Además, las enzimas también se podrían utilizar en procesos de blanqueado a piedra enzimático, por ejemplo, blanqueando el colorante índigo de los vaqueros azules hasta un nivel deseado.

Materiales y métodos

Medida de la conversión de beta-caroteno

Medida de la degradación de beta-caroteno de acuerdo con Aziz

La actividad enzimática se puede determinar como la actividad de conversión de beta-caroteno de acuerdo con A. Ben Aziz (1971), *Phytochemistry* 10, 1445. Una unidad enzimática se define en dicho documento como la cantidad de

enzima que convierte 1 microgramo de beta-caroteno por minuto min (a la que se hace referencia además como unidad de Aziz).

Medida de la degradación de beta-caroteno de acuerdo con Zorn

5 La actividad enzimática también se puede determinar como la actividad de conversión de beta-caroteno de acuerdo con Zorn *et al.* (2003), Appl. Microbiol. Biotechnol. 62:331-336. Una unidad enzimática se define en la presente como la cantidad de enzima que convierte 1 micromol de beta-caroteno por minuto min (a la que se hace referencia además como unidad de Zorn). El ensayo se llevó a cabo como se indica a continuación: se preincubaron 1,5 ml de muestra que contenía enzima en una cubeta a 27 °C durante 5 min antes de añadir 100 µl de solución patrón de beta-caroteno (véase más adelante). Cuando fue necesario, se diluyó el sobrenadante de cultivo concentrado con un tampón de ácido cítrico/fosfato a pH 5,5 (este tampón se preparó mezclando 43 ml de ácido cítrico 0,1 M con 56 ml de soluciones de Na₂PO₄ 2 M). La disminución de la absorbancia se monitorizó en un periodo de 15 min a 450 nm y 27 °C empleando un espectrofotómetro en una cubeta a temperatura controlada. Se comprobó la linealidad de la curva y la actividad enzimática se calculó con la parte lineal de la curva de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{actividad enzimática [mU/ml]} = (\Delta E \times V_t) \times 10^6 / (V_s \times d \times \epsilon)$$

15 donde U = unidad de actividad enzimática definida anteriormente; ΔE = disminución de la absorbancia a 450 nm por minuto; V_t = volumen total en la cubeta (ml); V_s = volumen de la muestra en la cubeta (ml); ϵ = coeficiente de extinción de beta-caroteno que es 95 000 M⁻¹.cm⁻¹; d = espesor de la cubeta (cm)].

La unidad enzimática de Aziz se puede convertir en la unidad de Zorn dividiendo las unidades de Aziz entre el peso molecular del beta-caroteno = 536,85.

20 Preparación de la solución patrón de beta-caroteno

La solución patrón de beta-caroteno se preparó como se indica a continuación: se disolvieron 5 mg de beta-caroteno y 500 mg de Tween-80 en 50 ml de diclorometano. El diclorometano se evaporó a 40 °C y 800 mbar en un rotavapor. Una vez que casi todo el diclorometano se había evaporado, se añadieron 30 ml de agua y el diclorometano residual se eliminó en el rotavapor y, por último, en una línea de nitrógeno. La solución resultante se filtró y se llevó hasta un volumen de 50 ml con agua en un matraz graduado. La solución se debe conservar fría (nevera) y solo es estable durante unos días.

Blanqueado de productos alimentarios

30 El blanqueado se determinó después de extraer carotenoides de miga o de masa como indicó Gelinas, Cereal Chem. 75, 810-184 (1998). Los carotenoides se determinaron a través de la extracción de lípidos total de la miga de pan como indicó Gelinas (1998).

35 La blancura de un producto alimentario se puede determinar tanto de forma visual como también mediante mediadas de reflexión. La inspección visual se puede llevar a cabo comparando productos alimentarios a los cuales se añade una enzima blanqueadora frente a un control sin enzima blanqueadora añadida. Las medidas de reflexión se pueden llevar a cabo mediante el escaneo del producto alimentario en un escáner de color (Hewlett Packard Scanjet ADF). Estos datos se pueden analizar empleando el programa LabSMART (LabSMART, LLC, Logan Utah, EE. UU.).

Ejemplo 1

Cultivo y determinación de la actividad de la enzima convertidora de beta-caroteno obtenida de *Marasmius scorodonius*

40 El cultivo y la determinación de la actividad de la enzima convertidora de β -caroteno obtenida de *Marasmius scorodonius* se llevó a cabo como describen Zorn *et al.* (2003).

45 En la presente, micelio del cepario de *Marasmius scorodonius* (que se puede adquirir de Centraal Bureau voor Schimmelcultures-Utrecht, Holanda, con el número de depósito CBS 850.87) se empleó para inocular placas de agar suplementadas con beta-caroteno emulsionado. Se llevó a cabo la incubación de las placas a 24 °C durante 14 días. Matraces de agitación de 300 ml que contenían 100 ml de solución nutritiva estándar (SNL, que contenía 30 g/litro de glucosa H₂O; 4,5 g/litro de asparagina H₂O; 1,5 g/litro de KH₂PO₄; 0,5 g/litro de MgSO₄; 3,0 g/litro de extracto de levadura; 1 ml/litro de una solución con elementos traza esterilizada que contenía 5 mg/l de CuSO₄*5ac, 80 mg/l de

5 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{ac}$, 90 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{ac}$, 30 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{ac}$ y 40 mg/l de EDTA; el pH se ajustó a 6,0 con NaOH 1 N antes de la esterilización) se inocularon con micelio y se incubaron a 24 °C durante 7 días en una incubadora agitadora a 150 rpm. Se comprobó que los precultivos estuvieran exentos de contaminación microbiana, se homogenizaron con una Ultra Turrax, y se emplearon para inocular los cultivos principales (250 ml en erlenmeyes de 500 ml). A partir del segundo día, cada día se extrajeron muestras de 2 ml, se centrifugaron para eliminar el micelio y la actividad se midió en un ensayo espectrofotométrico. Tras cultivar durante 4 días, la actividad degradante de beta fue de aproximadamente 0.3 unidades de Zorn por litro de sobrenadante exento de células.

Ejemplo 2 y ejemplos de comparación A, B y C

Ensayo de horneado de hogazas pequeñas

10 En un proceso de horneado estándar se prepararon hogazas pequeñas a partir de 200 g de harina de trigo (una mezcla de 160 g de harina de trigo (Kolibri®-Meneba, Holanda) y 40 gramos de harina de trigo (Ibis®-Meneba, Holanda)), 1.4 g de levadura Fermipan® seca (DSM Bakery Ingredients, Delft, Holanda), 4 g de sal, ácido ascórbico 50 ppm, α -amilasa fúngica Bakezyme® P500 4 ppm (DSM Food Specialties, Delft, Holanda), 60 ppm de hemicelulasa Bakezyme® HS2000 fúngica (DSM Food Specialties, Delft, Holanda) y la cantidad de la enzima que degrada el beta-caroteno indicada en la Tabla 1 y 116 ml de agua en un mezclador de páas durante 6 minutos y 15 segundos. La temperatura de la masa era de 28 °C. Directamente después de mezclar, la masa se dividió en dos partes de 150 g cada una, se redondeó y se levó durante 45 minutos en un fermentador a 30 °C, se le dio forma y se introdujo en un molde. Después de un levado final de 70 minutos a 30 °C, la masa se horneó durante 20 minutos a 225 °C.

20 Pasadas 24 h de almacenamiento en una caja cerrada a temperatura ambiente, la calidad de la miga y el color del pan horneado fueron evaluados por el panadero; la cantidad de carotenoides se determinó después de la extracción de la miga del pan como se indica en la Tabla 2.

Tabla 1. Dosis de enzima (expresada como unidades de Zorn por 200 gramos de harina)

| Enzima de | Ensayo | Hogaza A | Hogaza B | Hogaza C | Hogaza 1 |
|----------------------------------|--------|----------|----------|----------|----------|
| Harina de soja con enzima activa | Aziz | - | 18,6 | - | - |
| Enzima lipoxigenasa 2 de la soja | Aziz | - | - | 18,6 | - |
| <i>Marasmius scorodoni</i> | Zorn | - | - | - | 18,6 |

Tabla 2. Contenido de carotenoides de las hogazas e identificación visual

| | Hogaza A | Hogaza B | Hogaza C | Hogaza I |
|-----------------------------|-------------|----------|-------------|----------|
| % de carotenoides presentes | 100 | 8 | 30 | 5 |
| Inspección visual | Amarillenta | Blanca | Blanquecina | Blanca |

25 En vista de la Tabla 2 se puede concluir que añadiendo las enzimas blanqueadoras de acuerdo con la invención a la masa, los carotenoides se degradan, lo cual da como resultado una miga más blanca. La eficacia del proceso de acuerdo con la invención es mejor que para la enzima Lipoxigenasa 2 de la soja empleada, y al menos igual o mejor que utilizar la harina de soja con enzima activa.

Ejemplo 3

Preparación de miniquesos

30 Se elaboraron quesos en miniatura como describe Shakeel-Ur-Rehman *et al.* (Protocol for the manufacture of miniature cheeses in Lait, 78, (1998), 607-620). Se pasteurizó leche de vaca cruda calentándola durante 30 minutos a 63 °C. La leche pasteurizada se transfirió a botellas de centrifugación de plástico de boca ancha (200 ml por botella) y se enfrió hasta 31 °C. Posteriormente, se añadieron 0.72 ml del cultivo iniciador DS 5LT1 (DSM Gist B. V., Delft, Holanda) a cada uno de los 200 ml de leche pasteurizada contenidos en las botellas de centrifugación y la leche se dejó madurar durante 20 minutos. A continuación, se añadió CaCl_2 (132 μL de una solución de 1 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ por 200 ml de leche

madura), seguido de la adición del coagulante (IMCU 0,04 por ml). En el caso en que el experimento implicó el uso de la enzima blanqueadora I o II, esta enzima se añadió junto con el coagulante.

5 Las soluciones de leche se mantuvieron durante 40-50 minutos a 31 °C hasta que se formó un coágulo. El coágulo se fragmentó manualmente con alambres estirados cortantes, con 1 cm de separación entre sí, sobre un marco. Se permitió curar durante 2 minutos y a continuación se agitó suavemente durante 10 minutos. Tras lo cual, la temperatura se aumentó gradualmente hasta 39 °C en 30 minutos con agitación continua de la mezcla de cuajada/suero lácteo. Cuando se alcanzó un pH de 6,2, las mezclas de cuajada/suero lácteo se centrifugaron a temperatura ambiente durante 60 minutos a 1700 g. El suero lácteo se decantó y las cuajadas se mantuvieron en un baño de agua a 36 °C. Los quesos se invirtieron cada 15 minutos hasta que el pH se redujo hasta 5,2-5,3 y posteriormente se centrifugaron a temperatura ambiente a 1700 g durante 20 minutos. Tras decantar más suero lácteo, se determinó el blanqueamiento de los quesos mediante escaneo. El uso de las enzimas blanqueadoras I y II produjo un queso más blanco.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1 . Un proceso para producir un producto alimentario, mediante el cual una forma intermedia de dicho producto alimentario comprende un pigmento, dicho proceso comprende añadir al menos una enzima que convierte directamente dicho fermento de forma eficaz en una forma que produce un aumento de la blancura de al menos parte del producto alimentario en comparación con el producto alimentario al que no se le añade dicha enzima durante su producción.
- 2 . El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto alimentario está hecho de harina, preferentemente de harina de trigo.
- 10 3 . El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto alimentario es un producto lácteo.
- 4 . El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el pigmento es un carotenoide.
- 5 . El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la enzima se añade como un preparado enzimático derivado de un microorganismo o producido *in situ* por un microorganismo que es capaz de producir dicha enzima.
- 15 6 . El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enzima se añade como un preparado enzimático derivado de una bacteria, un hongo o una levadura o producido por uno de estos *in situ*.
- 7 . El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el hongo pertenece al género *Marasmius*, preferentemente *Marasmius scorodonius*.
- 20 8 . Un producto alimentario que se puede obtener mediante el proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 9 . El uso de enzimas que son capaces de convertir directamente pigmentos en una forma que produce un aumento de la blancura de al menos parte de un producto alimentario.