(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 427 942**

(51) Int. CI.:

A23F 5/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2003 E 03779358 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1555885**

(54) Título: **Método para la reducción de acrilamida en granos de café tostado, granos de café tostado que tienen niveles reducidos de acrilamida y artículo de comercio**

(30) Prioridad:

25.10.2002 US 421344 P
05.12.2002 US 431150 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2013

(73) Titular/es:

PRINGLES S.A.R.L. (100.0%)
560 A Rue de Neudorf
2220 Luxembourg, LU

(72) Inventor/es:

DRIA, GLENN, JAMES;
ZYZAK, DAVID, VINCENT;
GUTWEIN, ROGER, WILLIAM;
VILLAGRAN, FRANCISCO, VALENTINO;
YOUNG, HERBERT, THOMAS;
BUNKE, RALPH, PAUL;
LIN, PETER, YAU TAK;
HOWIE, JOHN, KEENEY y
SCHAFERMEYER, RICHARD, GERALD

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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 para la reducción de acrilamida en granos de café tostado, granos de café tostado que tienen niveles reducidos de acrilamida y artículo de comercio

Campo de la invención.

La presente invención se refiere a la reducción de acrilamida en granos de café tostado, la reducción de asparagina en granos de café, granos de café tostado que tienen niveles reducidos de acrilamida, y granos de café que tienen niveles reducidos de asparagina. La invención además se refiere a un artículo de comercio.

Antecedentes de la invención.

Con cerca de 400 billones de tazas consumidas cada año, el café es la bebida más popular del mundo. Aunque el café se ha disfrutado durante miles de años, los investigadores han descubierto recientemente que el café contiene acrilamida. En abril de 2002, el Departamento de Alimentación Nacional Sueco y los investigadores de la Universidad de Estocolmo anunciaron su descubrimiento de que acrilamida, un químico potencialmente causante de cáncer, se forma en muchos tipos de alimentos y bebidas que se someten a procesado con calor. La acrilamida tiene un potencial carcinógeno en ratas que es similar al de otros carcinógenos en alimentos, pero en humanos, no se conoce el potencial relativo en alimentos y bebidas. Solo hay disponibles datos de población humana limitados para acrilamida y éstos no proporcionan evidencia de riesgo de cáncer desde una exposición ocupacional. (FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food: Summay Report; Génova, Suiza, 25-27 junio 2002).

La publicación “Mechanism(s) of formation of acrylamida in food: background” obtenido de internet (www.jitsan.umd.edu/Acrylamide/WG1_Mech_BG_Paper.pdf) es un compendio de las reuniones que se mantuvieron en Chicago el 28-30 de octubre de 2002, es decir, después de la fecha de completar la invención, en la reunión general que trataba del significado de acrilamida transmitida por alimentos en alimentación. Este documento describe que antes de la reunión del 28-30 de octubre de 2002, coexistían muchas teorías en relación con la síntesis de acrilamida en productos alimentarios.

Mottram D.S. et al., Nature, vol. 419, páginas 448-449, 3 de octubre de 2002, y Stadler R.H. et al., Nature, vol. 419, páginas 449-450, 3 de octubre de 2002, describen una de las numerosas síntesis propuestas de acrilamida en alimentos fritos y cocinados en el horno, por ejemplo, vía de la síntesis de Maillard.

Elmore J.S. y Mottram D.S. “Compilation of free amino acids data for various food raw materials”, que muestra la contribución relativa de asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico a la composición de aminoácidos libre, publicado en octubre de 2002, describe que el café contiene asparagina, ácido aspártico y ácido glutámico.

Aunque es necesaria más investigación para valorar qué efectos sobre la salud, si hay alguno, pueden resultar del consumo humano de acrilamida a los niveles que normalmente se encuentran en productos de café tostado, muchos consumidores han expresado preocupación. Según esto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para reducir el nivel de acrilamida en granos de café tostado. También es un objeto de la presente invención proporcionar granos de café tostado que tengan niveles reducidos de acrilamida. Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un artículo de comercio que comunique al consumidor que un producto de café tostado tiene niveles reducidos o bajos de acrilamida.

Compendio de la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de acrilamida en granos de café tostado como según la reivindicación 1. En una realización, el método comprende añadir una enzima que reduce la asparagina a granos de café.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de asparagina en granos de café. En una realización, el método comprende añadir una enzima que reduce la asparagina a granos de café.

En otro aspecto, la presente invención proporciona granos de café tostado que tienen niveles reducidos de acrilamida.

En otro aspecto, la presente invención proporciona granos de café que tienen niveles reducidos de asparagina.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un artículo de comercio que comunica al consumidor que un producto que comprende granos de café tostado tiene niveles reducidos o bajos de acrilamida.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un artículo de comercio que comunica al consumidor que un producto que comprende granos de café tiene niveles reducidos o bajos de asparagina.

Todos los documentos citados en la presente memoria, en la parte competente, se incorporan en la presente memoria por referencia; la citación de cualquier documento no se debe interpretar como una admisión de que es técnica previa con respecto a la presente invención.

Como se usa en la presente memoria, todos los porcentajes (%) son en peso a menos que se indique otra cosa.

Breve descripción de los dibujos.

Figura 1. La figura 1 describe el mecanismo de reacción propuesto mediante el que se forma acrilamida a partir de asparagina y una fuente de carbonilo (tal como glucosa). R_1 y R_2 pueden = H, CH_2OH, $CH_2(CH_2)_nCH_3$, o cualquier otro componente que haga un azúcar reductor; n puede ser cualquier número entero menor de 10.

Figura 2. La figura 2 describe el mecanismo de reacción propuesto mediante el que asparaginasa reacciona con asparagina para evitar la formación de acrilamida.

Figura 3. La figura 3 describe una muestra de cromatograma para análisis LC de asparagina y ácido aspártico. El eje x representa el tiempo de retención y el eje y representa la respuesta.

Descripción detallada de la invención.

Los solicitantes han descubierto que la asparagina, un aminoácido que se da naturalmente encontrado prácticamente en todos los sistemas vivos, puede formar acrilamida cuando se calienta. Así, los materiales más ricos en asparagina, cuando se calientan, tienden a contener niveles más altos de acrilamida; este es el caso especialmente cuando los materiales que contienen asparagina se calientan en presencia de azúcares reductores.

Sin ser limitante de la teoría, se cree que la acrilamida se forma vía el mecanismo de reacción descrito en la figura 1. Se cree que el grupo alfa-amino de asparagina libre reacciona con una fuente de carbonilo, formando una base de Schiff. Con calor, la base de Schiff se descarboxila, formando un producto que puede o bien: (1) hidrolizarse para formar amida beta alanina (que puede, con calor, degradarse más para formar acrilamida) o (2) descomponerse para formar acrilamida y la correspondiente imina. (Los solicitantes han descubierto que los átomos circulares precursores comprenden los carbonos y nitrógenos en la acrilamida).

Según esto, los solicitantes han descubierto además que la formación de acrilamida en granos de café tostados se puede reducir eliminando la asparagina o convirtiendo la asparagina de los granos de café en otra sustancia antes del final del tostado de los granos. Cuando tales granos que contienen niveles reducidos de asparagina se someten al tostado final, la cantidad de acrilamida formada se reduce.

Los solicitantes han encontrado que añadiendo una enzima que hidroliza el grupo amida de la cadena lateral de asparagina antes del final del tostado del grano se reduce el nivel de acrilamida presente en los granos de café tostados. Sin ser limitante de la teoría, se cree que la adición de tal enzima degrada la cadena lateral de asparagina, evitando así que la asparagina forme acrilamida. Haciendo esto, el enlace amida se hidroliza y la asparagina se convierte en ácido aspártico. Este mecanismo de reacción se describe en la figura 2.

Las enzimas preferentes para usar en el método de la presente memoria incluyen, pero no está limitada, asparaginasa. Sin embargo, cualquier enzima capaz de hidrolizar el grupo amida de la asparagina libre para evitar la formación de acrilamida está en el ámbito de la presente invención.

Las ventajas de usar enzimas son numerosas. Estas ventajas incluyen: (a) son sustancias naturales, no tóxicas; (b) generalmente catalizan una reacción dada sin causar reacciones secundarias indeseadas; (c) son activas bajo condiciones muy suaves de temperatura y pH; (d) son activas a bajas concentraciones; (e) la velocidad de reacción se puede controlar ajustando la temperatura, pH, y la cantidad de enzima empleada; y (f) se pueden desactivar una vez que la reacción ha avanzado lo deseado. (Food Chemistry, 4th Ed., Owen R. Fennema, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1985, pp. 427, 433).

A. Método para reducir acrilamida en granos de café tostados.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la reducción de acrilamida en granos de café tostado. En una realización, el método comprende reducir el nivel de asparagina en granos de café. En otro aspecto, el método comprende añadir una enzima que reduce asparagina a granos de café. La enzima preferente es asparaginasa.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de acrilamida en granos de café tostado, que comprende:

(1) proporcionar granos de café que contienen asparagina;

(2) opcionalmente pretratar los granos de café;

(3) añadir una enzima que reduce asparagina a los granos de café;

(4) permitir un tiempo suficiente para que la enzima reaccione con la asparagina;

(5) opcionalmente desactivar u opcionalmente eliminar la enzima; y

(6) tostar los granos de café para formar granos de café tostados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la reducción de asparagina en granos de café. En una realización, el método comprende añadir una enzima que reduce asparagina a granos de café. La enzima preferente es asparaginasa.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de asparagina en granos de café, que comprende:

(1) proporcionar granos de café que contienen asparagina;

(2) opcionalmente pretratar los granos de café;

(3) añadir una enzima que reduce asparagina a los granos de café;

(4) permitir un tiempo suficiente para que la enzima reaccione con la asparagina; y

(5) opcionalmente desactivar u opcionalmente eliminar la enzima.

1. Proporcionar granos de café que contienen asparagina.

Los granos de café son las semillas de las cerezas que crecen en los árboles de café en un estrecho cinturón subtropical alrededor del mundo. Hay muchas especies de café, sin embargo, está reconocido generalmente que hay dos especies de café comercial principales: *Coffea arabica* y *Coffea canephora var. robusta*. Los cafés de las especies *arabica* se describen como “Brasileños”, que son de Brasil, u “otros suaves” que crecen en otros países principales productores de café. Los principales países de *arabica* se reconocen generalmente que incluyen Colombia, Guatemala, Sumatra, Indonesia, Costa Rica, México, Estados Unidos (Hawai), El Salvador, Perú, Kenia, Etiopia y Jamaica. Los cafés de las especies canephora var. robusta se usan típicamente para disminuir el coste o como una fuente de cafeína adicional para cafés *arabica*. Estos cafés *robusta* típicamente crecen en regiones bajas de Africa occidental y central, India, Sureste asiático, Indonesia y Brasil. Después de cosechar las cerezas de café, la fruta típicamente se elimina de la semilla.

Se puede usar cualquier grano de café adecuado, incluyendo mezclas de distintos tipos de granos, según la presente invención. Los granos de café preferentes son *arabica, robusta*, o una mezcla de ellos.

Como se usa en la presente memoria, el término “granos de café” o “granos” incluye granos de café en cualquier forma adecuada. Ejemplos no limitantes incluyen granos de café en forma de grano o en forma de extracto de grano de café verde (por ejemplo, extractos de grano de café seco o verde). Los granos de café pueden estar enteros o se puede reducir el tamaño de la partícula. El tamaño de los granos de café se puede reducir por resquebrajado, picado, troceado, macerado, molido, formado de copos o cualquier otro método adecuado. El tamaño de los granos de café se puede reducir en cualquier etapa adecuada del método, incluyendo en cualquier momento antes, durante, o después de la adición de la enzima que reduce asparagina, pero antes del final del periodo de tiempo en el que la enzima se deja que reaccione con los granos de café.

Además, de los granos de café para usar en la presente memoria opcionalmente, pero preferentemente, se han eliminado los frutos. En una realización, se usan los granos de café que se han sometido a descafeinado. En otra realización, se usan los granos de café que no se han sometido a descafeinado. Aún en otra realización se usa una mezcla de granos descafeinados y sin descafeinar. Preferentemente se usan granos de café verde, pero se puede utilizar cualquier grano de café que no se ha sometido al tostado final según el método de la presente memoria.

2. Opcionalmente pretratar las granos de café.

Los granos de café opcionalmente se pueden pretratar antes o durante la adición de la enzima. El pretratamiento adecuado incluye secado, hidratado, enjuague con o sin acción mecánica (por ejemplo cepillado húmedo), presurizado, vaporizado, blanqueo, calentado, procesado con presión reducida (por ejemplo al vacío), reducción del tamaño de partícula, o sus combinaciones. Métodos de pretratamiento adecuados también incluyen la exposición de los granos de café a una o más enzimas que degradan la celulosa; este método se puede usar sólo o en combinación con uno o más de otros métodos de pretratamiento. Enzimas preferentes que degradan celulosa incluyen celulasa, hemicelulasa, pectinasa, y sus mezclas, aunque se puede usar cualquier enzima adecuada que degrada celulosa.

El pretratamiento puede facilitar la eliminación y/o extracción de la asparagina de dentro de los granos, permitiendo que la asparagina entre en contacto más íntimo con la enzima que reduce asparagina fuera de los granos. El pretratamiento también puede facilitar la migración de la enzima que reduce asparagina dentro de los granos,

permitiendo un contacto más íntimo con la enzima que reduce asparagina dentro de los granos, así como distribución más uniforme de la enzima que reduce asparagina en el grano.

Los granos se pueden secar para que se abran sus poros. En una realización, los granos se secan en preparación para empaparlos en una disolución de enzima que reduce asparagina. El secado crea una fuerza impulsora para que la disolución de enzima penetre en los granos, y así que la enzima alcance el interior de los granos. Se puede usar cualquier método adecuado de secado de los granos, siempre que el método de secado empleado no alcance la temperatura a la que la asparagina podría empezar a reaccionar para formar niveles significativos de acrilamida. Preferentemente, se usan los métodos de secado que emplean temperaturas por debajo de las que se usan típicamente para tostado; por ejemplo, en una realización los granos de café se secan a una temperatura por debajo de aproximadamente 120ºC (49ºF). Métodos adecuados de secado pueden incluir liofilizado, secado en cinta, secado al vacío, secado en horno, secado en lecho fluido, y sus combinaciones. Preferentemente, los granos secos tienen un contenido de humedad de menos de aproximadamente 10% para crear una fuerza impulsora para absorber humedad.

Métodos adecuados de hidratación pueden incluir tratamiento con vapor a baja presión o atmosférico, pulverizar el café con la cantidad deseada de agua y permitir que la absorba, empapar los granos en una disolución acuosa de la cantidad deseada de agua para crear granos humedecidos sin que quede exceso de agua, o empapar los granos en disolución acuosa de la cantidad deseada de agua para crear una mezcla de granos hidratados y exceso de agua (es decir, agua que no se ha absorbido completamente por los granos). Empapar los granos en disolución en exceso es menos preferente, debido a que los sólidos de café se pueden extraer de la disolución que queda, dando como resultado granos con disminución de sabor y calidad más baja.

En una realización, los granos se vaporizan para que se abran los poros para prepararlos para empaparlos en una disolución de enzima que reduce asparagina. En otra realización, los granos de café se empapan en agua y se dejan hidratar desde aproximadamente 15% a aproximadamente 75%, preferentemente desde aproximadamente 20% a aproximadamente 55%, y más preferentemente desde aproximadamente 25% a aproximadamente 40% de humedad antes de la adición a la disolución de la enzima que reduce asparagina. La hidratación de los granos con disolución acuosa o vapor hasta un contenido de humedad mayor de aproximadamente 15% puede causar que los granos se hinchen y puede facilitar la formación de vías para la extracción de asparagina de los granos, y/o para la transferencia de una disolución de enzima que reduce asparagina dentro de los granos.

Someter una mezcla de granos y exceso de agua o disolución de enzima que reduce asparagina a vacío y/o presión puede dar como resultado que más agua o disolución de enzima que reduce asparagina penetre en los granos y entre al interior de los granos. La presión puede forzar al agua o la disolución de enzima que reduce asparagina al interior de la estructura de los granos, mientras que el vacío puede empujar aire residual desde dentro de los granos y permitir que el agua o la disolución de enzima que reduce asparagina penetre más inmediatamente.

La reducción del tamaño de partícula puede crear áreas superficiales más grandes y puede permitir que la toma de la disolución y/o extracción se de más completamente, más uniformemente, y más rápidamente. El tamaño de los granos de café se puede reducir por resquebrajado, picado, troceado, macerado, molido, formado de copos o cualquier otro método adecuado. Por ejemplo, el resquebrajado (tal como cuando el grano se rompe en cuartos o trozos más pequeños), o molido (tal como el que se realiza cuando se procesa café tostado y molido) se puede usar para facilitar la toma de la disolución y/o la extracción de asparagina.

3. Añadir una enzima que reduce asparagina a los granos de café.

Como se usa en la presente memoria, “enzima que reduce asparagina” incluye una enzima capaz de reducir el nivel de asparagina en granos de café. En una realización, la enzima que reduce asparagina es una enzima capaz de hidrolizar el grupo amida de asparagina libre. Una enzima preferente para usar en la presente memoria es asparaginasa. Una fuente preferente de asparaginasa es Sigma-Aldrich, catálogo nº A2925.

Como se usa en la presente memoria los términos “enzima que reduce asparagina” y “enzima” incluyen una o más enzimas; por ejemplo, el término engloba una mezcla de dos o más enzimas. Por ejemplo el término incluye deamidasas que tienen función de reducir asparagina.

La enzima se puede añadir a los granos de café en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la enzima se puede añadir como un polvo o en la forma de una disolución. Además, la enzima se puede añadir a los granos de café de cualquier manera adecuada, tal como directamente (por ejemplo, rociado, vertido o pulverizado sobre los granos de café, o los granos de café se pueden empapar en una disolución de enzima) o indirectamente. Como se usa en la presente memoria, “añadir” la enzima a los granos de café incluye, pero no es limitante, cualquier medio de poner juntos la asparagina y la enzima.

La enzima se puede añadir en cualquier etapa adecuada del método antes de completar el tostado final (como se describe en la etapa 6 del método de la presente memoria) para formar los granos de café tostado. Por ejemplo, la enzima se puede añadir a los granos de café durante más de una etapa del método. En una realización, la enzima se añade a los granos cosechados antes de que se elimine el fruto, otra vez después de que el fruto se ha eliminado y los granos se han secado.

Las enzimas se etiquetan por unidades de actividad, mejor que por peso o volumen. Así, la cantidad eficaz de enzima que se requiere para lograr el nivel deseado de reducción de acrilamida depende de la actividad del producto de enzima particular que se use.

La cantidad de enzima a añadir puede depender de nivel de reducción de asparagina, y según el nivel de reducción de acrilamida que se desea. La cantidad de enzima a añadir también puede depender de la cantidad de asparagina presente en los granos de café; los granos de café más ricos en asparagina generalmente requerirán niveles incrementados de enzima o tiempos de reacción incrementados para lograr el mismo porcentaje de reducción de acrilamida. La cantidad de enzima a añadir también puede depender de de la enzima en particular que se usa (por ejemplo, la actividad enzimática de la enzima en particular) y el tipo particular de los granos de café tratados. Un experto en la técnica será capaz de determinar la cantidad eficaz de enzima en base al tipo específico de café, la enzima específica, la actividad específica de la enzima, y el resultado deseado.

Los métodos preferentes de añadir enzimas a granos de café incluyen pulverizado, empapado, rociado y baño dominante. En una realización, se aplica la disolución de enzima mediante pulverizado de la disolución sobre los granos junto con agitación suave de los granos para crear una aplicación uniforme a todas las superficies de los granos.

En otra realización, los granos de café se empapan en una disolución enzimática para hidratar los granos. La cantidad de disolución usada depende del contenido de humedad final deseado de los granos. La disolución enzimática se puede usar en tal cantidad que todo el líquido se absorbe por los granos, o en tal cantidad que la disolución excedente permanece después de la absorción de la disolución por los granos de café. Aún en otra realización, los granos de café se hidratan en una disolución después se rocía un polvo de enzima sobre los granos de café hidratados. Los granos se pueden eliminar de la disolución mediante cualquier método adecuado de separar partículas de una disolución, tal como por filtrado.

Aún en otra realización, se añade enzima a los granos por medio de un baño dominante. Sucesivamente, se empapan varios lotes de granos en una disolución que contiene enzima hasta que los materiales solubles que se extraen de los granos están en equilibrio o cerca con la disolución. En una realización, la enzima en el baño dominante convierte la asparagina en ácido aspártico, creando así una fuerza impulsora para extracción adicional de asparagina sobre posteriores adiciones de lotes de granos. Los materiales extractables se pueden equilibrar con los granos de modo que los componentes solubles de café adicionales no se extraen, con excepción de asparagina, que continua reaccionando y es transformado por la enzima. El ácido aspártico que se forma a partir de aspargina vuelve a empapar los granos y se equilibra. Se añade agua adicional y/o disolución que contiene enzima después de cada lote de granos para hacer que la disolución vuelva al lote previo de granos; esto mantiene un volumen constante del baño dominante.

En una realización, al menos una parte de la asparagina se extrae de los granos de café, el extracto resultante se trata con la enzima, después al menos una parte del extracto se vuelve a añadir a al menos una parte de los granos de café; por ejemplo, se puede añadir la enzima al extracto, o el extracto se puede bombear a través del lecho o columna de enzima inmovilizada (enzima o bien absorbida o químicamente enlazada al sustrato, preferentemente un sustrato inerte, por ejemplo, piezas de plástico o cuentas en una columna).

4. Permitir un tiempo suficiente para que la enzima reaccione con la asparagina.

La cantidad de tiempo que se necesita para que la enzima reaccione con la asparagina dependerá de factores que incluyen, pero no son limitantes, el nivel deseado de reducción de asparagina (y por tanto acrilamida), las características de los granos particulares de café (por ejemplo, composición química, cantidad de asparagina presente, tamaño de partícula), y la enzima particular añadida. Preferentemente, se permite que la enzima reaccione durante una cantidad de tiempo suficiente para dar granos de café donde el nivel de asparagina se reduce en al menos aproximadamente 10%, preferentemente al menos aproximadamente 30%, más preferentemente al menos aproximadamente 50%, aún más preferentemente al menos aproximadamente 70%, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 90%. En general, cuanto más tiempo se deja que la enzima reaccione, más grande es el nivel de reducción de asparagina y así más grande es el nivel de reducción de acrilamida en los granos de café tostado. La etapa de permitir un tiempo suficiente para que la enzima reaccione se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada, por ejemplo, se puede llevar a cabo simultáneamente a la adición de la enzima a los granos de café, mezclando la enzima con los granos de café, la absorción de la disolución de enzima por los granos de café, o sus combinaciones.

Como se conoce en la técnica, el pH y la temperatura son factores que afectan la actividad enzimática. Un experto en la técnica enseguida será capaz de determinar las condiciones óptimas de esos y otros parámetros (por ejemplo, contenido de agua). Además, las condiciones óptimas de pH para enzimas específicas típicamente están disponibles en la bibliografía y/o por los proveedores de enzimas.

Los granos de café preparados según el método de la presente memoria pueden tener una reducción en el nivel de asparagina de al menos aproximadamente 10%, preferentemente al menos aproximadamente 30%, más preferentemente al menos aproximadamente 50%, aún más preferentemente al menos aproximadamente 70%, e

incluso más preferentemente al menos aproximadamente 70%, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 90%.

En una realización, los granos de café comprenden menos de aproximadamente 500 ppm de asparagina, preferentemente menos de aproximadamente 300 ppm, más preferentemente menos de aproximadamente 200 ppm, y aún más preferentemente menos de aproximadamente 100 ppm.

5. Opcionalmente desactivar u opcionalmente eliminar la enzima.

Después de que la enzima ha reaccionado hasta la cantidad deseada, opcionalmente se puede desactivar o eliminar de los granos de café. Cuando se usa una enzima que es segura para el consumo (por ejemplo, que se da naturalmente y se encuentra en alimentos comunes) se puede elegir no desactivar o eliminar la enzima. Alternativamente, la enzima se puede desactivar mediante cualquier medio adecuado que inactiva la enzima. Por ejemplo, la enzima se puede desactivar por el uso de calor, ajuste de pH, tratamiento con una proteasa, o combinaciones de ellas. Además, el enzima se puede eliminar de los granos de café mediante cualquier medio adecuado que incluye, pero no es limitante, extracción. La enzima se puede desactivar, eliminar o someter a una combinación de desactivación y eliminación.

6. Tostado de granos de café para formar granos de café tostado.

Después los granos de café se tuestan para formar granos de café tostado. Se puede usar cualquier proceso adecuado que comprende tostar. Como se usa en la presente memoria, el término “tostado” incluye cualquier tratamiento térmico adecuado de los granos de café para crear sabores que son indicativos del café. Las técnicas de tostado adecuado pueden incluir, pero no son limitantes, tostado en horno, tostado por extrusión, tostado por vapor (por ejemplo son tostado posterior), tostado por infrarrojos, tostado en microondas, tostado por calentamiento dieléctrico/inducción, y sus combinaciones. El equipamiento de tostado típico y métodos para tostar granos de café se describen, por ejemplo, en Sivetz & Foote, Coffee Processing Technology, Avi Publishing Co., Westport Conn., Vol. 1 (1963), pp. 203-226. Los granos de café tostados pueden estar en cualquier forma adecuada, tal como versiones descafeinadas, o sus mezclas.

Los granos de café se pueden tostar a cualquier color de tostado deseado. Preferentemente, los granos se tuestan hasta un nivel de color Hunter de aproximadamente 10L (muy oscuro) a aproximadamente 25L (muy claro). Como se usa en la presente memoria, el color Hunter se mide sobre un colorímetro Hunter de la escala Hunter CIE. Ver páginas 985-95 de R.S. Hunter, “Photoelectric Color Difference Meter”, J. of the Optical Soc. of Amer., volumen 48 (1958).

Los granos de café tostados preparados según el método de la presente memoria pueden tener una reducción en el nivel de acrilamida de al menos aproximadamente 10%, preferentemente al menos aproximadamente 30%, más preferente al menos aproximadamente 50%, aún más preferentemente al menos aproximadamente 70%, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 90%.

En una realización, los granos de café tostado comprenden menos de aproximadamente 160 ppb de acrilamida, preferentemente menos de aproximadamente 150 ppb de acrilamida. En otra realización, los granos de café tostado comprenden menos de aproximadamente 135 ppb de acrilamida, preferentemente menos de aproximadamente 120 ppb, más preferentemente menos de aproximadamente 100 ppb, aún más preferentemente menos de aproximadamente 50 ppb, incluso más preferentemente menos de aproximadamente 20 ppb, y lo más preferente menos de aproximadamente 10 ppb.

Los granos de café tostado se pueden usar como tales o se pueden usar para hacer una variedad de productos de café tostado, tal como cafés tostados y molidos, concentrados líquidos, cafés instantáneos o en polvo, bebidas de café (por ejemplo, cafés fríos y calientes listos para servir, cafés de máquina, café comercial y hecho en casa, Kahlua™, lattes, capuchinos), mezclas (por ejemplo, mezclas de café latte), confites (por ejemplo, caramelos), postres (por ejemplo tartas, helados, muses, natillas) pastelería (por ejemplo galletas, donuts), salsas, y sopas (por ejemplo chili). En una realización, los granos de café se secan, tuestan, después se muelen para formar café tostado y molido. El equipamiento de molido típico se describe, por ejemplo en Sivetz & Foote, supra, pp. 239-250.

Los productos de café tostado que comprenden los granos de café tostado de la presente invención pueden tener una reducción en el nivel de acrilamida de al menos aproximadamente 10%, preferentemente al menos aproximadamente 30%, más preferentemente al menos aproximadamente 50%, aún más preferentemente al menos aproximadamente 70%, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 90%. En una realización, el café tostado y molido comprende menos de aproximadamente 160 ppb de acrilamida, preferentemente menos de aproximadamente 150 ppb. En otra realización, el café tostado y molido comprende menos de aproximadamente 135 ppb de acrilamida, preferentemente menos de aproximadamente 120 ppb, más preferentemente menos de aproximadamente 100 ppb, aún más preferentemente menos de aproximadamente 50 ppb, incluso más preferentemente menos de aproximadamente 20 ppb, y lo más preferente menos de aproximadamente 10 ppb. En otra realización, un café percolado tostado y molido comprende menos de aproximadamente 7 ppb de acrilamida, preferentemente menos de aproximadamente 5 ppb de acrilamida.

La desactivación de enzimas se puede dar por calor, así la etapa opcional de desactivación y tostado de los granos de café se puede llevar a cabo simultáneamente. El proceso de calor puede desnaturalizar e inactivar la enzima de modo que los granos de café tostado no se someten a actividad enzimática continua. Además, al menos una parte del tiempo que se permite para la reacción enzimática se puede llevar a cabo durante la etapa de tostado.

B. Medios de practicar el método.

La presente invención se puede practicar mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, el método de la presente memoria se puede practicar en lotes, semi-lotes, o modo continuo.

C. Realizaciones preferentes.

Aunque el método de la presente memoria generalmente se va a describir en términos de realizaciones preferentes descritas a continuación, un experto en la técnica debe entender que el método de la presente memoria se puede practicar de cualquier modo adecuado.

En una realización los granos de café se secan hasta un contenido de humedad de menos de aproximadamente 15%, preferentemente menos de aproximadamente 10%, más preferentemente menos de aproximadamente 5%, y lo más preferente desde aproximadamente 1,5% a aproximadamente 4%. Por ejemplo, los granos se pueden secar a 49ºC (120ºF) durante la noche. El secado incrementa el potencial de los granos para absorber más disolución enzimática. Opcionalmente, los granos se parten o muelen. Después los granos se ponen en una disolución que comprende enzimas y se deja empapar. La enzima se permite reaccionar durante desde aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 1 hora a una temperatura de aproximadamente 38ºC (100ºF); después, opcionalmente la enzima se desactiva por microondas. Después los granos se secan hasta un contenido de humedad de aproximadamente 7% a aproximadamente 11% a 74ºC (165ºF). Después los granos se tuestan hasta un color de tostado de aproximadamente 16L hasta aproximadamente 24L en un tostador Probat Duett™, después se muele para formar un café molido.

Aún en otra realización, se emplea un baño dominante. Los granos de café opcionalmente se prehumedecen con vapor hasta un contenido de humedad de aproximadamente 15% a aproximadamente 30%. Después se empapan en exceso de agua para crear un baño dominante (es decir, no todo el agua es tomada por los granos). Después los granos se separan del agua, tal como mediante filtrado fuera de la disolución. Este procedimiento se repite varias veces para formar un baño dominante. En el baño dominante, se puede establecer un equilibrio entre los componentes solubles en agua que están en los granos y en el baño. Después se añade la enzima al baño. La enzima transforma selectivamente la asparagina a ácido aspártico. Ahora los granos se añaden al baño dominante que contiene enzima. La asparagina se extrae fuera de los granos en el baño dominante y la enzima transforma la asparagina a ácido aspártico. El ácido aspártico en exceso en el baño establece un equilibrio con los granos. Los granos se sacan del baño dominante. Se pueden procesar lotes adicionales de granos de un modo continuo o semi-continuo. Después los granos se pueden procesar de la forma típica conocida en la técnica, tal como secando, tostando, después moliendo para formar café tostado y molido.

D. Artículo de comercio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un artículo de comercio. En una realización, el artículo de comercio comprende:

(a) un producto que comprende granos de café tostado, en el que dichos granos de café tostado tienen un nivel reducido de acrilamida;

(b) un envase para contener el producto; y

(c) un mensaje asociado al envase.

El mensaje asociado al envase informa al consumidor de que los granos de café tostado, el producto que comprende los granos de café tostado, y/o el artículo de comercio tiene un nivel reducido de acrilamida. En una realización, el mensaje informa de que los granos de café tostado, el producto que comprende granos de café tostado, y/o el artículo de comercio se fabrica con granos de café que tienen niveles reducidos o bajos de asparagina. El mensaje puede ser material impreso pegado directa o indirectamente al envase, pegado directa o indirectamente cerca del envase, o alternativamente puede ser un mensaje impreso, electrónico o radiado asociado al envase. Mensajes adecuados incluyen, pero no son limitantes, mensajes que comunican niveles “reducidos” o “bajos” de acrilamida, mensajes que comunican que menos de una cantidad específica de acrilamida está presente, y mensajes que comunican que los granos de café tostado, el producto que comprende granos de café tostado, y/o el artículo de comercio alcanza o excede un nivel sugerido u obligatorio (por ejemplo, límite regulado o nivel señalado).

En otra realización, el artículo de comercio comprende:

(a) un producto que comprende granos de café, en el que dichos granos de café tienen un nivel reducido de asparagina;

(b) un envase para contener los granos de café; y

(c) un mensaje asociado al envase.

El mensaje asociado al envase informa al consumidor de que los granos de café tostado, el producto que comprende los granos de café tostado, y/o el artículo de comercio tiene un nivel reducido de asparagina. El mensaje puede ser material impreso pegado directa o indirectamente al envase, pegado directa o indirectamente cerca del envase, o alternativamente puede ser un mensaje impreso, electrónico o radiado asociado al envase. Mensajes adecuados incluyen, pero no son limitantes, mensajes que comunican niveles “reducidos” o “bajos” de asparagina, mensajes que comunican que menos de una cantidad específica de asparagina está presente, y mensajes que comunican que los granos de café tostado, el producto que comprende granos de café tostado, y/o el artículo de comercio alcanza o excede un nivel sugerido u obligatorio (por ejemplo, límite regulado o nivel señalado).

Cualquier envase en el que el producto que comprende los granos de café tostado o granos de café se pueden despachar, presentar, exponer o almacenar es adecuado. Envases adecuados incluyen, pero no son limitantes, bolsas, cestas, cajas, boles, platos, tubos y latas.

Métodos analíticos.

Los parámetros usados para caracterizar elementos de la presente invención se cuantifican mediante métodos analíticos particulares. Estos métodos se describen en detalle a continuación.

1. Acrilamida.

Método para medir acrilamida (AA) en productos alimentarios.

Compendio.

Café tostado y molido se añade a con ^{13}C-AA y se extrae con agua caliente. El sobrenadante acuoso se extrae dos veces con acetato de etilo, y los extractos de acetato de etilo se concentran y analizan mediante LC/MS con monitores selectivos de iones para detección específica de AA y ^{13}C-AA.

Extracción de granos de café molidos (tanto verdes como tostados).

1. Pesar 6,00 ± 0,01 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 ml.
2. Añadir 120 µm de 100 ng/µL ^{13}C-AA en agua destilada desionizada (ISTD 2)) con una pipeta ajustable de 1000 µL (calibrada), directamente sobre la muestra.
3. Usando un dispensador, añadir 40 ml de agua destilada desionizada al matraz y cubrir con papel.
4. Colocar en un baño de agua a 65ºC durante 30 min.
5. Con un dispensador, añadir 10 ml de dicloruro de etileno al matraz, y homogeneizar con un Tekmar Tissumizer™ (SDT-1810) o un Ultra Turrax® (T18 Basic) durante 30 segundos. Enjuagar el elemento dispensador sobre el matraz con agua destilada desionizada.
6. Colocar 25 g del homogeinado en un vial de 30 ml (8 dram).
7. Tapar fuerte el vial y centrifugar durante 30 minutos a 2500-5200 rpm.
8. Acondicionar un Sep-Pak® Plus C18 (Waters nºWAT020515) con 3 ml de acetonitrilo seguido de 6 ml de agua desionizada destilada.
9. Pasar 6 ml del sobrenadante a través del cartucho y eluir en un vial de 30 ml (8 dram).
10. Añadir 10 ml de acetato de etilo al vial con un dispensador, tapar, y someter a vortex durante 10 segundos.
11. Permitir deshacer cualquier emulsión, ayudar removiendo o agitando una o dos veces y después dejar que las capas se separen.
12. Transferir de la capa superior tanto como sea posible a un vial para escintilación, sin transferir ningún líquido de la intercapas. Extraer una vez más con una parte de 10 ml de acetato de etilo y añadir al mismo vial para escintiliación. Después, añadir aproximadamente 2 g sulfato de sodio anhidro.
13. Concentrar el extracto con una corriente suave de nitrógeno en un baño de agua a 60-65ºC a aproximadamente 1 ml. Transferir el extracto a un Pierce REACTI-VIAL™ (o vial de vidrio con forma cónica

equivalente) y concentrar más el extracto hasta un volumen final de aproximadamente 100-200 µL. Colocar este extracto en un vial automuestreo con una manga cónica y tapa.

Preparación de estándares.

Disoluciones patrón y estándares internos.

Disolución	Peso	Volumen del matraz (ml)	Disolvente	Concentración (ppm)
Patrón 1	0,1000 g Acrilamida (AA)	100	Acetato de etilo	1000
ISTD 1	0,0100 g ^{13}C-Acrilamida	100	Acetato de etilo	100
Patrón 2	0,1000 g acrilamida (AA)	100	Agua destilada desionizada	1000
ISTD 2	0,0100 g ^{13}C-Acrilamida	100	Agua destilada desionizada	100

Estándares intermedios

Disolución	Volumen patrón 1 AA (µL)	Matraz volumétrico (ml)	Disolvente	Concentración (ppm)
INT 1	100	10	Acetato de etilo	10
INT 2	1000	10	Acetato de etilo	100

Estándares de calibración

Estándar	Volumen INT 1 (µm)	Volumen INT 2 (µL)	Volumen ISTD 1 (µL)	Matraz volumétrico (ml)	Disolvente	Conc. AA (ppm)	Conc. ISTD 1 (ppm)
0	0	0	450	10	Acetato de etilo	0	4,50
0,25	250	0	450	10	Acetato de etilo	0,250	4,50
0,75	750	0	450	10	Acetato de etilo	0,750	4,50
1,5	0	150	450	10	Acetato de etilo	1,50	4,50
3,0	0	300	450	10	Acetato de etilo	3,00	4,50
5,0	0	500	450	10	Acetato de etilo	5,00	4,50

Procedimiento homogéneo de limpieza.

Usar este procedimiento de limpieza entre cada muestra.

1. Llenar un matraz Erlenmeyer de 1 L con agua de grifo caliente (≈80% lleno) y añadir una gota de líquido lavaplatos Dawn™ (disponible de Procter & Gamble Co.) o equivalente.

2. Insertar el elemento dispersante homogenizante en el agua siempre que sea posible.

3. Homogeneizar la disolución durante aproximadamente 10-15 segundos.

4. Vaciar el Erlenmeyer de la disolución de limpieza; enjuagar y rellenar el matraz con agua de grifo caliente.

5. Homogeneizar de nuevo durante aproximadamente 10-15 segundos.

6. Vaciar el matraz y rellenar con agua de grifo caliente; homogeneizar de nuevo durante aproximadamente 10-15 segundos.

7. Si el agua no está clara y libre de partículas, continuar homogeneizando con agua de grifo caliente limpia tantas veces como sea necesario para lograr esta condición.

8. Cuando el agua de grifo caliente esté clara y libre de partículas, aclarar el elemento dispersante con agua destilada desionizada.

Análisis mediante LC/MS.

Las muestras se analizan usando un Waters 2690 LC interconectado a un espectrómetro de masas Micromass LCZ.

Fase móvil	100% H_2O, 10 mM NH_4Ac, ajustado a pH 4,6 p/ácido fórmico
Columna	2,0 mm x 150 mm, YMC C18 AQ-3 µm, 120 Å (disponible de Waters Corp.)
Caudal	0,2 ml/min
Interconexión	Directo (no dividido)
Volumen de inyección	5 µL
Modo ionización MS	Electroespray, modo ión positivo
Modo detección MS	Monitorización selectiva de iones: m/z 72 (AA), m/z 73 (^{13}(C-AA); tiempos dwell: 0,5 s

Análisis de datos.

La proporción de respuesta (área pico de AA/área pico de ^{13}C-AA) se marca frente a las proporciones de concentración correspondientes para una serie de 6 estándares en acetato de etilo. Todos los estándares contienen 4,50 µg/ml ^{13}C-AA, y concentraciones de AA que están en el intervalo de 0 a 5,0 ppm. La regresión linear da como resultado una curva de regresión a partir de la que las proporciones de concentración en extractos se determinan de la medición de la proporción de respuesta. Cuando esta proporción de concentración se multiplica por el nivel de exactitud conocido ^{13}C-AA (nominalmente 2 ppm) añadido a la muestra en la etapa tres del procedimiento de extracción, da como resultado el nivel de AA en ppm.

Cálculo de la muestra para LC/MS:

La curva de calibración se genera marcando la proporción de respuesta (área m/z 72 / área m/z 73) en el eje y frente a la proporción de concentración ([acrilamida] / [13C-acrilamida]) sobre el eje x. Para este ejemplo, la ecuación de la línea es y = 0,899x + 0,0123.

Área pico medida de AA (m/z 72) a 4,0 min: 100,000

Área pico medida de 13C-AA (m/z 73) a 4,0 min: 500,000

Proporción de respuesta Rr = 0,200. A partir de la pendiente e intersección de la curva de calibración, la proporción de concentración Rc se calcula: Rc = (0,200 – 0,0123) / 0,899 = 0,209

Dado el nivel máximo de 13C-AA en la muestra (2 ppm), el nivel medido de AA es 0,209 x 2 ppm = 0,418 ppm.

Seguro de calidad/ control de calidad (QA/QC)

1. Todas las balanzas usadas en la preparación de estándares y/o muestras, deben estar calibradas semanalmente con un juego de pesas calibradas. Las balanzas se deben chequear con al menos tres pesas que cubran el intervalo de pesos muestra/estándar a medir.

2. Se debería realizar diariamente una curva de calibración de seis puntos.

3. Se debería analizar un material de trabajo de referencia (MTR) con cada grupo de muestras. La concentración de este material debería estar en 2 σ del promedio corriente. Si no, el instrumental se debería recalibrar y el MTR recalcular.

2. Asparagina.

Determinación de asparagina y ácido aspártico en productos de alimentos y bebidas.

Principio.

Se mezcla una cantidad pesada de muestra con HCl 5% y se calienta durante 30 minutos, después se homogeniza. Una parte del homogeinado se centrifuga y después una parte del sobrenadante se diluye y se trata con reactivo FMOC (9-fluorenilmetil cloroformato), que reacciona con asparagina y ácido aspártico para formar un derivado altamente fluorescente. Después se usa la fase inversa HPLC para redisolver FMOC-asparagina de otras partes de los componentes de la matriz. La detección es por emisión fluorescente a 313 nanómetros (nm) tras excitación a 260 nm. El análisis de estándares de concentración conocida permite cuantificación.

Linealidad.

La curva de calibración de trabajo de cuatro estándares (50-600 ppm) da una correlación de 0,998 o mejor. Una curva tomada a 2.000 ppm también da una correlación de 0,998.

Precisión.

Muestras de café:

Una muestra de café tostado y molido se adiciona a cuatro niveles tanto de asparagina como de ácido aspártico (40, 200, 400, y 600 ppm). La asparagina se recupera al 86% (desviación estándar relativa de menos de 4%) y el ácido aspártico se recupera al 92% (desviación estándar relativa de menos de 4%).

Referencias.

1. Herbart. P., Santos, L; Alves, A. Journal of Food Science (20019, 66(9), 1319-1325.

2. Heems, Dany; Luck, Geneviewe; Fraudeau, Chrisophe; Verette, Eric. Journal of Chromatography, A (1998), 798 (1 + 2), 9-17.

A continuación se sugieren compuestos químicos y equipamientos; sin embargo, se acepta sustitución por materiales equivalentes.

Compuestos químicos.

Agua, HPCL o Milli-Q^{TM} Grade (Millipore)

Acetonitrilo, HPCL Grade	Burdick & Jackson nºAH015-4
Metanol, HPCL Grade	Fisher nºA452-4
Acetato de etilo	Baker nº9280-3
Pentano	Burdick & Jackson nºGC312-4
Monohidrato de asparagina	EM Sience
Ácido aspártico	Sigma nºA-8949
Ácido aminoisobutírico	Sigma nºA-8379
9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC)	ICN nº150200
Borato sódico	EM Sience nºSX 0355-1
Ácido bórico	Fisher nºA-73
Bicarbonato sódico	ICN nº194847
Cloruro de tetrametil amonio	Fisher nº04640-500
Citrato de sodio anhidro	MCB nºSX445

Ácido cítrico	Baker nº0122-01
Acetona	Burdick & Jackson nº010-4
Ácido clorhídrico, 0,1 N	Fisher nºSA48-500
Cloruro de calcio dihidratado	Aldrich nº22,350-6

Equipamiento.

Pipetas de transferencia, polietileno (Samco nº222)

Matraces volumétricos (25, 100, 250, 1000 ml)

Pipeta volumétrica (10 ml)

Cilindros graduados (100-1000 ml)

Recipientes HPLC (500 ml, 1 ó 2 litros)

Vasos de precipitado

Agitadores magnéticos/varillas de agitar

Balanza analítica (4 dígitos)

Viales para escintilación

Tubos de centrífuga, tapa de rosca (100 x 16 mm) con tapas

Viales de automuestra (8x30 mm, 1 ml), con cierre alabeado

Seguridad: este método requiere el uso de una campana de humo, e implica exposición a compuestos químicos. Revisar las prácticas de seguridad para campanas de humo y derrames químicos.

Instrumento	Modelo	Fabricante
Robot	Microlab® SPE	Hamilton
Bomba/ inyector HPCL	HP 1100	Agilent
Detector	RF10AXL	Shimadzu
Sistema de datos	Chemstation	Agilent

Columna.

Phemomenex Luna 100 x 4,6 mm C-18(2) 3 micrómetros nº 00D-4251-EO.

Preparación de reactivos.

Diluyente (pH 8,3-8,5; 1.000 ml)

1. Pesar 3,0 gramos de borato sódico, 3,0 gramos de ácido bórico, y 8,0 gramos de bicarbonato sódico en un vaso de precipitado tarado seco.
2. Colocar un vaso de precipitado vacío de 800 ml sobre un agitador magnético. Añadir aproximadamente 500 ml de agua Milli-Q™ y una varilla de agitar. Agitar el agua vigorosamente sin salpicar.
3. Transferir cuantitativamente los reactivos de la etapa 1 al agua; agitar hasta que se han disuelto completamente.
4. Transferir cuantitativamente la disolución de la etapa 3 a un matraz volumétrico de 1 litro y diluir hasta el volumen con agua Milli-Q™; mezclar bien. Estabilizar durante hasta seis (6) meses.

Disolución de cloruro cálcico (100 gramos)

1. Pesar 40 gramos de cloruro cálcico dihidratado en un vaso de precipitado tarado de 250 ml.

2. Añadir 60 gramos de agua Milli-Q™. Mezclar bien. Almacenar en condiciones ambientales en una botella de vidrio tapada. Estabilizar durante hasta 1 año.

Disolvente de extracción (pentano:acetato de etilo 80:20; 500 ml)

Seguridad: pentano y acetato de etilo son volátiles e inflamables. Realizar las siguientes operaciones en una campana de humo.

1. Transferir 400 ml de pentano a una botella de reserva HPLC de 500 ml.

2. Añadir 100 ml de acetato de etilo. Mezclar bien. Almacenar tapada en/debajo de una campana de humo.

Fase móvil (tampón:metanol:acetonitrilo 60:5:35, pH 3,2, 2 l)

1. Pesar 1,35 gramos de cloruro de tetrametil amonio, 3,65 gramos de ácido cítrico, y 1,60 gramos de citrato de sodio en un vaso de precipitado tarado seco.

2. Colocar un vaso de precipitado vacío de 800 ml sobre un agitador magnético. Añadir aproximadamente 500 de agua Milli-Q™ y una varilla de agitar. Agitar el agua vigorosamente sin salpicar.

3. Transferir cuantitativamente los reactivos de la etapa 1 al agua; agitar hasta que se han disuelto completamente.

4. Transferir cuantitativamente la disolución de la etapa 3 a un cilindro graduado de 1 litro y diluir hasta 1.000 ml con agua Milli-Q™; mezclar bien.

5. Transferir a un recipiente HPLC de 2 litros una fase móvil.

6. Añadir 200 ml de agua Milli-Q™, 100 ml de metanol y 700 ml de acetonitrilo. Añadir los últimos dos disolventes lentamente con agitación vigorosa. Realizar esta operación en una campana, y vistiendo equipo de protección individual. Consultar la Ficha de Datos de Seguridad (FDS) relevantes para detalles específicos.

7. Quitar el gas de la fase móvil por aspiración al vacío mientras se agita.

Disolución del reactivo FMOC (en acetona)

1. Pesar 0,10 gramos de reactivo FMOC en un matraz volumétrico tarado de 100 ml.

2. Añadir acetona para disolver y diluir hasta volumen con la misma. Mezclar bien. Realizar esta operación en una campana. Vestir EPI específicos según MSDS para los compuestos químicos.

3. Almacenar refrigerado durante no más de seis (6) meses.

Disolución ácida para extracción de muestra (HCl 5%)

1. Añadir 100 ml de agua Milli-Q™ en un vaso volumétrico de 200 ml.

2. Añadir 4 ml de HCl 1N al vaso volumétrico.

Completar el volumen con agua Milli-Q™.

Preparación de estándares internos (ácido aminoisobutírico)

ISTD A - estándar interno patrón A

1. Pesar 0,5 gramos de ácido aminoisobutírico en un vaso volumétrico tarado de 250 ml.

2. Añadir 25 ml de HCl 1,0 N y aproximadamente 100 ml de agua Milli-Q™. Mezclar mientras se remueve hasta que se disuelva. Diluir hasta completar en volumen con agua Milli-Q™ y mezclar bien. Almacenar refrigerado durante no más de seis (6) meses.

ISTD B – disolución B de trabajo de estándar interno (esta disolución se añade a los estándares de calibración)

1. Pipetear 1 ml de estándar interno patrón A en un matraz volumétrico de 100 ml.

2. Diluir hasta completar el volumen con agua Milli-Q™. Estabilizar durante 1 mes.

Preparación de estándar(es) de calibración.

Disolución patrón de calibración.

En un vaso volumétrico tarado de 50 ml, pesar 0,100 g (+/- 0,001 g) de asparagina y 0,100 g (+/- 0,001 g) de ácido aspártico. Añadir 25 ml de agua Milli-Q™ y 1 ml de HCl 1N. Colocar en un baño sonicador hasta disolución. Después completar el volumen con H_2O Milli-Q™. La disolución se mantiene bien durante 6 meses refrigerada.

Estándares de trabajo.

Preparar los siguientes estándares de trabajo de calibración:

Estándar nº	Patrón ml	Volumen final (ml)	ppm
1	5	200	50
2	5	100	100
3	1	10	200
4	3	10	600

Las disoluciones se mantienen bien durante un mes refrigeradas.

Preparación de muestras.

1. Pesar 6 gramos de café* molido en un matraz Erlenmeyer de 125 ml.
2. Añadir 48,0 ml de disolución de HCl 5% a cada muestra.
3. Añadir 2 ml de ISTD A a cada muestra.
4. Cubrir cada matraz con papel de aluminio y colocar en baño de agua a 60ºC durante 30 minutos.
5. Añadir 10 ml de dicloroetano a cada muestra.
6. Homogeneizar la muestra durante 60 segundos.
7. Verter una parte de muestra en un tubo de centrífuga de 30 ml.
8. Centrifugar a 10.000 rpm durante 32 minutos a 5ºC. El sobrenadante se usa en “Muestras – Dilución” de la etapa 1.

*si las muestras de café no están finamente molidas, moler en un procesador pequeño de alimentos antes del pesaje. Si las muestras son ricas en humedad, añadir varias piezas de hielo seco mientras se muele.

Preparación de estándares y muestras.

Se hacen tres métodos Microlab para diluir las muestras/estándares, añadir el estándar interno, y formar el derivado FMOC. Estos se compendian a continuación.

Operación	Método usado Microlab®
Dilución	TRANSDIL
Adición de estándar interno	ADDISTD
Formación de derivado FMOC	ADDFMOC

Preparación de muestras y estándares usando robot Microlab®

Etapa 1: estándares – adición de ISTD y etapa de dilución

1. Preparar dos series de tubos para cada estándar. Colocar aproximadamente 2 ml de estándar en una serie de tubos, colocar estos tubos llenos en la posición más a la izquierda del Microlab®.
2. Colocar la rejilla con tubos vacíos en la posición más a la derecha del Microlab®.
3. Rellenar un vial (para escintilación) de vidrio con disolución B de estándar interno de trabajo y colocarlo en el área de trabajo del Microlab®.

4. Seleccionar el método ADDISTD. (Mezcla 200 ul ISTD B, 50 ul disolución estándar, hasta 4.000 ul volumen total con agua Milli-Q^{TM}).
5. Ejecutar el método.
6. Retirar la serie de tubos de la posición izquierda y dejar a un lado para descargar.
7. Retirar la disolución estándar interna de trabajo de espacio de trabajo de Microlab® y refrigerar.

Dejar a un lado los tubos del lado derecho para la etapa 3.

Etapa 2: muestras – etapa de dilución (ISTD ya se añadió durante la preparación de muestras)

1. Preparar dos series de tubos para cada estándar. Colocar aproximadamente 2 ml de estándar en una serie de tubos, colocar estos tubos llenos en la posición más a la izquierda del Microlab®.
2. Colocar la rejilla con tubos vacíos en la posición más a la derecha del Microlab®.
3. Seleccionar el método TRANSDIL. (Serie nº de muestras, 50 ul para la cantidad de muestra y 4.000 ul para la cantidad de dilución final con agua Milli-Q^{TM}).
4. Ejecutar el método.
5. Retirar la serie de tubos de la posición izquierda y dejar a un lado para descargar.

Dejar a un lado los tubos del lado derecho para la etapa 3.

Etapa 3: adición de reactivo FMOC – fabricación de derivativo fluorescente

1. Preparar una rejilla de 100 x 16 mm tubos con tapa de rosca.
2. Colocar la rejilla en la posición más a la derecha del Microlab®.
3. Colocar los tubos estándar y de muestra de las etapas de dilución anteriores en la posición más a la derecha del Microlab®.
4. Transferir una alícuota (22 ml) de disolución de reactivo FMOC a un vial de vidrio para escintilación. Añadir aproximadamente 100 µl de disolución de cloruro cálcico 40%; mezclar bien. (El cloruro cálcico se añade para hacer que el reactivo FMOC “se cargue” – necesario para la detección mediante Microlab®).
5. Colocar el vial sobre el espacio de trabajo del Microlab®.
6. Seleccionar el método ADDFMOC.
7. Cambiar las jeringas 1 y 2 de agua a diluyente (pH 8,3-8,5).
8. Realizar un lavado de al menos cinco (5) ciclos para las jeringas 1 y 2 usando diluyente (pH 8,3-8,5).
9. Ejecutar el método ADDFMOC. (Mezcla 450 ul de disolución FMOC, 250 ul de muestra de ADDISTD anterior hasta un volumen final de 1.300 ul con disolución diluyente).
10. Retirar la serie de tubos de la posición de la rejilla de muestra y dejar a un lado.
11. Retirar la disolución de reactivo FMOC del espacio de trabajo del Microlab® y refrigerar.
12. Retirar la serie de tubos de la posición más a la derecha y colocar en la campana de humo. Dejarlo durante al menos 10 minutos o hasta que la disolución se clarifique (pero no más de 20 minutos).
13. Añadir 2 ml de disolvente de extracción a cada tubo. Tapar y someter a vortex a alta velocidad durante dos (2) minutos para extraer reactivo FMOC sin reaccionar.
14. Preparar otra serie de tubos de 55 x 16 mm. Añadir 1 ml de disolución de fase móvil a cada tubo.
15. Transferir la capa (más baja) acuosa de 1,0 ml de los tubos de la centrífuga a los tubos de 55 x 16 mm.
16. Descargar la capa (superior) orgánica.
17. Transferir las muestras a los viales de automuestras y sellar.

Cromatografía.

Condiciones de operación.

HP 1100 con software Chem Station

Detector: detector Waters 474 Scanning Fluorescence

Modo: normal

Señal: 0,0000

Longitud de onda: Ex 260

Em 313

Aumento: 10

Atten: 1

Respuesta: FST

Columna: Phenomex Luna C18 (2) 100 x 4,6 mm 3 u

Método LC.

Caudal: 1.000 ml/min

Serie isocrática (ver preparación de reactivos – fase móvil)

Volumen de inyección: 10,0 ul

Ajustes de temperatura: no controlado

Cálculos.

Las disoluciones de muestra se calculan frente a una curva estándar de cantidades conocidas usando conteo de áreas:

y = mx + b

y (proporción asparagina/ISTD) = m (pendiente) x (concentración de asparagina) + b (y-intersección)

(y – b)/m = x

asparagina ppm = (àrea de asparagina/área ISTD - intersección)/pendiente

[ppm = ug/ml]

Ejemplo:

asparagina ppm = 8215,45436/551,828 - -0,0165)/0,0023 = 176,93 ppm

Corrección para dilución/homogeneización en la etapa de preparación de muestra.

ug/g asparagina = ppm asparagina encontrada x (ml dilución de muestra (50)/gramos de muestra)

[ppm = ug/ml]

Ejemplo:

ug/g asparagina = 176,93 ppm x (50 ml/1,0083 g) = 8.773,65 ug/g

Criterio de serie de aceptabilidad:

- La precisión de la muestra comprobada del material de trabajo de referencia debe estar dentro del 10% del resultado conocido para asparagina.
- La linealidad de la curva de calibración (r^2) debe ser 0,995 o mayor.

Cromatograma de muestra del análisis LC.

La figura 3 describe una cromatograma de muestra del análisis LC.

Tiempo transcurrido	Compuesto
4,5 min	Asparagina
6,6 min	Ácido aspártico
11,5 min	Reactivo FMOC
20,7 min	ISTD

3. % reducción de acrilamida.

% reducción acrilamida = [(nivel de acrilamida en la muestra control – nivel de acrilamida en la muestra tratada con enzima) / nivel de acrilamida en la muestra control] x 100

La muestra control se prepara del modo convencional como se conoce en la técnica. Tanto la muestra control como la tratada con enzima se tuestan del mismo modo y hasta aproximadamente el mismo color Hunter L.

4. % reducción de asparagina.

% reducción asparagina = [(nivel de asparagina en la muestra control – nivel de asparagina en la muestra tratada con enzima) / nivel de asparagina en la muestra control] x 100

La muestra control se prepara del modo convencional como se conoce en la técnica. Tanto la muestra control como la tratada con enzima se tuestan del mismo modo y hasta aproximadamente el mismo color Hunter L.

Ejemplos.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención pero no pretenden ser limitantes de ella.

Ejemplo 1: absorción de disolución de enzima.

Se formula una disolución de enzima que consiste en 1.000 unidades de asparaginasa y 0,1% (de peso de café) de una celulasa disueltas en 600 gramos de agua destilada. Se colocan mil doscientos gramos de granos de café verde *arabica* lavados de Guatemala en un matraz de fondo redondo de 3 litros, que después se coloca sobre un rotoevaporador con un baño de agua ajustado a 35ºC. Se aplica un vacío de 25 inch sobre el matraz rotatorio durante 5 minutos, después se añade suficiente disolución de enzima al matraz para humedecer la superficie de los granos de café. Después se deja de hacer el vacío. El vacío se aplica al sistema durante aproximadamente 10 segundos y después se suelta 2 veces más. El matraz de granos de café después se deja rotar a presión atmosférica hasta que toda la disolución de enzima sobre la superficie de los granos se ha absorbido. Este proceso se repite hasta que se ha añadido 600 gramos de disolución de enzima al café.

Después el café se transfiere a un recipiente a presión y se aplica presión a 80 psi usando gas nitrógeno. El café húmedo se mantiene bajo presión durante 2 horas, con muestras que se han retirado a 1 y 2 horas. La enzima se desactiva mediante calor microondas. Después las muestras se secan a 50-60ºC y se tuestan hasta un color de tostado de 17L. Opcionalmente, las muestras después se muelen para formar café tostado y molido.

Muestras tratadas con enzima	Asparagina (verde)*	Acrilamida (tostada)
1 hora de presión	384 ppm	346 ppb
2 horas de presión	393 ppm	280 ppb

*los valores de asparagina se dan en base a 0% de humedad.

Para el cálculo del porcentaje de reducción de asparagina y acrilamida, se miden los valores de asparagina y acrilamida para granos de café que no se han tratado con disolución de asparagina. El valor de asparagina es 661 ppm (en base a 0% de humedad), y el valor de acrilamida es 397 ppb. El porcentaje de reducción tanto para asparagina como para acrilamida se fija en la siguiente tabla.

Muestras tratadas por enzima	% reducción asparagina	% reducción acrilamida
1 hora de presión	42	13
2 horas de presión	40	29

Ejemplo 2: baño dominante.

Se humedecen granos de café verde *arabica* lavados (muestra nº 1, verde) hasta aproximadamente 25% de humedad usando vapor a presión atmosférica. Los granos de café después se empapan en agua en una proporción entre granos de café vaporizados y agua de aproximadamente 1:4 con agitación suave durante aproximadamente 30 minutos. Los granos de café extractados se retiran y el extracto después se usa para empapar otro baño de granos de café prehumedecidos. Este proceso se repite, con una proporción entre granos de café y extracto de entre aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:1, hasta que los sólidos contenidos en el extracto alcanzan un nivel constante.

Este extracto se usa para empapar un lote fresco de granos de café prehumedecidos en una proporción de 270 g de café prehumedecido entre 504 g de extracto durante 20 minutos con agitación suave. Los granos de café se separan del extracto (este extracto es la muestra nº2), se secan (estos granos secos son la muestra nº 3 verdes), y se tuestan (estos granos secos y tostados son la muestra nº3 tostados). Los granos de café tostado después opcionalmente se muelen para formar granos tostados y molidos.

Se añaden 300 unidades de asparagina a 350 gramos de extracto y se deja asentar durante 1 hora para permitir que la asparaginasa transforme la asparagina en ácido aspártico (el extracto tratado con enzima es la muestra nº4). Después el extracto se usa para empapar otro lote fresco de granos de café verde *arabica* prehumedecidos durante 1 hora con una proporción entre granos de café y extracto de 0,8:1. Los granos de café se separan del extracto, la enzima se desactiva, y los granos se secan (estos granos secos son la muestra nº5 verde) y se tuestan (estos granos secos y tostados son la muestra nº5 tostados). Los granos se tuestan hasta un color de tostado de aproximadamente 17L. Los granos de café tostados después opcionalmente se muelen para formar café tostado y molido. Una alícuota de la muestra nº1, verde, se tuesta para formar la muestra nº1, tostado.

Las mediciones analíticas de los granos de café que se han empapado en el extracto tratado con enzima muestran los siguientes niveles de asparagina y acrilamida:

Muestra	Asparagina (verde)*	Acrilamida (tostado)
Muestra nº1, granos de café control	661 ppm	397 ppb
Muestra nº2, tratamiento enzimático antes de extraer	385 ppm	N/A**
Muestra nº3, granos empapados en la muestra nº2	436 ppm	399 ppb
Muestra nº4, extraer después del tratamiento enzimático	8 ppm	N/A**
Muestra nº5, granos empapados en la muestra nº 4	240 ppm	291 ppb

*los valores de asparagina están en base a 0% humedad.

**no aplicable.

El porcentaje de reducción tanto de asparagina como de acrilamida para los granos de café y extracto se describen en la siguiente tabla.

Muestra	% reducción asparagina	% reducción acrilamida
Muestra nº5 (comparado frente a muestra nº1)	64%	27%
Muestra nº4 (comparado frente a muestra nº2)	98%	N/A*

*no aplicable.

Ejemplo 3: baño dominante con enzima desactivada.

Se humedecen granos de café verde *arabica* lavados (muestra nº 1, verde) hasta aproximadamente 25% de humedad usando vapor a presión atmosférica. Los granos de café después se empapan en agua en una proporción entre granos de café vaporizados y agua de aproximadamente 1:4 con agitación suave durante aproximadamente 30 minutos. Los granos de café extractados se retiran y el extracto después se usa para empapar otro baño de granos de café prehumedecidos. Este proceso se repite, con una proporción entre granos de café y extracto de entre aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:1, hasta que los sólidos contenidos en el extracto alcanzan un nivel constante.

Este extracto se usa para empapar un lote fresco de granos de café prehumedecidos en una proporción de 270 g de café prehumedecido entre 504 g de extracto durante 20 minutos con agitación suave. Los granos de café se separan

del extracto (este extracto es la muestra nº2), se secan (estos granos secos son la muestra nº 3 verdes), y se tuestan (estos granos secos y tostados son la muestra nº3 tostados). Los granos de café tostado después opcionalmente se muelen para formar granos tostados y molidos.

Se añaden 300 unidades de asparagina a 350 gramos de extracto y se deja asentar durante 1 hora para permitir que la asparaginasa transforme la asparagina en ácido aspártico. El extracto tratado con enzima después se desactiva (el extracto tratado con enzima es la muestra nº4). Después el extracto se usa para empapar otro lote fresco de granos de café verde *arabica* prehumedecidos durante 1 hora con una proporción entre granos de café y extracto de 0,8:1. Los granos de café se separan del extracto. Los granos se secan (estos granos secos son la muestra nº5 verde) y se tuestan. Los granos de café tostados después opcionalmente se muelen para formar café tostado y molido.

Las mediciones analíticas de los granos de café que se han empapado en el extracto tratado con enzima muestran los siguientes niveles de asparagina:

Muestra	Asparagina (verde)
Muestra nº1, granos de café control	661 ppm
Muestra nº2, tratamiento enzimático antes de extraer	385 ppm
Muestra nº3, granos empapados en la muestra nº2	436 ppm
Muestra nº4, extraer después del tratamiento enzimático (desactivado)	7 ppm
Muestra nº5, granos empapados en la muestra nº 4	320 ppm

El porcentaje de reducción de asparagina para los granos de café y extracto se describen en la siguiente tabla.

Muestra	% reducción asparagina
Muestra nº5 (comparado frente a muestra nº1)	52
Muestra nº4 (comparado frente a muestra nº2)	98

El nivel de acrilamida en los granos de café tratados con enzima tostados, el café tostado y molido, y café percolado preparado a partir de ellos se reduce al menos un 10% comparado con los productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 4: baño dominante con enzima inmovilizada.

Se humedecen granos de café verde *arabica* lavados (muestra nº 1, verde) hasta aproximadamente 25% de humedad usando vapor a presión atmosférica. Los granos de café después se empapan en agua en una proporción entre granos de café vaporizados y agua de aproximadamente 1:4 con agitación suave durante aproximadamente 30 minutos. Los granos de café extractados se retiran y el extracto después se usa para empapar otro baño de granos de café prehumedecidos. Este proceso se repite, con una proporción entre granos de café y extracto de entre aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:1, hasta que los sólidos contenidos en el extracto alcanzan un nivel constante.

Este extracto se usa para empapar un lote fresco de granos de café verde prehumedecidos en una proporción de 270 g de café prehumedecido entre 504 g de extracto durante 20 minutos con agitación suave. Los granos de café se separan del extracto (este extracto es la muestra nº2), se secan (estos granos secos son la muestra nº 3 verdes), y se tuestan (estos granos secos y tostados son la muestra nº3 tostados). Los granos de café tostado después opcionalmente se muelen para formar granos tostados y molidos.

El extracto se pone en contacto con asparaginasa inmovilizada (este extracto tratado con enzima es la muestra nº4). Después el extracto se usa para empapar otro lote fresco de granos de café verde *arabica* prehumedecidos durante 1 hora con una proporción entre granos de café y extracto de 0,8:1. Los granos de café se separan del extracto, después los granos se secan (estos granos secos son la muestra nº5 verde) y se tuestan (estos granos secos y tostados son la muestra nº5 tostados). Los granos se tuestan y después opcionalmente se muelen para formar café tostado y molido. Una alícuota de la muestra nº1, verde, se tuesta para formar la muestra nº1, tostado. El nivel de acrilamida en los granos de café tostados tratados con enzima, el café tostado y molido, y el café percolado preparado a partir de ellos se reduce el menos aproximadamente un 10% comparado con los productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 5: café tostado y molido descafeinado.

Los granos de café *arabica* verde secos tratados con enzima (2 horas de presión) del ejemplo 1 se toman antes del tostado y se someten a un proceso de descafeinado. El proceso de descafeinado como se señala en la patente de EEUU nº 4.474.821 de Morrison, Jr. et al se sigue para descafeinar los granos hasta un punto donde el 97% del nivel original de cafeína de los granos se ha extraído. Los granos después se tuestan y muelen para producir un café tostado y molido descafeinado que tiene al menos aproximadamente 10% de reducción de acrilamida comparado con productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 6: café tostado y molido descafeinado.

Los granos de café *arabica* verde del ejemplo 2, muestra nº5, se toman antes del tostado y se someten a un proceso de descafeinado. El proceso de descafeinado como se señala en la patente de EEUU nº 4.474.821 de Morrison, Jr. et al se sigue para descafeinar los granos hasta un punto donde el 97% del nivel original de cafeína de los granos se ha extraído. Los granos después se tuestan y muelen para producir un café tostado y molido descafeinado que tiene al menos aproximadamente 10% de reducción de acrilamida comparado con productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 7: café tostado y molido descafeinado.

Los granos de café *arabica* verde se descafeínan según el proceso de descafeinado de la patente de EEUU nº 4.474.821 de Morrison, Jr. et al se sigue para descafeinar los granos hasta un punto donde el 97% del nivel original de cafeína de los granos se ha extraído. Los granos descafeinados después se someten al proceso señalado en el ejemplo 1 anterior. El producto resultante es un café tostado y molido descafeinado que tiene al menos aproximadamente 10% de reducción de acrilamida comparado con productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 8: café tostado y molido descafeinado.

Los granos de café *arabica* verde se descafeínan según el proceso de descafeinado de la patente de EEUU nº 4.474.821 de Morrison, Jr. et al se sigue para descafeinar los granos hasta un punto donde el 97% del nivel original de cafeína de los granos se ha extraído. Los granos descafeinados después se someten al proceso señalado en el ejemplo 2 anterior. El producto resultante es un café tostado y molido descafeinado que tiene al menos aproximadamente 10% de reducción de acrilamida comparado con productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 9: café tostado y molido descafeinado.

Los granos de café se descafeinan mediante un proceso en el que los granos de café verde que contienen cafeína se extraen concurrentemente con una disolución de agua de solubles de café como se conoce en la técnica (tal como lo descrito en la patente de EEUU nº 3.989.850 de Erb, et al), excepto que la disolución de agua también comprende asparagina en una disolución como en el ejemplo 2 anterior. El café descafeinado retirado de la zona de extracción se trata para eliminar los sólidos de superficie que contiene y después se seca y tuesta para formar y un café tostado y molido descafeinado. El nivel de acrilamida en los granos de café tostado tratados con enzima, el café tostado y molido, y el café percolado preparado a partir de ellos está reducido al menos aproximadamente 10% comparado con productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 10: producto de café instantáneo.

El café tostado y molido reducido en acrilamida producido a partir de cualquiera de los ejemplos 1-9 anteriores se somete a extracción a contracorriente con agua caliente en series de columnas de extracción a temperaturas de 177ºC (350ºF) y presiones de 8 bar (120 psi) para producir un extracto de café concentrado de 20% de sólidos. El extracto se despoja de sus componentes aromáticos y después se condensa hasta una concentración de 60%. Los aromáticos se condensan y después se recombinan con el extracto concentrado y la corriente completa se alimenta a un secador por pulverizado donde el líquido se pulveriza en un caudal contracorriente de aire caliente a 121ºC (250ºF). El producto seco final es una forma de café soluble o instantáneo que tiene al menos 10% menos de acrilamida que los productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 11: producto de capuchino edulcorado listo para servir.

El café tostado y molido reducido en acrilamida producido a partir de cualquiera de los ejemplos 1-9 anteriores se somete a una extracción acuosa para producir un concentrado de café que contiene 7,5% de sólidos. Este concentrado después se usa en la siguiente formulación (basada en peso) para fabricar un producto de café listo para beber.

Agua	50%
Leche 2% baja en grasa	35%
Fructosa	7%

Polvo de vainilla	2%
Concentrado de café de esta invención	6%

Estos ingredientes se mezclan uniformemente y se someten a condiciones de proceso de ultra alta temperatura (UHT) para esterilizar el producto, y después se llenan asépticamente contenedores de envasado individuales. Esta bebida de café lista para beber tiene al menos aproximadamente 10% de acrilamida comparado con productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 12: bebidas de café instantáneo.

El café instantáneo producido en el ejemplo 10 se usa en la siguiente formulación (basada en peso) para fabricar un polvo de café cremoso instantáneo usado para fabricar una bebida tipo café latte.

Café instantáneo del ejemplo 10	16%
Crema espumosa*	50%
Sacarosa	33,5%
Sabores	0,5%

(*la crema espumosa tiene 68% de leche desnatada, 30% de aceite de coco, 1% de agente de fluidez dióxido de silicio y 1% de ortofosfato dihidrógeno de sodio para estabilización de la estructura de proteína durante la disolución).

La composición se prepara pesando cada ingrediente seco en partículas en un mezclador y secar mezclando en una mezcladora de palas hasta que sea uniforme. El producto resultante es una mezcla instantánea seca que se puede usar para preparar un café latte tras adicionar agua caliente. La mezcla instantánea seca y las bebidas preparadas a partir de ella tienen al menos aproximadamente 10% menos de acrilamida que los productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 13: concentrado de café líquido.

El café tostado y molido reducido en acrilamida producido a partir de cualquiera de los ejemplos 1-9 anteriores se somete a una extracción acuosa con agua caliente en un recipiente de extracción por lotes a una temperatura de 82ºC (180ºF) y una presión de 6 bar (90 psi) para producir un extracto de café concentrado de 4,5% de sólidos. Este extracto después se congela y se reconstituye con la adición de agua caliente para fabricar una bebida de café terminado con 0,7% de sólidos. Este extracto y la bebida de café terminado preparada a partir de él tienen al menos 10% menos de acrilamida que los productos procesados convencionalmente.

Ejemplo 14: artículo de comercio.

Los cafés tostados y molidos reducidos en acrilamida producidos a partir de cualquiera de los ejemplos 1-9 anteriores se envasan en latas para vender al consumidor. Impreso en las latas hay un mensaje que declara “producto sin acrilamida”.

Ejemplo 15: artículo de comercio.

Los granos de café verde tratados con enzima según cualquiera de los ejemplos 1-9 anteriores se envasan en cajas. Las cajas están etiquetadas, “bajo en asparagina”.

Ejemplo 16: artículo de comercio.

El producto de capuchino edulcorado listo para servir del ejemplo 11 se envasa en una botella para vender al consumidor. Una etiqueta en la botella declara, “reducido en acrilamida más de 90%”. Un anuncio de televisión para el producto comunica el mensaje, “producto reducido en acrilamida”.

Ejemplo 17: artículo de comercio.

El café percolado fabricado a partir de café tostado y molido de cualquiera de los ejemplos 1-9 anteriores se vende al consumidor servido en taza. Un cartel colocado dentro del establecimiento donde el café percolado se vende comunica el mensaje, “servimos solo café sin acrilamida”.

REINVINDICACIONES

1. Un método para reducir el nivel de acrilamida en granos de café tostado, dicho método comprende las etapas de:

(1) formar un baño dominante, esta etapa comprende:

a) empapar granos de café en exceso de agua para crear un baño dominante,

b) separar los granos de café del agua;

c) repetir las etapas a) y b) varias veces para formar un baño dominante en el que se establece un equilibrio entre los componentes solubles en agua que están en los granos de café y en el baño;

(2) añadir una enzima que reduce asparagina al baño dominante, dicha enzima transforma selectivamente la asparagina a ácido aspártico;

(3) añadir granos de café que contienen asparagina al baño dominante de la etapa (2), dicha asparagina se extrae de los granos en el baño dominante y dicha enzima transforma la asparagina en ácido aspártico;

(4) retirar los granos de café del baño dominante;

(5) opcionalmente procesar lotes adicionales de granos de café que contienen asparagina de un modo continuo o semi-continuo repitiendo las etapas (3) y (4);

(6) opcionalmente desactivar u opcionalmente retirar la enzima; y

(7) tostar los granos de café para formar granos de café tostados.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha enzima que reduce asparagina es asparaginasa.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha enzima que reduce asparagina es una enzima capaz de hidrolizar el grupo amida de asparagina libre.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el nivel de asparagina de dichos granos de café se reduce de 10% a 100%, preferentemente de 30% a 100%, más preferentemente de 50% a 100%, incluso más preferentemente de 70% a 100%, y lo más preferente de 90% a 100%.

Figura 1

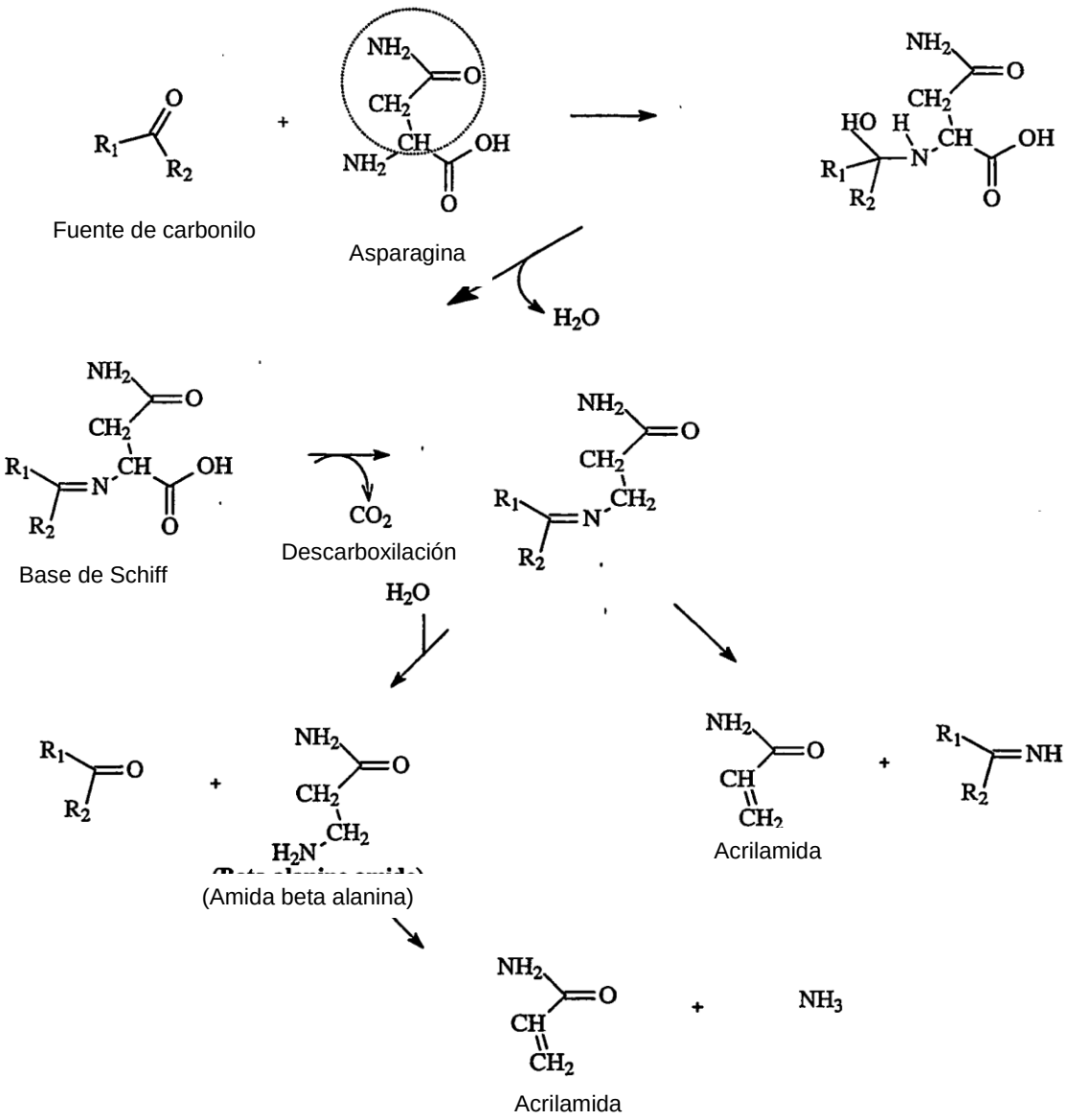
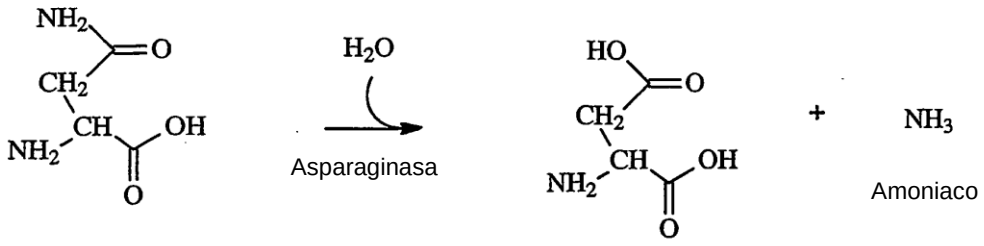

Fuente de carbonilo
Asparagina
H_2O
Base de Schiff
CO_2
Descarboxilación
H_2O
Acrilamida
(Amida beta alanina)
Acrilamida
NH_3

Figura 2

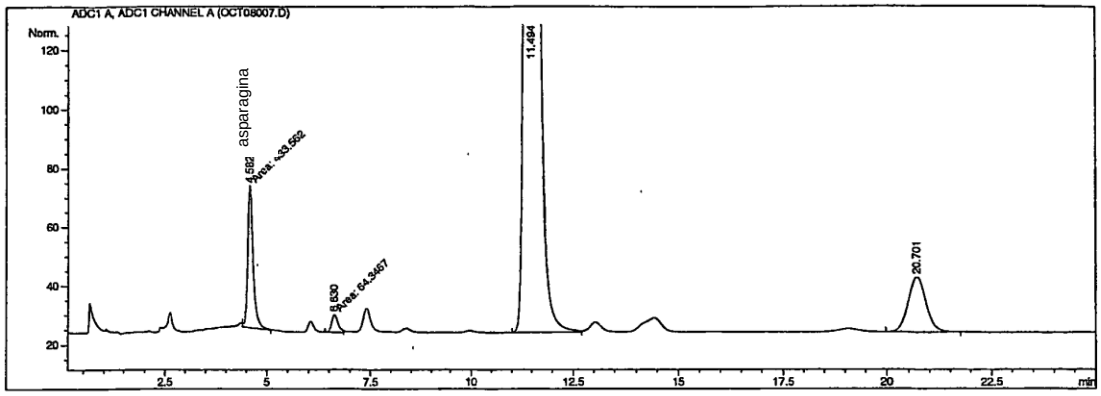


Asparagina

Ácido aspártico

Figura 2: modo de acción para asparaginasa

Figura 3


ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (OCT08007.D)
Norm.
120
100
80
60
40
20
asparagina
4.582
Area: 33.552
6.530
Area: 64.3457
11.494
20.701
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
22.5
min