

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 891**

51 Int. Cl.:

**A23G 1/00** (2006.01)

**A23G 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2004 E 04755164 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1635648**

54 Título: **Método para la reducción de acrilamida en productos de cacao, productos de cacao que tienen niveles reducidos de acrilamida**

30 Prioridad:

**25.06.2003 US 603278**

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

**27.01.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOWIE, JOHN KEENEY;  
LIN, PETER YAU TAK y  
ZYZAK, DAVID VINCENT**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 439 891 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la reducción de acrilamida en productos de cacao, productos de cacao que tienen niveles reducidos de acrilamida

### Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a la reducción de acrilamida en productos de cacao, especialmente a la reducción de acrilamida en chocolate y productos de chocolate. La invención además se refiere a un artículo de comercio.

### Antecedentes de la invención

- 10 Conocido como "el alimento de los dioses", el chocolate es uno de los alimentos más lujosos del mundo. Aunque el chocolate se ha disfrutado por el hombre durante tres mil años, los investigadores han descubierto recientemente que el chocolate y otros productos de grano de cacao tostado contienen acrilamida.

- 15 En abril de 2002, la Administración Nacional de Alimentos de Suecia y los investigadores de la universidad de Estocolmo anunciaron el descubrimiento de que la acrilamida, un químico causante potencial de cáncer, se forma en muchos tipos de alimentos y bebidas que se someten a proceso de calentamiento. Posteriormente, se ha descubierto que los productos de granos de cacao tostados, tal como chocolate, contienen acrilamida. La acrilamida tiene un poder carcinógeno en ratas que es similar al de otros carcinógenos en alimentos, pero para humanos, la potencia relativa en alimentos y bebidas no es conocida. Sólo están disponibles datos limitados de población humana para acrilamida y estos no proporcionan evidencias de riesgo de cáncer a partir de exposición ocupacional. (FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food: Summary Report; Ginebra, Suiza, 25-27 junio 2002.)

- 20 Aunque se necesita más investigación para valorar los efectos sobre la salud, si hay, que pueden resultar del consumo humano de acrilamida a los niveles encontrados comúnmente en productos de cacao, muchos consumidores han expresado preocupación. En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para reducir el nivel de acrilamida en granos de cacao tostados. También es un objeto de la presente invención proporcionar granos de café tostados que tiene 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 cacao tostado tiene niveles reducidos o bajos de acrilamida.

### Compendio de la invención

- 30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un polvo de cacao negro que comprende menos de 350 ppm de acrilamida según se define en la reivindicación 1. En una realización, el método comprende añadir una enzima que reduce la asparagina a los granos de cacao.

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

- 35 Figura 1. La figura 1 describe el mecanismo de reacción propuesto por el que se forma acrilamida a partir de asparagina y una fuente de carbonilo (tal como glucosa).  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser = H,  $CH_3$ ,  $CH_2OH$ ,  $CH_2(CH_2)_nCH_3$ , o cualquier otro componente que componga un azúcar reductor; n puede ser cualquier número menor de 10.

Figura 2. La figura 2 describe el mecanismo de reacción propuesto por el que la 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 reacción.

### 40 Descripción detallada de la invención

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

- 45 Sin ser limitante de la teoría, se cree que la acrilamida se forma vía el mecanismo de reacción que se describe en la figura 1. Se cree que el grupo alfa amino de la asparagina libre reacciona con una fuente de carbonilo, formando una base de Schiff. Por calentamiento, la base de Schiff adiciona descarboxilados, formando un producto que puede o bien: (1) hidrolizarse para formar una amida beta-alanina (que puede, por calentamiento, degradarse mas para formar acrilamida) ó (2) descomponerse para formar acrilamida y la imina correspondiente. (Los solicitantes han descubierto que los átomos precursores del círculo comprenden los carbonos y nitrógenos en la acrilamida.)

En consecuencia, la formación de acrilamida en granos de cacao tostados se puede reducir eliminando la asparagina o transformando la asparagina en los granos de cacao en otra sustancia antes del tostado final de los granos. Cuando tales granos que contienen niveles reducidos de asparagina se someten a tostado final, la cantidad de acrilamida formada se reduce.

5 La adición de acrilamida que hidroliza el grupo amida en la cadena lateral de la asparagina antes del tostado final de los granos de cacao reduce el nivel de acrilamida presente en los granos de cacao tostados. Sin ser limitante con la teoría, se cree que la adición de tal enzima degrada la cadena lateral de asparagina, evitando así que la asparagina forme acrilamida. Haciendo eso, el enlace amida se hidroliza y la asparagina se transforma en ácido aspártico. Este mecanismo se describe en la figura 2.

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

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 concentraciones bajas; (e) la velocidad de reacción se puede controlar ajustando la temperatura, pH, y la cantidad de enzima empleada; y (f) se pueden desactivar después de que la reacción ha tenido lugar hasta el alcance deseado. (Food Chemistry, 4th Ed., Owen R. Fennema, Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1985, pp. 427, 433.)

A. Método para la reacción de acrilamida en granos de cacao tostados.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un polvo de chocolate negro que comprende menos de 350 ppb de acrilamida, dicho método comprende las etapas de:

- (1) proporcionar granos de cacao
- (2) opcionalmente secar los granos de cacao a baja temperatura,
- (3) tostar los granos de cacao,
- 25 (4) aventar los granos de cacao secos para formar nibs,
- (5) opcionalmente tostar los nibs,
- (6) moler los nibs para formar licor de cacao,
- (7) opcionalmente tostar el licor de cacao,
- (8) prensar el licor de cacao para dar torta de cacao o manteca de cacao,
- 30 (9) moler la torta de cacao para hacer polvo de cacao,
- (10) opcionalmente añadir base antes, durante, o después de cualquiera de los pasos 1-9, y
- (11) añadir una enzima que reduce asparagina antes, de cualquiera de las etapas 1-3, donde la enzima se deja reaccionar durante un cantidad de tiempo suficiente para dar como resultado granos de cacao en los que los niveles de asparagina se reduce al menos 90%.

35 La enzima preferente es asparaginasa.

1. Proporcionar granos de cacao que contienen asparaginasa.

El árbol del cacao, la fuente de los granos de cacao, crece en climas tropicales y subtropicales. Una vez recolectado, se quita el mucílago que cubre el grano. Los granos fermentan durante un número de días después de cosechar, después se secan. Se puede usar cualquier grano de cacao seco adecuado, incluyendo mezclas de varios tipos de granos, según la presente invención. Como se usa en la presente memoria, el término "granos de cacao" o "granos" incluye granos de cacao en cualquier forma adecuada según se conoce en la técnica. Granos de cacao adecuados incluyen los descritos en Bernard W. Minifie, Chocolate, Cocoa, and Confectionery, AVI Publishing Co./Van Nostrand Reinhold, Nueva York, 1989 (de aquí en adelante "Chocolate, Cocoa, and Confectionery").

2. Opcionalmente secar los granos de cacao a baja temperatura.

45 Los granos de cacao opcionalmente se pueden secar por cualquier método adecuado a baja temperatura. Métodos adecuados de secado incluyen los conocidos en la técnica, tales como los descritos en Chocolate, Cocoa, and Confectionery. Como se usa en la presente memoria, secado a baja temperatura significa secado a una temperatura suficientemente baja para secar los granos pero no lo alta suficiente para tostarlos.

3. Tostado de los granos de cacao.

Los granos de cacao opcionalmente se pueden tostar. Se puede usar cualquier proceso adecuado que incluye tostado. Como se usa en la presente memoria, el término "tostado" incluye cualquier tratamiento térmico adecuado a los granos de cacao para crear sabores que son indicativos del cacao. Técnicas de tostado adecuadas incluyen las conocidas en la técnica, tales como las descritas en Chocolate, Cocoa, and Confectionery. En otra realización, los granos de cacao se tuestan a una temperatura baja como se conoce en la técnica.

4. Aventado de granos de cacao para formar nibs.

Como se conoce en la técnica, los granos de cacao secos después se aventan para formar nibs. El tamaño de los nibs puede ser de cualquier tamaño deseado. Sin embargo, los nibs de tamaño más pequeño son preferentes para facilitar la migración de enzimas a través de los nibs, debido al incremento del área superficial y la distancia reducida de migración.

5. Opcionalmente tostar los nibs.

Después los nibs opcionalmente se pueden tostar mediante cualquier método adecuado. Técnicas de tostado adecuadas incluyen las conocidas en la técnica, tales como las descritas en Chocolate, Cocoa, and Confectionery.

6. Molido de los nibs para formar licor de cacao.

Los nibs se pueden moler mediante cualquier método adecuado, tal como los conocidos en la técnica, para formar licor de cacao. Técnicas de molido adecuadas incluyen las descritas en Chocolate, Cocoa, and Confectionery.

7. Opcionalmente tostar el licor de cacao.

El licor de cacao opcionalmente se puede tostar. En el caso donde los granos de cacao se tuestan sólo suavemente antes de formar el licor de cacao y el nivel de humedad es relativamente alto, se pueden añadir enzimas y dejar que reacciones. Después el licor de cacao se tuesta más para desarrollar los sabores.

8. Prensado el licor de cacao para dar torta de cacao y manteca de cacao.

El licor de cacao opcionalmente se puede prensar para dar torta de cacao y manteca de cacao. Métodos de prensado adecuados incluyen los conocidos en la técnica, tales como los descritos en Chocolate, Cocoa, and Confectionery.

9. Molido de la torta de cacao para hacer polvo de cacao.

La torta de cacao opcionalmente se puede moler mediante métodos adecuados. Métodos de molido adecuados incluyen los conocidos en la técnica, tales como los descritos en Chocolate, Cocoa, and Confectionery.

10. Opcionalmente añadir base antes, durante, o después de cualquiera de las etapas 1-9 anteriores.

Opcionalmente se puede añadir base durante el procesado del grano de cacao, como se conoce en la técnica. Ver, por ejemplo, Chocolate, Cocoa, and Confectionery.

11. Añadir enzima que reduce asparagina antes de cualquiera de las etapas 1-3 anteriores.

Como se usa en la presente memoria, "enzima que reduce asparagina" incluye cualquier enzima capaz de reducir el nivel de asparagina en los granos de cacao. En una realización, la enzima que reduce asparagina es una enzima capaz de hidrolizar el grupo amida de la asparagina libre. Una enzima preferente para usar en la presente memoria es asparaginasa. Una fuente preferente de asparaginasa es Sigma-Aldrich, catálogo número A2925.

Como se usa en la presente memoria, los términos "enzima que reduce asparaginasa" y "enzima" incluyen una o más enzimas; por ejemplo, una mezcla de dos o más enzimas está incluida en el término. Por ejemplo, deamidasa que tienen funcionalidad de reducción de asparagina se incluyen en el término.

La enzima se puede añadir a los granos de cacao 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 cacao de cualquier modo adecuado, tal como directamente (por ejemplo, rociado, vertido o pulverizado sobre los granos de cacao, o los granos de cacao se pueden empapar en una disolución de enzimas) o indirectamente. Como se usa en la presente memoria, "añadir" la enzima a los granos de cacao incluye, pero no está limitado, cualquier modo de poner la asparagina y la enzima juntas.

La enzima se puede añadir en cualquier etapa adecuada del método antes de la terminación del tostado final para formar los granos de cacao tostados. Además, la enzima se puede añadir durante más de una etapa del método. En una realización, la enzima se añade a los granos antes o durante la fermentación. En otra realización, una disolución de enzimas empapa los granos secos.

Las enzimas se venden por unidades de actividad, mejor que por peso o volumen. Así, la cantidad efectiva de enzima requerida para lograr el nivel deseado de reducción de acrilamida dependerá de la actividad del producto de enzimas particular usado.

5 La cantidad de enzimas a añadir puede depender del nivel de reducción de asparagina, y por consiguiente del 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 cacao; los granos de cacao más ricos en asparagina generalmente requerirán niveles de enzima incrementados o tiempo de reacción incrementado para lograr el mismo porcentaje de reducción de acrilamida. La cantidad de enzima a añadir también puede depender de la enzima particular usada (por ejemplo, la actividad enzimática de la enzima particular) y el tipo particular de granos de cacao tratados. Un experto en la técnica será capaz de determinar la cantidad eficaz de enzima en base al tipo específico de cacao, la enzima específica, la actividad específica de la enzima, y el resultado deseado.

Métodos preferentes de añadir enzimas a los granos de cacao incluyen pulverizado, empapado, rociado y baño dominante. En una realización, la disolución de enzimas se aplica por pulverizado de la disolución sobre los granos con agitación ligera de los granos para crear una aplicación uniforme sobre la superficie de todos los granos.

15 En otra realización, los granos de cacao 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 cacao. Aún en otra realización, los granos de cacao se hidratan en una disolución y después se rocía un polvo de enzimas sobre los granos de cacao hidratados. Los granos se pueden sacar de la disolución mediante cualquier medio adecuado de separación de partículas de una disolución, tal como por filtrado.

Aún en otra realización, la enzima se añade a los granos por medio de un baño dominante. Uno tras otro, varios lotes de granos se empapan en una disolución que contiene enzimas 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 transforma la asparagina en ácido aspártico, creando así una fuerza impulsora para posterior extracción de asparagina en adiciones posteriores de lotes de granos. Los materiales extractables se pueden equilibrar con los granos de modo que los componentes de cacao solubles adicionales no se extraen, con excepción de la asparagina, que continúa reaccionando y siendo transformada por la enzima. El ácido aspártico que se forma a partir de la asparagina se absorbe por los granos y se equilibra. Se añade agua y/o disolución que contiene enzimas adicional después de cada lote de granos para reconstituir la disolución que se ha ido en el lote de granos previo; así se mantiene un volumen constante del baño dominante.

En una realización, al menos una porción de la asparagina se extrae de los granos de cacao, el extracto que resulta se trata con la enzima, después una porción del extracto se vuelve a añadir a al menos una porción de los granos de cacao; por ejemplo, la enzima se puede añadir al extracto, o el extracto se puede bombear a través de un lecho o una columna de enzimas inmovilizadas (enzimas o absorbidas o químicamente unidas a un sustrato, preferentemente un sustrato inerte, por ejemplo, piezas de plástico o cuentas en una columna).

La cantidad de tiempo que se necesita para que la enzima reaccione con la asparagina dependerá de factores incluyendo, pero sin ser limitante, el nivel deseado de reducción de asparagina (y por tanto de acrilamida), las características de los granos de cacao en particular (por ejemplo, composición química, cantidad de asparagina presente, tamaño de partícula), y la enzima particular añadida. Preferentemente, la enzima se deja reaccionar durante una cantidad de tiempo suficiente para dar como resultado granos de cacao en los que el nivel de asparagina está reducido al menos 90%. En general, cuanto más tiempo se deja que la enzima reaccione, más alto es el nivel de reducción de asparagina y por tanto más alto es el nivel de reducción de acrilamida en los granos de cacao tostados. La etapa de permitir un tiempo suficiente para que la enzima reaccione se puede llevar a cabo de cualquier modo adecuado; por ejemplo, se puede llevar a cabo simultáneamente con la adición de la enzima a los granos de cacao, mezclando la enzima con los granos de cacao, la absorción de la disolución enzimática por los granos de cacao, o combinaciones de ellos.

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

Después de que la enzima ha reaccionado en la cantidad deseada, opcionalmente se puede inactivar o eliminar de los granos de cacao. Cuando se usa una enzima es segura para el consumo (por ejemplo, se da y se encuentra naturalmente en alimentos comunes), se puede elegir no desactivar o eliminar la enzima. Alternativamente, la enzima se puede desactivar mediante cualquier método adecuado que inactive enzimas. Por ejemplo, la enzima se puede desactivar mediante el uso de calor, ajuste de pH, tratamiento con una proteasa, o combinación de ellos. Además, la enzima se puede eliminar de los granos de cacao mediante cualquier método adecuado incluyendo, pero sin ser limitante, extracción. La enzima se puede desactivar, eliminar, o someter a una combinación de desactivación y eliminación.

Desactivar la enzima se puede dar por calentamiento, así la etapa opcional de desactivación y tostado de los granos de cacao se puede llevar a cabo simultáneamente. El procesado con calor puede desnaturalizar e inactivar la enzima de modo que los granos de cacao tostados no se someten a actividad enzimática continua. Además, al menos una parte del tiempo que se permite la reacción enzimática se puede llevar a cabo durante la etapa de tostado.

12. Productos que comprenden granos de cacao tostados.

Los granos de cacao tostados se pueden usar como tal o se pueden usar para hacer una diversidad de productos de cacao tostado, tales como caramelos de chocolate, barras de chocolate, recubrimientos, concentrados líquidos, cacaos instantáneos o en polvo, bebidas de cacao (por ejemplo, cacaos listos para servir calientes o fríos, cacaos para vender, cacaos comerciales y a domicilio), mezclas, confiterías (por ejemplo, caramelos), postres (por ejemplo, tartas, helados, muses, cremas), pasteles (por ejemplo, bollo danés, donuts), salsas, y sopas (por ejemplo, chili).

En una realización, el polvo de cacao negro comprende menos de aproximadamente 350 ppb de acrilamida, preferentemente menos de aproximadamente 250 ppb, más preferentemente menos de aproximadamente 100 ppb.

B. Medios de practicar el método.

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

C. 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 cacao tostado, en el que dichos granos de cacao tostados tienen un nivel reducido de acrilamida;
- (b) un envase para contener el producto; y
- (c) un mensaje asociado con el producto.

El mensaje asociado con el envase informa al consumidor de que el producto tiene un nivel reducido de acrilamida. En una realización, el mensaje informa al consumidor de que el producto está hecho con granos de cacao que tienen niveles reducidos o bajos de asparagina. El mensaje puede ser material impreso adjuntado directa o indirectamente al envase, adjuntado directa o indirectamente cerca del envase, o alternativamente puede ser un mensaje impreso, electrónico o radiado asociado con el 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 cacao tostados, el producto que comprende granos de cacao tostados, y/o artículos de comercio alcanzan o exceden un nivel sugerido o obligatorio (límite regulado o nivel señal).

En adecuado cualquier envase en el que se puede dispensar, presentar, mostrar, o almacenar el producto que comprende los granos de cacao tostados. Envases adecuados incluyen, pero no son limitantes, bolsas, botes, cajas, coles, platos, tubos y latas.

Métodos analíticos.

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

1. Acrilamida.

Método para medir acrilamida (AA) en productos alimentarios.

Compendio.

A los productos alimentarios se agregó 1-<sup>13</sup>C-acrilamida (<sup>13</sup>C-AA) y se extrajo con agua caliente. El sobrenadante acuoso se extrajo tres veces con etil acetato, y los extractos de etil acetato se combinan y concentran y se analizan mediante LC/MS con monitorización selectiva de iones para detección específica de AA y <sup>13</sup>C-AA.

Extracción de la muestra.

1. Pesar 6,00 ± 0,01 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Nota: colocar la muestra en un procesador de alimentos y pulsar durante 30 segundos de modo que el tamaño de partícula sea aproximadamente 1/8 pulgadas o menos. Si la muestra es demasiado pequeña para molerse eficazmente en un procesador de alimentos, colocar la muestra en una bolsa de plástico nueva (por ejemplo, Whirl-

## ES 2 439 891 T3

Pak™ o equivalente) y pulverizar con una maza de goma hasta que el tamaño de partícula sea 1/8 pulgada o menos.

2. Añadir 120 µl de 100 ng/µl <sup>13</sup>C-AA en el agua destilada desionizada (ISTD 2), con una pipeta ajustable de 1000 µl (calibrada), directamente sobre la muestra.
- 5 3. Usando un dispensador, añadir 40 ml de agua destilada desionizada al matraz y cubrir con papel de aluminio.
4. Colocar en un baño de agua a 65°C 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 Ultra-Turrax® (T18 Basic) durante 30 segundos, o hasta que esté uniforme.
- 10 Enjuagar la probeta en el matraz con agua destilada desionizada.
6. Colocar 25 g del homogenizado en un vial de 8 oz.
7. Cerrar bien el tubo y centrifugar durante 30 minutos a 2500-5200 rpm.
8. Transferir 8 g del sobrenadante a otro vial de 8 oz teniendo cuidado de evitar partículas sólidas.
9. Añadir 10 ml de acetato de etilo con un dispensador, tapar, y agitar en vortex durante 10 segundos.
- 15 10. Permitir la rotura de cualquier emulsión; ayudar removiendo o agitando una o dos veces y después permitir que las capas se separen.
11. Transferir tanto como sea posible de la capa superior (acetato de etilo) a un vial de escintilación, sin transferir ningún líquido (agua) de la intercala. Extraer dos veces más con porciones de 5 ml de acetato de etilo y añadir al mismo vial de escintilación. Después, añadir aproximadamente 2 g de sulfato de sodio anhidro.
- 20 12. Concentrar el extracto con una corriente suave de nitrógeno en un baño de agua de 60-65°C hasta aproximadamente 1 ml. Transferir el extracto a un Pierce REACTI-VIAL™ o a un vial de vidrio de forma cónica equivalente y concentrar más el extracto hasta un volumen final de aproximadamente 100-200 µl. Colocar este extracto en un vial de automuestreo con una cubierta cónica.

### 25 Preparación de estándares.

Disoluciones patrón y estándares internos.

Disolución	Peso	Matraz volumétrico	Disolvente	Concentración (ppm)
Patrón 1	0,1000 g acrilamida (AA)	100 ml	Acetato de etilo	1000
ISTD 1	0,0100 g <sup>13</sup> C-Acrilamida	100 ml	Acetato de etilo	100
Patrón 2	0,1000 g acrilamida (AA)	100 ml	Agua destilada desionizada	1000
ISTD 2	0,0100 g <sup>13</sup> C-Acrilamida	100 ml	Agua destilada desionizada	100

Estándares intermedios.

Disolución	Volumen patrón 1 AA (µl)	Volumen matraz (ml)	Disolvente	Concentración (ppm)
INT 1	100	10	Acetato de etilo	10
INT 2	1000	10	Acetato de etilo	100

### 30 Estándares de calibración.

## ES 2 439 891 T3

Estándar	Volumen INT 1 (µm)	Volumen INT 2 (µm)	Volumen ISTD 1 (µm)	Volumen matraz (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 de limpieza homogenizadora.

Usar este procedimiento de limpieza siempre entre cada muestra.

- 5 1. Llenar un matraz Erlenmeyer de 1 l con agua caliente del grifo (≈80% lleno) y añadir una gota de líquido detergente Dawn™ (disponible de Procter&Gamble Co.) o equivalente.
2. Insertar el elemento dispersante de la sonda en el agua tanto como sea posible.
3. Homogenizar la disolución durante aproximadamente 10-15 segundos.
4. Vaciar la disolución limpiadora del Erlenmeyer; enjuagar y rellenar el matraz con agua caliente del grifo.
5. Homogenizar otra vez durante aproximadamente 10-15 segundos.
- 10 6. Vaciar el matraz y rellenar con agua caliente del grifo; homogenizar otra vez durante aproximadamente 10-15 segundos.
7. Si el agua no está clara y sin partículas, continuar homogenizando con agua caliente del grifo limpia tantas veces como sea necesario para lograr esta condición.
- 15 8. Cuando el agua caliente del grifo esté clara y sin partículas, enjuagar la sonda con agua destilada desionizada.

Análisis mediante LC/MS.

Se analizan muestras usando un Waters 2690 LC conectado a un espectrómetro de masa Micromass LCZ.

Fase móvil	100% agua, 10 mM NH <sub>4</sub> Ac, ajustado a pH 4,6 p/ácido fórmico
Columna	2,0 mm x 150 mm, YMC C18 AQ (disponible de Waters Corp.)
Caudal	0,2 ml/min
Conexión	Directa (sin separación)
Volumen de inyección	5 µl
Modo ionización MS	Electropulverizado, modo ión positivo
Modo detección MS	Monitorización selectiva de iones: m/z 72 (AA), m/z 73 ( <sup>13</sup> C-AA); tiempo de permanencia: 0,5 s

Análisis de datos.

5 Se dibuja la proporción de respuesta (área de AA punta/área de <sup>13</sup>C-AA punta) frente a la proporción correspondiente para una serie de cinco estándares en acetato de etilo. Todos los estándares contienen 4,5 µg/ml de <sup>13</sup>C-AA, y concentraciones de AA en el intervalo de 0 a 5 µg/ml. La regresión lineal resulta una curva de calibración a partir de la que se determinan la proporción de concentración en el extracto a partir de la medición de las proporciones de respuesta. Cuando esta proporción de concentración se multiplica por el nivel exactamente conocido de <sup>13</sup>C-AA (nominalmente 2 ppm) añadido a la muestra en la etapa dos del procedimiento de extracción, da el nivel de AA en ppm.

Cálculo de la muestra para LC/MS:

10 La curva de calibración se genera dibujando la proporción de respuesta (área m/z 72 / área m/z 73) sobre el eje y frente a la proporción de concentración ([ AA] / [<sup>13</sup>C-AA]) sobre el eje x. Para este ejemplo, la ecuación de esa línea es  $y = 0,899x + 0,0123$ .

Área medida de AA punta (m/z 72) a 4,0 min: 100,00

Área medida de <sup>13</sup>C-AA punta (m/z 73) a 4,0 min: 500,00

15 Proporción de respuesta  $R_f = 0,200$ . A partir de la pendiente y la intersección de la curva de calibración, se calcula  $R_c$  proporción de concentración:  $R_c = (0,200 - 0,0123) / 0,899 = 0,209$ .

Dado el nivel máximo de <sup>13</sup>C-AA en la muestra (2 ppm), el nivel medido de AA es  $0,209 \times 2 \text{ ppm} = 0,418 \text{ ppm}$ .

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

- 20
1. Todas las básculas usadas en la preparación de estándares y/o muestras, deben estar semanalmente sus calibradas con una serie de pesos calibrados. Las básculas deberían comprobarse al menos con tres pesos que cubran el intervalo de pesos muestra/estándar a medir.
  2. Diariamente se debería realizar una cubra de calibración de seis puntos.
  3. Un material de referencia de trabajo (WRM) se debería analizar con cada serie de muestras. La concentración de este material debería estar en  $2\sigma$  del promedio. Si no está, el instrumento debería recalibrarse y el WRM recalcularse.

25 2. Asparagina.

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

Principio.

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

Linealidad.

35 La curva de trabajo de calibración de cuatro estándares (50-600 ppm) da una correlación de 0,998 o mejor. Una curva calculada a 2000 ppm también da una correlación de 0,998.

Precisión.

Productos de patata:

40 Se agrega al almidón de patata cuatro niveles tanto de asparagina como de ácido aspártico (40, 200, 400, y 600 ppm). La asparagina se recupera al 100% (desviación estándar relativa de menos de 4%) y la recuperación de ácido aspártico es 110% (desviación estándar relativa de menos de 4%).

Referencias.

- 45
1. Herbert, P.; Santos; L; Alves, A. Journal of Food Science (2001), 66(9), 1319-1325.
  2. Heems, Dany; Luck, genevieve; Fraudeau, Chrisophe; Verette, Eric. Journal of Chromatography, A (1998), 798 (1 + 2), 9-17.

Repetitividad del sistema.

## ES 2 439 891 T3

Se hace por duplicado un material de trabajo de referencia de patatas fritas durante cinco días. Los resultados son los siguientes:

	ug/g asparagina	ug/g ácido aspártico
Media	7832,07	1440,98
STD	625,59	195,80
% RSTD	7,99	13,59

5 A continuación se sugieren productos químicos y equipamiento; sin embargo, se aceptan sustituciones o materiales equivalentes.

### Productos químicos

Agua HPLL o Milli-Q™ (Millipore)

Acetonitrilo, HPLC Grade	Burdick & Jackson nºAH015-4
Metanol, HPLC Grade	Fisher nºA452-4
Acetato de etilo	Baker nº9280-3
Pentano	Burdick & Jackson nºGC312-4
Asparagina monohidrato	EM Science
Ácido aspártico	Sigma nºA-8949
Ácido aminoisobutírico	Sigma nºA-8379
9-fluorenil cloroformato	ICN nº150200
Borato de sodio	EM Science nºSX 0355-1
Ácido bórico	Fisher nºA-73
Bicarbonato de sodio	ICN nº194847
Cloruro de tetrametil amonio	Fisher nº04640-500
Citrato de sodio	MCB nºSX445
Ácido cítrico anhidro	Baker nº0122-01
Acetona	Burdick & Jackson nº010-4
Ácido hidroclicóric, 0,1 N	Fisher nºSA48-500
Cloruro calcio dihidrato	Aldrich nº22,350-6

### Equipamiento

Pipetas de transferencia, polietileno (Samco nº222)

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

10 Pipeta volumétrica (10 ml)

Cilindros graduados (100-1000 ml)

Envases HPLC (500 ml, 1 ó 2 litros)

Vasos de precipitado

Agitadores magnéticos/ barras de agitar

Balance analítica (4 decimales)

Viales de escintilación

Tubos centrífugos, tapas de rosca (100x16 mm) con tapas

Viales de automuestreo (8x30 mm, 1 ml), con tapas alabeadas

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

Instrumento	Modelo	Fabricante
Robot	Microlab® SPE	Hamilton
Inyector bomba/HPLC	HP 1100	Agilent
Detector	RF10AXL	Shimadzu
Sistema de datos	Chemstation	Agilent

Columna.

Phenomenex Luna 100 x 4,6 mm C-18(2) 3 micrómetros nº00D-4251-EO

- 10 Preparación de reactivos.

Diluyente (pH 8,3-8,5; 1000 ml).

- 15
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 precipitados tarado seco.
  2. Colocar un vaso de precipitados vacío de 800 ml sobre un agitador magnético. Añadir aproximadamente 500 ml de agua Milli-Q™ y una barra 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 volumen con agua Milli-Q™; mezclar bien. Estabilizar hasta seis (6) meses.

- 20 Disolución de cloruro de calcio (100 gramos).

1. Pesar 40 gramos de cloruro de calcio dihidrato en un vaso de precipitados de 250 ml tarado.
2. Añadir 60 gramos de agua Milli-Q™. Mezclar bien. Almacenar a condiciones ambientales en una botella de cristal cerrada. Estabilizar hasta 1 año.

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

- 25 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 almacenamiento de HPLC de 500 ml.
2. Añadir 100 ml de acetato de etilo. Mezclar bien. Almacenar tapada en/bajo la campana de humo.

Fase móvil. (Tampón:metanol:acetonitrilo 60:5:35; pH 3,2, 2l)

- 30
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 precipitados tarado seco.
  2. Colocar un vaso de precipitados vacío de 800 ml sobre un agitador magnético. Añadir aproximadamente 500 ml de agua Milli-Q™ y una barra 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.
- 35

4. Transferir cuantitativamente la disolución de la etapa 3 a un cilindro graduado de 1 litro y diluir a 1000 ml con agua Milli-Q™; mezclar bien.
5. Transferir a un envase de fase móvil de HPLC de 2 litros.
- 5 6. Añadir 200 ml de agua Milli-Q™, 100 ml de metanol y 700 ml de acetonitrilo. Añadir los últimos dos disolventes con agitación vigorosa. Realizar esta operación en una campana, y vestir equipos de protección individual. Dirigirse a los respectivos Material Safety Data Sheets (MSDS) para detalles específicos.
7. Desgasificar la fase móvil por aspiración al vacío mientras se agita.

Disolución de reactivo FMOC (en acetona).

1. Pesar 0,10 gramos de reactivo FMOC en un matraz volumétrico tarado de 100 ml.
- 10 2. Añadir acetona para disolver y diluir hasta el mismo volumen. Mezclar bien. Realizar esta operación en una campana. Llevar EPI especificado en el MSDS para productos químicos.
3. Almacenar refrigerado no más de seis (6) meses.

Disolución ácida para extracción de la muestra (HCl 5%).

1. Añadir 100 ml de agua Milli-Q™ a un vaso de volumen de 200 ml.
- 15 2. Añadir 4 ml de HCl 1N al volumen.

Completar el volumen con agua Milli-Q™.

Preparación de estándar interno (ácido aminoisobutírico).

ISTD A – Patrón de estándar interno A

1. Pesar 0,5 gramos de ácido aminoisobutírico en un vaso de volumen tarado de 250 ml.
- 20 2. Añadir 25 ml de HCl 1,0N y aproximadamente 100 ml de agua Milli-Q™. Mezclar agitando hasta disolver. Diluir hasta completar el volumen con agua Milli-Q™ y mezclar bien. Almacenar refrigerado durante no más de seis (6) meses.

ISTD B – Disolución B de estándar interno de trabajo (esta disolución se añade al estándar de calibración)

1. Pipetear 1 ml de patrón de estándar interno A en un matraz volumétrico de 100 ml.
- 25 2. Diluir hasta completar el volumen con agua Milli-Q™. Estabilizar durante un mes.

Preparación de estándar(es) de calibración.

Disolución de patrón de calibración.

- 30 En un vaso de volumen de 50 ml tarado, 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 sónico hasta que se disuelva, después completar el volumen con H<sub>2</sub>O Milli-Q™. La disolución es buena durante 6 meses refrigerada.

Estándares de trabajo.

Preparar los siguientes estándares de calibración de trabajo.

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

Las disoluciones son buenas durante un mes refrigeradas.

Preparación de muestras.

- 35 1. Pesar 1 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 ml.

2. Añadir 48,0 ml de disolución HCl al 0,5% 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 60°C durante 30 minutos.
5. Añadir 10 ml de dicloroetano a cada muestra.
- 5 6. Homogenizar la muestra durante 60 segundos.
7. Verter una parte de la muestra en tubo de centrifuga de 30 ml.
8. Centrifugar a 10.000 rpm durante 32 minutos a 5°C. El sobrenadante se usa en la etapa 1 "Muestras – dilución".

Preparación de estándares y muestras.

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

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

Preparación de muestras y estándares usando robot Microlab®

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

- 15 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 de Microlab®.
2. Colocar la rejilla con tubos vacíos en la posición más a la derecha del Microlab®.
3. Llenar un vial (escintilación) de cristal de 20 ml con disolución B de estándar interno de trabajo y colocar en el espacio de trabajo del Microlab®.
- 20 4. Seleccionar el método ADDISTD. (Mezcla 200 ul ISTD B, 50 ul disolución estándar, hasta 4000 ul de volumen total con agua Milli-Q™).
5. Ejecutar el método.
6. Retirar la serie de tubos de la posición izquierda y dejar a un lado para desechar.
7. Retirar la disolución de estándar interno de trabajo del espacio de trabajo del Microlab® y refrigerar.

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

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

1. Preparar dos series de tubos para cada muestra. Colocar aproximadamente 2 ml de muestra en una serie de tubos, colocar estos tubos llenos en la posición más a la izquierda de Microlab®.
2. Colocar la rejilla con tubos vacíos en la posición más a la derecha del Microlab®.
- 30 3. Seleccionar el método TRANSDIL. (Serie nº de muestras, 50 ul para cantidad de muestra, y 4000 ul para cantidad de dilución final con agua Milli-Q™).
4. Ejecutar el método.
5. Retirar la serie de tubos de la posición izquierda y dejar a un lado para desechar.

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

- 35 Etapa 3: adición del reactivo FMOC – fabricación del derivado fluorescente.

1. Preparar una rejilla de 100x16 mm de tubos con tapa de rosca.

## ES 2 439 891 T3

2. Colocar la rejilla en la posición de la rejilla más a la derecha del Microlab®.
3. Colocar los tubos de estándar y muestra de las etapas de dilución anteriores en la posición más a la izquierda del Microlab®.
- 5 4. Transferir una alícuota (22 ml) de disolución de reactivo FMOC a un vial de escintilación de cristal. Añadir aproximadamente 100 µl de disolución de cloruro de calcio al 40%; mezclar bien. (El cloruro de calcio se añade para hacer que el reactivo FMOC “se cargue” – necesario para detectarse por el Microlab®).
5. Colocar el vial sobre el espacio de trabajo del Microlab®.
6. Seleccionar el método ADDFMOC.
7. Cambiar las jeringas 1 & 2 del agua al diluyente (pH 8,3-8,5).
- 10 8. Realizar un lavado de al menos cinco (5) ciclos para las jeringas 1 & 2 usando diluyente (pH 8,3-8,5).
9. Ejecutar el método ADDFMOC. (Mezcla 450 µl de disolución FMOC, 250 µl de muestra de ADDISTD anterior hasta un volumen final de 1300 µl 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.
- 15 12. Retirar la serie de tubos de la posición más a la derecha y colocar en la campana de humos. Dejar reposar 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. Cerrar y agitar en vortex a alta velocidad durante dos (2) minutos para extraer el reactivo FMOC sin reaccionar.
14. Preparar otra serie de tubos de 55x16 mm. Añadir 1 ml de disolución de fase móvil a cada tubo.
- 20 15. Transferir la capa acuosa (más baja) de 1,0 ml de los tubos de centrifugación a los tubos 55x16 mm.
16. Desechar la capa superior (orgánica).
17. Transferir las muestras a los viales de automuestreo y cerrar.

Cromatografía.

Condiciones de operación.

25 HP 1100 con software Chem Station

Detector: detector Waters 474 Scanning Fluorescence

Mode: Norm

Señal: 0,0000

Longitud de onda: Ex 260 Em 313

30 Aumento: 10

Atten: 1

Respuesta: FST

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

Método LC

35 Caudal: 1000 ml/min

Preparación isocrática (ver preparación de reactivos – fase móvil)

Volumen de inyección: 10,0 µl

Ajustes de temperatura: no se controlan

Cálculos.

Se calculan las disoluciones de la muestra frente una curva estándar de cantidades conocidas usando conteos de área:

$$y = mx + b$$

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

5  $(y - b)/m = x$

Asparagina ppm = (área asparagina/área ISTD - intersección)/pendiente

Ejemplo:

$$\text{Asparagina ppm} = 8215,45436/551,828 - -0,0165)/0,0023 = 176,93 \text{ ppm}$$

[ppm = ug/ml]

10 Corrección por dilución/homogenización en la etapa de preparación de la muestra.

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

[ppm = ug/ml]

Ejemplo:

$$\text{ug/g asparagina} = 176,93 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}/1,0083 \text{ g} = 8773,65 \text{ ug/g}$$

15 Criterio de aceptabilidad:

. la precisión de la muestra a comprobar del material de referencia de trabajo 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 de análisis LC.

20 La figura 3 describe un cromatograma de muestra de análisis LC.

RT	Compuesta
4,5 min	Asparagina
6,6 min	Ácido aspártico
11,5 min	Reactivo FMOC
20,7 min	ISTD

3. % de reducción de acrilamida.

% reducción acrilamida = [(nivel de acrilamida en la muestra control - nivel de acrilamida en la muestra tratada con enzimas) / nivel de acrilamida en la muestra control] x 100.

25 La muestra control se prepara exactamente de la misma manera que la muestra tratada con enzimas, con la excepción de que no se añaden enzimas.

4. % de reducción de asparagina.

% reducción asparagina = [(nivel de asparagina en la muestra control - nivel de asparagina en la muestra tratada con enzimas) / nivel de asparagina en la muestra control] x 100.

30 La muestra control se prepara exactamente de la misma manera que la muestra tratada con enzimas, con la excepción de que no se añaden enzimas.

### Ejemplos

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

Ejemplo 1.

5 Se añade una cantidad eficaz de asparaginasa a granos de cacao de Costa de Marfil en la forma de una disolución y se deja reaccionar durante un periodo de tiempo suficiente de modo que los granos de cacao tostados que resultan tienen una reducción de acrilamida mayor de 10%. Los granos de cacao tratados con enzimas después se tuestan, muelen, y prensan como se conoce en la técnica para formar licor de cacao. Se añaden dos partes de disolución de peróxido de hidrógeno a 100 partes de licor de cacao de Costa de Marfil y se calienta a 100°C durante 1 hora con agitación. Durante este tiempo, el agua se evapora y el licor que resulta tiene un color claro deseable.

Ejemplo 2.

Se prepara un chocolate con leche mediante un método convencional usando el licor de cacao de Costa de Marfil del ejemplo 1. El chocolate con leche tiene una reducción del nivel de acrilamida mayor de 10%.

10 Ejemplo 3.

15 Se añade una cantidad eficaz de asparaginasa a granos de cacao de Ghana en la forma de una disolución y se deja reaccionar durante un periodo de tiempo suficiente de modo que los granos de cacao tostados que resultan tienen una reducción de acrilamida mayor de 10%. Los granos de cacao tratados después se tuestan y muelen para formar nibs de cacao, como se conocen en la técnica. Los nibs de cacao después se empapan en peróxido de hidrógeno durante 30 minutos, se enjuagan varias veces con agua, después se secan a 65°C en un horno. Los nibs después se muelen para formar licor de cacao, como se conoce en la técnica. Después se prepara un chocolate negro mediante métodos convencionales usando el licor de cacao de Ghana. Este chocolate negro con leche tiene una reducción del nivel de acrilamida mayor de 10%.

Ejemplo 4.

20 El licor de cacao de Ghana del ejemplo 3 se prensa usando métodos convencionales para hacer manteca de cacao y torta de cacao. La torta de cacao se muele para formar polvo de cacao. El polvo de cacao tiene una reducción del nivel de acrilamida mayor de 10%.

Ejemplo 5.

25 El chocolate con leche del ejemplo 2 se usa para hacer barras de caramelo de chocolate como se conoce en la técnica. Las barras de caramelo se envasan para venta al menor al consumidor. La etiqueta de las barras de caramelo dicen, "chocolate sin acrilamida".

Ejemplo 6.

30 El polvo de cacao del ejemplo 4 se envasa para su distribución comercial. El folleto del producto y la hoja de especificación del polvo de cacao señalan que el polvo de cacao tiene una reducción del nivel de acrilamida mayor de 10%.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un polvo de chocolate negro que comprende menos de 350 ppb de acrilamida, dicho método comprende las etapas de:
  - (1) proporcionar granos de cacao
  - 5 (2) opcionalmente secar los granos de cacao a baja temperatura,
  - (3) tostar los granos de cacao,
  - (4) aventar los granos de cacao secos para formar nibs,
  - (5) opcionalmente tostar los nibs,
  - (6) moler los nibs para formar licor de cacao,
  - 10 (7) opcionalmente tostar el licor de cacao,
  - (8) prensar el licor de cacao para dar torta de cacao o manteca de cacao,
  - (9) moler la torta de cacao para hacer polvo de cacao,
  - (10) opcionalmente añadir base antes, durante, o después de cualquiera de los pasos 1-9, y
  - 15 (11) añadir una enzima que reduce asparagina antes, de cualquiera de las etapas 1-3, donde la enzima se deja reaccionar durante un cantidad de tiempo suficiente para dar como resultado granos de cacao en los que los niveles de asparagina se reduce al menos 90%.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha enzima que reduce asparagina es asparaginasa.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha enzima que reduce asparagina es una enzima capaz de hidrolizar el grupo amida de la asparagina libre.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polvo de cacao negro comprende menos de 250 ppb de acrilamida.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polvo de cacao negro comprende menos de 100 ppb de acrilamida.
6. Un polvo de cacao negro que comprende menos de 350 ppb de acrilamida.
- 25 7. El polvo de la reivindicación 6, que comprende menos de 250 ppb de acrilamida.
8. El polvo de la reivindicación 7, que comprende menos de 100 ppb de acrilamida.

Figura 1

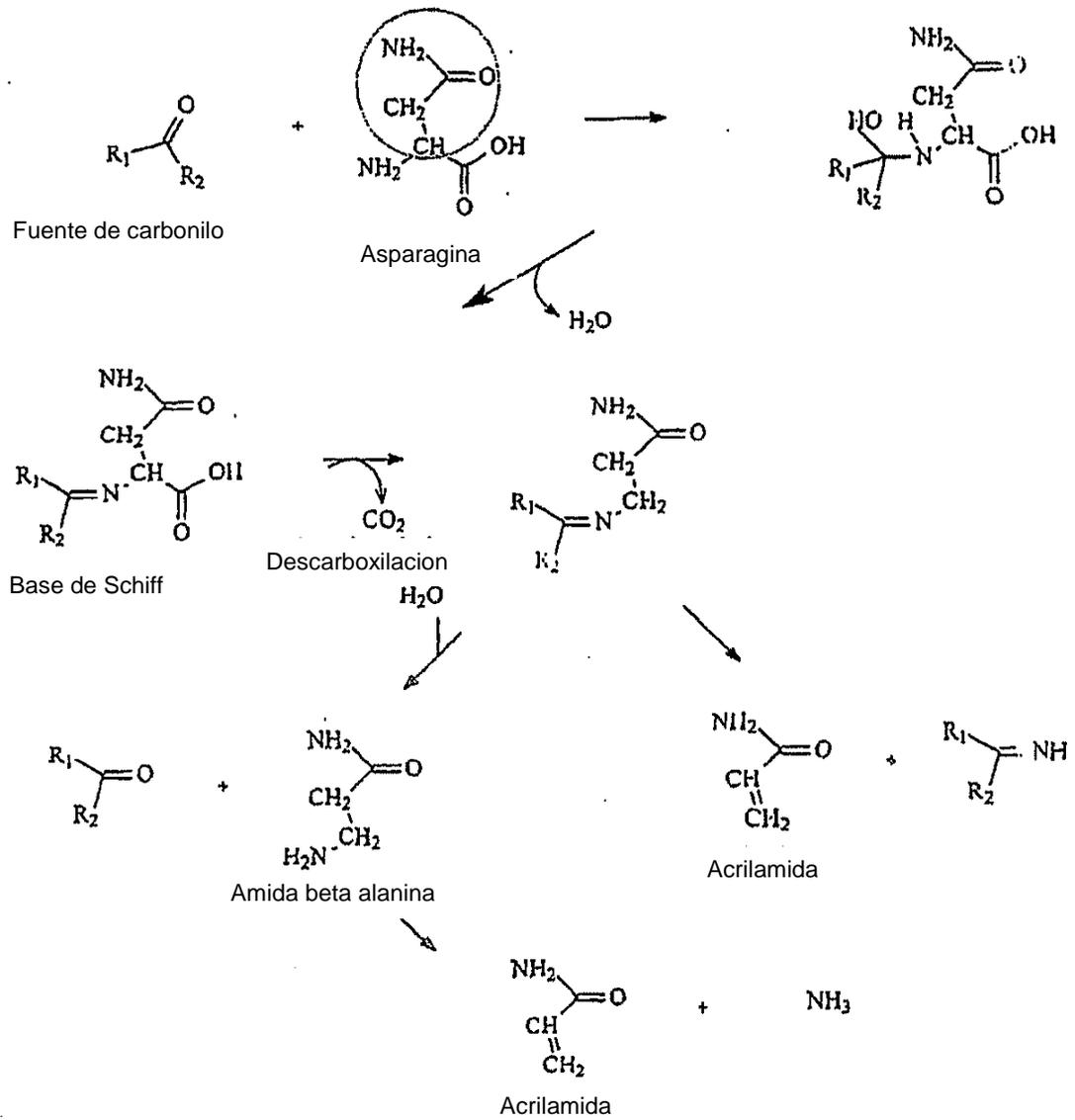


Figura 2

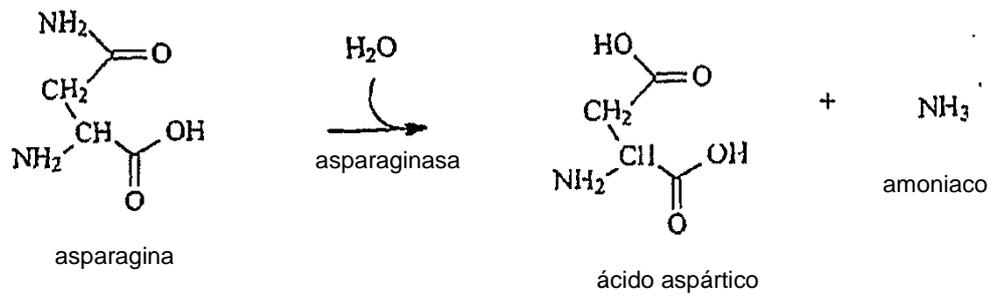


Figura 2. Modo de actuar de la asparaginasa

Figura 3

