

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 414**

51 Int. Cl.:

A23F 5/16 (2006.01)

A23F 5/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12745556 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2725919**

54 Título: **Método de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado**

30 Prioridad:

01.07.2011 IT MO20110164

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

05.08.2015

73 Titular/es:

**ILLYCAFFÈ S.P.A. (100.0%)
Via Flavia 110
34147 Trieste (TS), IT**

72 Inventor/es:

**NAVARINI, LUCIANO;
DEL TERRA, LORENZO;
COLOMBAN, SILVIA;
LONZARICH, VALENTINA y
SUGGI LIVERANI, FURIO**

74 Agente/Representante:

GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando

ES 2 542 414 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado

La invención se refiere a un método de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado.

- 5 La acrilamida (2-propenamida) es la amida del ácido acrílico y su formación en productos alimenticios que son ricos en almidón o que son sometidos a tratamientos térmicos a altas temperaturas fue identificado y registrado por primera vez en abril de 2002 por los investigadores de la Swedish National Food Agency (SNFA) y de la universidad de Estocolmo. Desde entonces, se han llevado a cabo informes similares en muchos otros países, entre los cuales, Reino Unido, Noruega y Estados Unidos (FAO/WHO "Discussion paper on acrylamide", Sesión 36, Rotterdam (NL), 22-26 de marzo de 2004).
- 10 La acrilamida puede producir efectos mutagénicos, cancerígenos y neurotóxicos. La acción mutagénica de este compuesto se ha demostrado -in vitro e in vivo- en células de mamíferos, ya sean células somáticas o células germinales, y también se ha demostrado que la acrilamida puede producir mutaciones transmisibles. La acrilamida es cancerígena en animales, ya que la misma produce un aumento de la incidencia de cierto número de tumores benignos y malignos en varios órganos (por ejemplo, tiroides, glándulas adrenales y gónadas), aunque no es posible
- 15 excluir a priori que la acción cancerígena también pueda presentarse en humanos. Los efectos neurotóxicos, representados esencialmente por neuropatologías periféricas (lesiones estructurales y funcionales del sistema nervioso periférico), se han identificado a nivel experimental, en animales, y a nivel clínico, en humanos ("European Union Risk Assessment Report - Acrylamide", 2002, EUR 19835 EN, 24, págs. 1-207, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburgo).
- 20 Aunque los productos alimenticios en los que es posible encontrar la acrilamida son en su mayor parte alimentos basados en patatas y basados en cereales, la acrilamida también está presente en el café tostado. De forma específica, la European Food Safety Authority (EFSA) consideró que los siguientes productos presentan riesgos y, en consecuencia, realizó un control sobre los mismos (mediante muestreo y análisis) de 2007 a 2009: patatas fritas (patatas fritas en forma de palo), patatas chip (patatas fritas en forma de rodajas finas y crujientes), productos
- 25 basados en patatas para cocinar en casa, pan, cereales para el desayuno, galletas, alimentos para bebés que contienen cereales, café tostado ("Results on Acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment", EFSA Journal, 2011; 9(4):2133).
- Desde un punto de vista cuantitativo, en los productos alimenticios de mayor riesgo se ha detectado acrilamida en concentraciones muy variables (expresadas en $\mu\text{g}/\text{kg}$ = ppm). Por ejemplo, en las patatas fritas se han detectado
- 30 concentraciones promedio de acrilamida que oscilan entre 450 y 1200 ppm, mientras que en galletas y crackers se ha detectado una concentración promedio de acrilamida igual a 410 ppm (Keramat J. et al.: "Acrylamide in foods: Chemistry and Analysis. A Review" Food and Bioprocess Technology, 2010, Vol. 4, No. 3, págs. 340-363, Springer). En el café tostado se han detectado concentraciones de acrilamida comprendidas entre 45 y 374 ppm (Andrzejewski D. et al. "Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52, No. 7, 2004, págs. 1996-2002).
- 35 Se han propuesto varios mecanismos para explicar la formación de acrilamida en los productos alimenticios mencionados anteriormente, que siguen siendo objeto de investigación científica. Principalmente, la acrilamida se forma a través de la reacción de Maillard, que constituye en realidad un sistema complejo de reacciones que se producen en diversos alimentos durante su cocción. Esquemáticamente, la reacción de Maillard comprende un proceso de condensación entre un aminoácido y un carbohidrato reductor (fructosa, glucosa). El aminoácido correspondiente es asparagina, mientras que, como alternativa a los azúcares reductores, es posible la intervención de compuestos que contienen carbonilo reactivo (tal como α -dicarbonilos, n -aldehídos, 2-oxiácidos). Mediante la condensación de la asparagina con el carbohidrato reductor o con el carbonilo reactivo se forma una imina o base de Schiff, que está descarboxilada. La base de Schiff descarboxilada puede descomponerse de forma alternativa en acrilamida e imina, u originar por hidrólisis 3-aminopropionamida (3-APA), que, mediante desaminación posterior, puede formar acrilamida (Friedman M. et al: "Review of Methods for the Reduction of Dietary Content and Toxicity of Acrylamide", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 56, No. 15, 2008, págs. 6113-6140). Además de las condensaciones de asparagina/carbohidrato o asparagina/carbonilo reactivo, se han realizado hipótesis sobre vías alternativas de formación de acrilamida (Keramat J. et al., mencionado anteriormente). Por ejemplo, mediante la degradación por oxidación de lípidos (monoglicéridos, triglicéridos) es posible la formación de acroleína (aldehído de ácido acrílico), que puede oxidarse hasta formar ácido acrílico: este último, al reaccionar con amoníaco, forma acrilamida. La 3-APA, que forma acrilamida por desaminación, puede ser producida mediante una reacción entre asparagina y ácido pirúvico (además de mediante hidrólisis de la base de Schiff mencionada anteriormente). Mediante la deshidratación del aminoácido de serina y la desulfuración del aminoácido de cisteína se produce ácido pirúvico, que es posible reducir a ácido láctico: este último es deshidratado a su vez hasta formar ácido acrílico que, al reaccionar con amoníaco, forma acrilamida. El ácido aspártico, la β -alanina y la carnosina (un dipéptido que consiste en β -alanina e histidina) se descomponen térmicamente en ácido acrílico que, en presencia de amoníaco, forma acrilamida. Además, el ácido aspártico puede producir ácido acrílico mediante procesos de descarboxilación y desaminación combinados (Yayalyan V.A. et al. "Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective" Journal

of the AOAC International, 2005, Ene-Feb; 88(1):262-7).

A partir de lo anteriormente descrito, resulta evidente que la formación de acrilamida durante los tratamientos térmicos a los que son sometidos diversos alimentos y, de forma específica, durante el tueste del café verde, es un fenómeno químicamente complejo y no despreciable cuantitativamente y tiene efectos en la salud de los consumidores que no deben subestimarse.

En consecuencia, se han propuesto algunos métodos para reducir la concentración de acrilamida en el café tostado.

Se ha evaluado experimentalmente un tratamiento con vapor de granos de café durante su tostado (Theurillat V. et al. "Impact of Roasting Conditions on Acrylamide Formation in Coffee" ASIC 21st International Conference, 11-15 Septiembre 2006, Montpellier, Francia). El café verde se tostó en un aparato de tueste equipado con inyección de vapor, a una temperatura de 200-240 °C, con un valor de a_w (actividad acuosa) comprendido entre 0,04 y 0,16. El tiempo de tueste se seleccionó para obtener un valor de CTN ("Colour Test Neuhaus", unidad colorimétrica de reflectancia usada para determinar el punto de tueste final) igual a 90. El café tostado producido de este modo se analizó para valorar su contenido de acrilamida y los resultados analíticos se compararon con los obtenidos en el café tostado de manera convencional (es decir, sin inyección de vapor).

Además de llevar a cabo la determinación cuantitativa de acrilamida en el café que fue tostado mediante inyección de vapor y en el café tostado de manera convencional, se analizaron sensorialmente muestras de bebida de café extraídas del café que fue tostado mediante inyección de vapor y muestras de bebida de café extraídas del café tostado de manera convencional.

Los resultados de la determinación cuantitativa comparativa mencionada anteriormente han mostrado que las muestras de café que fue tostado mediante inyección de vapor contenían menos acrilamida que las muestras de café tostado de manera convencional. Esto se debe a que, para obtener un valor de CTN análogo, el tueste mediante inyección de vapor requiere un tiempo de tueste más largo que el tueste convencional y, debido al tratamiento térmico prolongado, el contenido de acrilamida en el café tostado se reduce. De hecho, aunque la formación de acrilamida es inducida en realidad por el tratamiento térmico, las reacciones de formación de acrilamida prevalecen al inicio del ciclo de tueste, mientras que el fenómeno de degradación (física y química) de la acrilamida tiende a prevalecer hacia el final del ciclo.

No obstante, los resultados del análisis sensorial comparativo han mostrado que el método descrito anteriormente presenta un inconveniente significativo, que consiste en una alteración no deseada de las propiedades organolépticas del café tostado mediante inyección de vapor, una alteración que se debe a la prolongación del tiempo de tueste mencionada anteriormente.

Por lo tanto, desde un punto de vista meramente químico, el tueste del café mediante inyección de vapor podría contribuir a resolver el problema de la acrilamida, aunque, desde un punto de vista organoléptico, las propiedades del café tostado mediante inyección de vapor no son satisfactorias, lo que tiene claros efectos negativos en la comercialización del café.

WO 2004/037007 describe un método para reducir el contenido de acrilamida en el café tostado. El método da a conocer la degradación enzimática de un precursor de acrilamida, es decir, de asparagina, usando una solución de agua que contiene un enzima específico (asparaginasa). Por lo tanto, después de reducir el contenido de asparagina del café verde, este último se tuesta y, gracias a la reducción cuantitativa del precursor, se formará una cantidad mínima de acrilamida durante el tueste. De forma preliminar a dicho tratamiento enzimático, WO 2004/037007 da a conocer someter los granos de café verde a diversos tratamientos, que comprenden:

- reducción en fragmentos (por molido, triturado) de los granos de café para aumentar la superficie de contacto entre el café verde y el enzima;

- exposición de los granos de café a la acción de celulasa, hemicelulasa y/o pectinasa para degradar la celulosa y, por lo tanto, la estructura de los granos;

- secado de los granos de café o tratamiento de los granos de café con vapor a baja presión o a presión atmosférica para abrir los poros de los granos y facilitar la penetración en los granos de la solución de agua que contiene el enzima.

Un inconveniente significativo del método descrito en WO 2004/037007 consiste en la complejidad de los diversos tratamientos preliminares a los que deben ser sometidos los granos de café verde y que parecen ser sustancialmente indispensables para obtener una interacción eficaz entre el enzima en solución y la asparagina contenida en los granos de café verde. La multiplicidad de los pretratamientos descritos en el método de WO 2004/037007 hace que este último sea especialmente difícil de implementar y sustancialmente no económico.

Un objetivo de la invención consiste en mejorar los métodos para reducir el contenido de acrilamida en el café tostado.

Otro objetivo consiste en dar a conocer un método de reducción del contenido de acrilamida en el café tostado sin alterar las propiedades organolépticas de este último.

5 Otro objetivo consiste en dar a conocer un método de reducción del contenido de acrilamida en el café tostado que no requiere pretratamientos físicos y/o químicos complejos de los granos de café, a efectos de no provocar un gasto excesivo de tiempo y/o dinero.

Según la invención, se da a conocer un método de reducción del contenido de acrilamida en el café tostado según la reivindicación 1.

10 El método según la invención se basa en una serie de evidencias experimentales que, de forma sorprendente, son inesperadas y constituyen el resultado de una serie de investigaciones conducidas por Illycaffè, S.p.A. en extractos de agua obtenidos a partir de granos de café verde, es decir, de café no tostado, durante un procedimiento de descafeinado.

15 En primer lugar, se ha descubierto que, en dicho extracto de agua, la asparagina y el ácido aspártico están presentes en concentraciones (expresadas en $\mu\text{g/g} = \text{ppm}$) que son casi iguales o, en cualquier caso, muy parecidas como promedio. Esta evidencia experimental contradice la literatura científica conocida (Murkovic M. et al. "Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee" Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 69, 2006, págs. 25-32), según la cual el ácido aspártico estaría presente en el café verde en una concentración máxima por debajo de 200 $\mu\text{g/g}$, mientras que la asparagina alcanzaría una concentración máxima de 960 $\mu\text{g/g}$. En consecuencia, el ácido aspártico, aunque se menciona entre los precursores de acrilamida, constituía un factor considerablemente menos importante que la asparagina en la formación de acrilamida durante el tueste del café verde. Teniendo en cuenta que, al contrario, el ácido aspártico está presente en el café verde en una concentración no despreciable en comparación con la asparagina, la importancia del ácido aspártico en la formación de acrilamida durante el tueste sería al menos comparable a la de la asparagina. Además, debe añadirse que la degradación enzimática de la asparagina mediante asparaginasa (tal como se describe en WO 2004/037007) origina ácido aspártico, que se añade al ácido aspártico ya presente naturalmente en el café verde.

25 También se ha comprobado que los enzimas adecuados para degradar de forma selectiva la asparagina y el ácido aspártico (asparaginasa; aspartasa) pueden actuar de manera eficaz en el extracto de agua mencionado anteriormente, independientemente de la presencia simultánea de cafeína y otros componentes químicos del café verde, y que es posible reincorporar el extracto de agua en el café verde después del tratamiento enzimático con asparaginasa y aspartasa. La posibilidad de reincorporar en los granos los componentes químicos del café y, por lo tanto, también las sustancias responsables del perfil aromático del café, hace que el método según la invención permita mantener inalteradas las propiedades organolépticas del café tostado y de la bebida de café extraída a partir del mismo.

35 El ácido aspártico contenido en el extracto de agua (el presente originalmente en el café verde y el producido por degradación enzimática de la asparagina) es degradado enzimáticamente por la aspartasa, con la producción consecuente de ácido fumárico. Este último componente, incluido entre los componentes químicos del café (Maier H.G. "The acids of coffee", 1987, ASIC, 12^o Colloque Scientifique International sur le Café, Montreux), no altera las propiedades organolépticas del producto acabado y no interviene en los procesos de formación de acrilamida. De forma específica, el ácido fumárico se produce si se usa un aspartato amoniaco-liasas (E.C. número 4.3.1.1.) como enzima que tiene actividad de aspartasa.

40 No obstante, de forma alternativa y/o en combinación con el enzima mencionado anteriormente, es posible usar otros enzimas conocidos que tienen la capacidad de transformar el ácido aspártico en moléculas que no son precursoras de acrilamida.

45 De esta manera, es posible obtener un café verde que tiene un contenido reducido de dos precursores importantes de acrilamida, es decir asparagina y ácido aspártico. Por lo tanto, es posible tostar este café verde usando métodos de tueste conocidos, y el café tostado obtenido de este modo presentará unos valores reducidos de concentración de acrilamida.

50 Debe observarse que, a diferencia de los métodos conocidos, el método según la invención no comprende elaborar pretratamientos químicos y físicos de los granos de café, tal como se describe en WO 2004/037007, ya que es suficiente obtener un extracto en fase acuosa a partir de los granos de café verde. Es posible obtener el extracto siguiendo un procedimiento conocido (descrito en CA 1203111) que se usa para descafeinar el café verde.

Por lo tanto, el método según la invención permite producir un café tostado que tiene un contenido reducido de acrilamida sin que sea necesario un gasto excesivo de tiempo y/o dinero.

55 A diferencia de lo descrito en la literatura científica (Theurillat V. et al., mencionado anteriormente), es posible usar métodos de tueste convencionales y, de forma específica, tiempos de tueste que no son excesivamente prolongados. Por lo tanto, el método según la invención permite obtener un café tostado que tiene un contenido reducido de acrilamida y en el que las propiedades organolépticas deseadas permanecen inalteradas y pueden ser

apreciadas por el consumidor. La conservación de las propiedades organolépticas inalteradas del café tostado también se debe al hecho de que el tratamiento enzimático se lleva a cabo en el extracto de agua, que se reincorpora posteriormente en los granos de café verde, sin pérdida de los solutos contenidos en este último.

- 5 A título de ejemplo no limitativo, a continuación se describe un procedimiento industrial basado en el método según la invención y que permite producir un café tostado que tiene un contenido reducido de acrilamida.

Ejemplo 1 - Producción de café tostado con un contenido reducido de acrilamida

- 10 Se dispone una cantidad de granos de café verde (*Coffea arabica*) igual a 1,2 kg en un aparato de extracción de tipo conocido que tiene una capacidad de 10 litros. Después de introducir en el aparato de extracción un volumen de líquido de extracción, es decir, agua, igual a 7,5 litros, los granos de café son sometidos a extracción (en agua) a una temperatura igual a 80 °C y durante un tiempo igual a 5 h.

Esta etapa de extracción puede llevarse a cabo durante un tiempo inferior o superior a 5 h, de forma específica, comprendido entre 3 h y 12 h.

Además, durante la etapa de extracción, la temperatura puede ser inferior o superior a 80 °C y, de forma específica, la misma puede estar comprendida entre 50 °C y 90 °C.

- 15 Durante toda la duración de la etapa de extracción el sistema se mantiene en agitación constante y el vapor formado se condensa por reflujo en el extractor.

Al final de la etapa de extracción se obtienen un extracto de agua y un café verde extraído y se separan. Por "café verde extraído" o "café no tostado extraído" se entenderá un café verde (no tostado) cuyos granos han sido sometidos a extracción.

- 20 El extracto de agua, que contiene asparagina y ácido aspártico, tiene un volumen igual a aproximadamente 6 litros y un pH igual a aproximadamente 5,0-5,5. El extracto de agua se enfría y se mantiene a 37 °C en un recipiente que tiene una capacidad adecuada y se dispone en un agitador termostático, en el que el mismo se mezcla con una solución (0,30 ml) que contiene al menos un enzima que es adecuado para degradar la asparagina, es decir, una asparaginasa, y al menos un enzima que es adecuado para degradar el ácido aspártico, es decir, una aspartasa.

- 25 Es posible usar como asparaginasa una preparación enzimática de asparaginasa que se obtiene a partir de *Escherichia coli* (SIGMA, A3809, 100 unidades) o una preparación enzimática de asparaginasa que se obtiene a partir de *Aspergillus niger* (SPRIN Technologies, Cod. SBNNAN).

Es posible usar como aspartasa una preparación enzimática de aspartasa que se obtiene a partir de *Escherichia coli* (SPRIN Technologies, Cod. SBANN).

- 30 La cantidad, es decir, el número de unidades, de asparaginasa y de aspartasa a usar en el tratamiento enzimático es variable según las condiciones de la reacción.

De hecho, es posible optimizar el proceso dejando actuar grandes cantidades de dichos enzimas durante un tiempo de reacción reducido o dejando actuar cantidades reducidas de los enzimas durante un tiempo de reacción prolongado.

- 35 En consecuencia, también el tiempo de reacción es variable y se selecciona para permitir completar la compatibilidad de reacción con la cantidad de enzimas usados. Por ejemplo, el tiempo de reacción puede estar comprendido entre 10 minutos y 120 minutos y, de forma específica, puede ser igual a 30 minutos.

- 40 Además, la temperatura de reacción puede variar basándose en las propiedades de los enzimas usados y, por lo tanto, puede ser superior o inferior a 37 °C. De forma específica, la temperatura de reacción puede estar comprendida entre 25 °C y 60 °C.

Para llevar a cabo el tratamiento enzimático, además de las preparaciones enzimáticas mencionadas anteriormente basadas en asparaginasa y en aspartasa, resulta claro que es posible usar (modificando en caso necesario el entorno de reacción y/o las condiciones según las modalidades, de forma evidente para un experto en la técnica) cualquier otra fuente de actividad de asparaginasa o aspartasa (aplicable industrialmente).

- 45 Dichas fuentes de actividad de asparaginasa o de aspartasa pueden seleccionarse de un grupo que consiste en: enzimas en solución, enzimas inmovilizados (catalizadores biológicos en fase heterogénea), lisados bacterianos no purificados, bacterias inmovilizadas.

Además de usar dichas fuentes de actividad de aspartasa, es posible degradar químicamente el ácido aspártico usando procedimientos químicos no enzimáticos conocidos.

- 50 También es posible separar el tratamiento enzimático con asparaginasa del tratamiento enzimático con aspartasa mezclando el extracto de agua posteriormente con dos soluciones distintas, una que contiene la asparaginasa y otra

que contiene la aspartasa, seleccionando tiempos de reacción y temperaturas adecuados, tal como se ha descrito previamente.

5 Por lo tanto, es posible añadir la asparaginasa al extracto de agua y, una vez ha pasado un periodo de tiempo suficiente para permitir completar la reacción, añadir la aspartasa al extracto de agua y esperar a que se complete esta segunda reacción.

De forma alternativa, el tratamiento con aspartasa puede preceder el tratamiento con asparaginasa.

Al final del tratamiento enzimático el extracto de agua se concentra en vacío a través de un evaporador giratorio, a una temperatura de 50 °C, hasta obtener un volumen igual a 1 litro.

10 Esta etapa de concentración puede llevarse a cabo a una temperatura inferior o superior a 50 °C, de forma específica, entre 40 °C y 65 °C.

En la etapa de concentración también es posible usar otros procedimientos conocidos, tal como, por ejemplo: evaporación a presión atmosférica, pervaporación, concentración por congelación (concentración mediante congelación), ósmosis inversa y nanofiltración.

15 En paralelo al tratamiento enzimático y a la concentración posterior del extracto de agua, el café verde extraído se seca parcialmente a una temperatura de 80 °C hasta alcanzar una humedad comprendida entre el 10% en peso y el 30% en peso y, de forma específica, comprendida entre el 20% en peso y el 25% en peso.

Cuando el café verde extraído ha alcanzado el contenido de humedad deseado, por ejemplo, comprendido entre el 20% en peso y el 25% en peso, el extracto de agua concentrado se reincorpora en el café verde para obtener un café verde reincorporado.

20 Por lo tanto, por "café verde reincorporado" o "café no tostado reincorporado" se entenderá un café (no tostado) verde en cuyos granos se ha reincorporado el extracto de agua concentrado, es decir, un café (no tostado) verde que ha recuperado las sustancias (componentes de café) que han sido extraídas durante la etapa de extracción.

Esto se consigue disponiendo el café verde extraído en un recipiente adecuado, añadiendo el extracto de agua concentrado y mezclándolos a temperatura ambiente durante un tiempo igual a 1 h.

25 De este modo, se obtiene un café verde reincorporado con un contenido reducido de asparagina y de ácido aspártico que se seca nuevamente a una temperatura de 80 °C hasta alcanzar una humedad residual comprendida entre el 8% en peso y el 12,5% en peso y, de forma específica, una humedad igual al 10% en peso.

De esta manera, se obtiene un café verde reincorporado seco que tiene un contenido reducido de asparagina y de ácido aspártico y que está listo para tostar usando métodos de tueste conocidos.

30 El café tostado producido de esta manera tiene un contenido reducido de acrilamida: de forma específica, en el café tostado mencionado anteriormente, la reducción de acrilamida es superior al 80%.

Para llevar a cabo un control de calidad del procedimiento descrito anteriormente, es posible tomar muestras del extracto de agua tratado enzimáticamente y/o del café tostado y someter las muestras tomadas a análisis.

35 De forma específica, las muestras de extracto de agua tratado enzimáticamente pueden analizarse mediante métodos conocidos, tal como, por ejemplo, GC-MS (cromatografía de gases - espectrometría de masas), a efectos de comprobar la concentración residual de asparagina y de ácido aspártico.

40 Las muestras de café tostado pueden ser molidas, y el café tostado en polvo obtenido de este modo puede ser analizado mediante métodos conocidos, tal como, por ejemplo, LC-ESI-MS-MS (cromatografía de líquidos - ionización por electropulverización - espectrometría de masas en tándem), a efectos de comprobar la concentración de acrilamida y controlar la concentración residual de acrilamida.

45 Debe observarse que los valores de los diversos parámetros mostrados en el Ejemplo 1 (cantidad de material original usado, volumen de agua usado para la extracción, capacidad del aparato de extracción, duración de la etapa de extracción, etc.) son simplemente ilustrativos y, por lo tanto, pueden ser modificados de forma adecuada por un experto en la técnica basándose en la cantidad y/o las propiedades organolépticas del producto acabado (café tostado) que se desea obtener.

Además, debe observarse que el café tostado producido a través del procedimiento industrial descrito en el Ejemplo 1 es un café que contiene cafeína, ya que en la etapa de reincorporación se recuperan todos los componentes del café.

50 No obstante, es posible modificar dicho procedimiento llevando a cabo una etapa de descafeinado antes de la etapa de tratamiento enzimático.

La etapa de descafeinado puede llevarse a cabo a través del procedimiento descrito en CA 1203111, es decir, haciendo que el extracto de agua pase de forma alternativa mediante una bomba y un filtro a través del extractor y a través de unas columnas de adsorción que contienen carbón activo o resinas de adsorción de tipo conocido. De esta manera, el extracto de agua queda exento de cafeína antes de ser tratado enzimáticamente.

5 Para aumentar la selectividad del carbón activo con la cafeína, es posible cargar previamente (por adsorción) el carbón activo con una o más sustancias que están presentes en el extracto de agua del café, tal como se describe, por ejemplo, en US 5208056. De esta manera, es posible crear un equilibrio químico entre dicha sustancia, tal como está presente en el extracto de agua del café, y la misma sustancia adsorbida en el carbón activo. En consecuencia, el carbón activo es inducido a adsorber cantidades más grandes de cafeína. Por ejemplo, el carbón activo puede estar cargado previamente con soluciones de agua que contienen azúcares (Heilmann W. "A modified Secoffex process for green bean decaffeination" 1991, 14^o Colloque Scientifique International sur le Café, San Francisco; US 5208056) y ácidos (US 5208056). Los azúcares pueden comprender sacarosa y/o glucosa, mientras que los ácidos pueden comprender ácido acético, ácido hidroclorehídrico, ácido fórmico (US 5208056).

10 La etapa de descafeinado también puede llevarse a cabo mediante otros métodos conocidos, siempre que esos métodos usen agua como disolvente de extracción de la cafeína, siendo definibles por lo tanto como métodos de "descafeinado por agua".

La etapa de descafeinado también puede llevarse a cabo después del tratamiento enzimático, haciendo que el extracto de agua tratado enzimáticamente pase a través de las columnas de adsorción.

15 Como alternativa adicional, la etapa de descafeinado puede llevarse a cabo durante el tratamiento enzimático, por ejemplo, inmovilizando las enzimas en el interior de las columnas de adsorción, es decir, en el carbón activo o en las resinas de adsorción.

Además, en consecuencia, al ser posible separar el tratamiento enzimático con asparaginasa del tratamiento enzimático con aspartasa, es posible interponer la etapa de descafeinado entre los dos tratamientos enzimáticos distintos.

20 Por lo tanto, es posible tratar el extracto de agua con la asparaginasa para hacer que el extracto de agua tratado enzimáticamente pase a través de las columnas de adsorción y tratar posteriormente el extracto de agua descafeinado con aspartasa.

De forma alternativa, es posible tratar el extracto de agua con la aspartasa para hacer que el extracto de agua tratado enzimáticamente pase a través de las columnas de adsorción y tratar posteriormente el extracto de agua descafeinado con asparaginasa.

25 Para realizar el descafeinado, la extracción con agua deberá prolongarse más allá de las 5 h mencionadas en el Ejemplo 1, y la duración total de la etapa de extracción puede establecerse según un criterio bien conocido por los expertos en la técnica, es decir, basándose en el contenido residual de cafeína a obtener.

30 Algunos de los procedimientos analíticos y experimentales usados en las investigaciones mencionadas anteriormente llevadas a cabo por Illycaffè, S.p.A. en extractos de agua de café verde se describen a continuación a título de ejemplo.

Ejemplo 2 - Extracción de precursores de acrilamida de aminoácidos

35 Se disponen 30 g de café verde (*Coffea arabica*) en contacto con 180 ml de agua en un recipiente de tres cuellos recubierto. El recipiente se mantiene a una temperatura de 80 °C mediante un termostato y en agitación constante mediante un agitador magnético. La extracción se lleva a cabo durante 5 horas, mientras que el vapor formado se condensa por reflujo en el recipiente.

40 Después de las 5 horas, el extracto de agua, con un pH igual a 5,5, se recupera y se somete a una determinación cualitativa de los precursores de acrilamida de aminoácidos. Las muestras purificadas y derivadas se obtienen del extracto mediante un kit denominado "EZ:faast™ - Free (Physiological) Amino acid Analysis" (Phenomenex Inc. USA, No. KG0-7166), y las muestras se analizan con GC-MS. Para el análisis instrumental se usan una columna cromatográfica de gases (incluida en el kit) "ZB-AAA 10m x 0.25 mm Amino Acid Analysis GC Column" y un sistema de cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas de Agilent Technologies USA.

El análisis descrito anteriormente se lleva a cabo en una pluralidad de muestras de *C. arabica* de origen geográfico distinto. Los resultados analíticos se muestran en la siguiente Tabla A:

50 Tabla A

Muestra	Asparagina (µg/g)	Ácido aspártico (µg/g)
Mezcla	549	453

Muestra	Asparagina (µg/g)	Ácido aspártico (µg/g)
Brasil/lote 1	482	867
Brasil/lote 2	471	504
Etiopía	491	497
Kenia	556	334
India	953	898

Basándose en los resultados analíticos mostrados en la Tabla A, el promedio de los valores de concentración de asparagina es igual a aproximadamente 584 µg/g y el promedio de los valores de concentración de ácido aspártico es igual a aproximadamente 592 µg/g.

5 **Ejemplo 3 - Cantidad de acrilamida en cafés tostados con una composición de aminoácidos diferente del café verde inicial**

10 Un lote de café verde comercial (*C. arabica*) procedente de Guatemala y un lote de café verde comercial (*C. arabica*) de la variedad *laurina* procedente de Guatemala se tuestan en una planta industrial para obtener en ambos casos un grado de tueste medio (pérdida de peso total del 15,0 - 16,0%). En las muestras iniciales de café verde, el contenido de asparagina y de ácido aspártico se determina según el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Los cafés tostados se someten a análisis para verificar la concentración de acrilamida. Para cada café tostado, 1 g de café en polvo (café tostado molido) se somete a extracción, según un método de extracción conocido (Hoenicke K. et al. "Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography - tandem mass spectrometry and gas chromatography - tandem mass spectrometry", Analytica Chimica Acta, Vol. 520, 2004, págs. 207-215). El extracto correspondiente se somete a LC-ESI-MS-MS usando una columna "LiChrospher 100 CN" para cromatografía líquida (Merck, Alemania).

15 Los resultados analíticos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla B:

Tabla B

Muestra	Asparagina (µg/g)	Ácido aspártico (µg/g)	Acrilamida (µg/kg)
Guatemala	571	577	120
Guatemala var. <i>laurina</i>	490	187	88

20 Los resultados de la Tabla B muestran que un contenido de acrilamida significativamente inferior en el café tostado se corresponde con un contenido de ácido aspártico inferior en el café verde inicial.

Esta evidencia experimental confirma la importancia del ácido aspártico como precursor de acrilamida y permite asegurar que, reduciendo el contenido de ácido aspártico en el café verde, es posible reducir el contenido de acrilamida en el café tostado.

25 **Ejemplo 4 - Tratamiento enzimático del extracto de agua**

Dos extractos de agua, preparados tal como se describe en el Ejemplo 2 y obtenidos a partir de café verde (origen: India y Etiopía), se tratan con asparaginasa (SIGMA, A3809, 100 unidades) durante 30 minutos a 37 °C.

30 En cada muestra se llevan a cabo 3 determinaciones cuantitativas de los aminoácidos de asparagina y de ácido aspártico, antes de añadir el enzima (T0), 2 minutos después de añadir el enzima (T1), 30 minutos después de añadir el enzima (T2).

La determinación cualitativa de asparagina y de ácido aspártico se lleva a cabo con GC-MS, según el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

Los resultados analíticos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla C:

Tabla C

Muestra	India T0	India T1	India T2	Etiopía T0	Etiopía T1	Etiopía T2
Asparagina (ppm)	520	382	<5	500	448	<5
Ácido aspártico (ppm)	670	672	1242	558	566	1072

Los resultados de la Tabla C muestran que el enzima asparaginasa, en las condiciones de reacción mencionadas anteriormente (37 °C; 30 minutos), permite transformar la asparagina presente en el extracto de agua en ácido aspártico sin que se produzca una inhibición por la presencia (en el extracto de agua) de los otros componentes químicos del café verde.

5

Ejemplo 5 - Procedimiento de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado

Se disponen 120 g de granos de café verde (*Coffea arabica*; origen: Brasil) en contacto con 750 ml de agua en un recipiente de tres cuellos recubierto. El recipiente se mantiene a una temperatura de 80 °C mediante un termostato, así como en agitación constante mediante un agitador magnético. La extracción se lleva a cabo durante 5 horas, mientras que el vapor formado se condensa por reflujo en el recipiente.

10

Después de las 5 horas, el extracto de agua se recupera y queda sometido a la determinación cuantitativa de asparagina y de ácido aspártico según el procedimiento (GC-MS) descrito en el Ejemplo 2.

El café verde extraído se dispone en un horno ventilado a 50 °C durante una noche y a continuación a 101 °C hasta obtener una humedad residual del 20% en peso.

15

El extracto de agua, con un volumen igual a 600 ml, se trata con 30 µl de una preparación enzimática de asparaginasa obtenida a partir de *Aspergillus niger* (SPRIN Technologies, Cod. SBNAN) durante 30 minutos a 37 °C en un agitador dotado de termostato.

El extracto de agua tratado enzimáticamente se somete a la determinación cuantitativa de asparagina y de ácido aspártico según el procedimiento (GC-MS) descrito en el Ejemplo 2.

20

Después de la determinación cuantitativa, el extracto de agua se concentra en vacío mediante un evaporador giratorio a una temperatura de 50 °C hasta obtener un volumen igual a aproximadamente 100 ml.

El café verde extraído secado parcialmente se sumerge en el extracto de agua tratado enzimáticamente y concentrado, permitiendo que el extracto empape los granos durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.

25

De este modo, el café verde empapado (es decir, el café verde reincorporado) se seca casi totalmente en vacío y mediante el evaporador giratorio, a una temperatura de 50 °C. El secado se completa tratando el café verde en un sistema de lecho fluido para obtener 118 g de producto seco.

Se tuestan 100 g de dicho producto seco y 100 g de café verde sin tratar en un tostador de laboratorio para obtener el mismo grado de tueste con una pérdida de peso total igual al 16%.

30

El café tostado tratado y el café tostado sin tratar se someten a análisis para verificar la concentración de acrilamida.

Para cada café tostado (tratado; sin tratar), 1 g de café en polvo (café tostado molido) se somete a extracción usando un kit "QuEChERS" (Agilent Technologies, Estados Unidos), basándose en un método de extracción conocido (Mastovska K. & Lehotay S.J. "Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, 2006, págs. 7001-7008). El extracto correspondiente se somete a LC-ESI-MS-MS usando una columna "Kinetex 2.6u XB-C18 100A" para cromatografía líquida (Phenomenex Inc. USA).

35

Los resultados analíticos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla D (en la que "a.u." significa "unidad arbitraria"):

Tabla D

Muestra	Asparagina (µg/g)	Ácido aspártico (µg/g)	Área máxima acrilamida (a.u)	Reducción acrilamida (%)
Sin tratar (1 ^{er} análisis)	410	765	0,337	0
Tratada (1 ^{er} análisis)	<5	1300	0,124	63,2
Sin tratar (2 ^o análisis)	410	765	0,310	0
Tratada (2 ^o análisis)	<5	1300	0,054	82,5

40

Los resultados de la Tabla D muestran que, eliminando enzimáticamente un precursor de la acrilamida (asparagina) de un extracto de agua de café verde y reincorporando posteriormente el extracto de agua tratado enzimáticamente en el mismo café verde, es posible obtener a partir de este último un café tostado cuyo contenido de acrilamida se

ha reducido significativamente.

En los siguientes Ejemplos 6, 7, 8 se describen procedimientos para la reducción del contenido de acrilamida en un café tostado en los que, a diferencia del procedimiento descrito en el Ejemplo 5, se lleva a cabo el tratamiento enzimático doble según la invención, cuyo objetivo es eliminar dos precursores distintos de acrilamida (asparagina; ácido aspártico).

Ejemplo 6 - Procedimiento de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado

Se disponen 120 g de granos de café verde (*Coffea arabica*; origen: Brasil) en contacto con 720 ml de agua en un recipiente de tres cuellos recubierto. El recipiente se mantiene a una temperatura de 80 °C mediante un termostato, así como en agitación constante mediante un agitador magnético. La extracción se lleva a cabo durante 5 horas, mientras que el vapor formado se condensa por reflujo en el recipiente.

Después de las 5 horas, el extracto de agua se recupera y se filtra en un colador.

El café verde extraído se dispone en un horno ventilado a 101 °C durante 10 minutos y se seca a continuación con un secador de corriente de aire caliente hasta obtener una humedad residual del 20% en peso (en la práctica, se obtienen nuevamente aproximadamente 120 g).

El extracto de agua, con un volumen igual a 600 ml, se trata con 30 µl de una preparación enzimática de asparaginasa obtenida a partir de *Aspergillus niger* (SPRIN Technologies, Cod. SBNAN) + 1 mL de preparación enzimática de aspartasa (SPRIN Technologies, Cod. SBANN, disuelta con una concentración de 0,1 mg/ µl en una solución tampón con pH 7) durante 2 h a 37 °C en un agitador dotado de termostato.

El extracto de agua se concentra en vacío mediante un evaporador giratorio a una temperatura de 65 °C hasta obtener un volumen de aproximadamente 100 ml.

El café verde extraído secado parcialmente se sumerge en el extracto de agua tratado enzimáticamente y concentrado, permitiendo que el extracto empape los granos durante aproximadamente 2 h a una temperatura comprendida entre 65 °C y 75 °C.

De este modo, el café verde empapado (el café verde reincorporado) se seca casi totalmente en vacío y mediante el evaporador giratorio, a una temperatura de 65 - 75 °C. El secado se completa tratando el café verde en un sistema de lecho fluido para obtener 113 g de producto seco.

Se tuestan 100 g de dicho producto seco y 100 g de café verde sin tratar en un tostador de laboratorio para obtener el mismo grado de tueste.

El café tostado tratado y el café tostado sin tratar se someten a análisis para verificar la concentración de acrilamida.

Para cada café tostado (tratado; sin tratar), 2 g de café en polvo (café tostado molido) se someten a extracción y purificación a través de un procedimiento SPE, basándose en un método de extracción conocido (Wenzl T., Szilagy S., Rosen J. and Karasek L. "Validation of an analytical method to determine the content of acrylamide in roasted coffee", JRC Scientific and Technical reports, EUR 23403 - 2008, Annex 3). El extracto correspondiente se somete a LC-ESI-MS-MS usando una columna "Hypercarb 5u 100 x 2,1 mm" para cromatografía líquida (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Para cada muestra (tratada; sin tratar) se llevan a cabo tres análisis (Prueba 1; Prueba 2; Prueba 3) en LC-ESI-MS-MS. Los resultados analíticos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla E:

Tabla E

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Valor promedio	
	Acrilamida (ng/g)	Acrilamida (ng/g)	Acrilamida (ng/g)	Acrilamida (ng/g)	Reducción acrilamida (%)
Muestra sin tratar	346	418	405	390	0
Muestra tratada	71	61	59	64	84

Ejemplo 7 – Procedimiento de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado

Se disponen 1000 g de granos de café verde (*Coffea arabica*; origen: Brasil) en contacto con 5 litros de agua en un recipiente de tres cuellos recubierto. El recipiente se mantiene a una temperatura de 80 °C mediante un termostato, así como en agitación constante mediante un agitador mecánico. La extracción se lleva a cabo durante 5 horas,

mientras que el vapor formado se condensa por reflujo en el recipiente.

Después de las 5 horas, el extracto de agua se recupera y se filtra para eliminar las películas.

El café verde extraído se dispone en un sistema de lecho fluido a 85 °C durante 1 h hasta obtener una humedad residual de aproximadamente el 20% en peso (en la práctica, se obtienen nuevamente aproximadamente 1000 g).

5 El extracto de agua, con un volumen igual a 4 litros, se trata con 200 µl de una preparación enzimática de asparaginasa obtenida a partir de *Aspergillus oryzae* (SPRIN Technologies, Cod. SBNAO) + 3,3 ml de una preparación enzimática de aspartasa (SPRIN Technologies, Cod. SBANN, disuelta con una concentración de 0,2 mg/ µl en una solución tampón con pH 7) durante 2 h a 40 °C en un agitador dotado de termostato.

10 El extracto de agua se concentra en vacío mediante un evaporador giratorio a una temperatura de 85 °C hasta obtener un volumen igual a aproximadamente 670 ml.

El café verde extraído secado parcialmente se sumerge en el extracto de agua tratado enzimáticamente y concentrado, permitiendo que el extracto empape los granos durante aproximadamente 1 h a una temperatura de 80 °C.

15 De este modo, el café verde empapado (el café verde reincorporado) se seca casi totalmente en vacío y mediante el evaporador giratorio, a una temperatura de 80 °C. El secado se completa tratando el café verde en un sistema de tipo de lecho fluido para obtener 917 g de producto seco.

Se tuestan 100 g de dicho producto seco y 100 g de café verde sin tratar en un tostador de laboratorio para obtener el mismo grado de tueste.

20 El café tostado tratado y el café tostado sin tratar se someten a análisis para determinar la concentración de acrilamida, usando el método del Ejemplo 6. Para cada muestra (tratada; sin tratar) se llevan a cabo dos análisis (Prueba 1; Prueba 2) en LC-ESI-MS-MS.

Los resultados analíticos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla F:

Tabla F

	Prueba 1	Prueba 2	Valor promedio	
	Acrilamida (ng/g)	Acrilamida (ng/g)	Acrilamida (ng/g)	Reducción de acrilamida (%)
Muestra sin tratar	318	315	316,5	0
Muestra tratada	102	96	99	69

25 **Ejemplo 8 - Procedimiento de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado**

Se disponen 400 g de granos de café verde (*Coffea arabica*; origen: Brasil) en contacto con 1,2 litros de agua en un recipiente de tres cuellos recubierto. El recipiente se mantiene a una temperatura de 85 - 87 °C mediante un termostato, así como en agitación constante mediante un agitador mecánico. La extracción se lleva a cabo durante 5 horas, mientras que el vapor formado se condensa por reflujo en el recipiente.

30 Después de las 5 horas, el extracto de agua se recupera y se filtra para eliminar las películas.

El café verde extraído se dispone en un sistema de lecho fluido a aproximadamente 85 °C durante 1 h hasta obtener una humedad residual del 20% en peso (en la práctica, se obtienen nuevamente aproximadamente 400 g).

35 El extracto de agua, con un volumen igual a 0,85 litros, se trata con 60 µl de una preparación enzimática de asparaginasa obtenida a partir de *Aspergillus oryzae* (SPRIN Technologies, Código SBNAO, 3,5 U/µl) + 1 ml de una preparación enzimática de aspartasa (SPRIN Technologies, Cod. SBANN, disuelta con una concentración de 0,2 mg/ µL en una solución tampón con pH 7) durante 14 h a 30 -35 °C en un agitador dotado de termostato.

El extracto de agua se concentra en vacío mediante un evaporador giratorio a una temperatura de 80 °C hasta obtener un volumen de aproximadamente 200 ml.

40 El café verde extraído secado parcialmente se sumerge en el extracto de agua tratado enzimáticamente y concentrado, permitiendo que el extracto empape los granos durante aproximadamente 1 h a una temperatura de 80 °C.

De este modo, el café verde empapado (el café verde reincorporado) se seca casi totalmente en vacío y mediante el evaporador giratorio, a una temperatura de 80 °C. El secado se completa tratando el café verde en un sistema de

lecho fluido para obtener 375 g de producto seco.

Se tuestan 100 g de dicho producto seco y 100 g de café verde sin tratar en un tostador de laboratorio para obtener el mismo grado de tueste.

- 5 El café tostado tratado y el café tostado sin tratar se someten a análisis para verificar la concentración de acrilamida, usando el método del Ejemplo 6. Para cada muestra (tratada; sin tratar) se lleva a cabo un único análisis en LC-ESI-MS-MS.

Los resultados analíticos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla G:

Tabla G

	Acrilamida (ng/g)	Reducción acrilamida (%)
Muestra sin tratar	253	0
Muestra tratada	110	56,5

- 10 Los resultados de las Tablas E, F, G de los Ejemplos 6, 7, 8 muestran que, eliminando enzimáticamente dos precursores distintos de la acrilamida (asparagina; ácido aspártico) de un extracto de agua de café verde y reincorporando posteriormente el extracto de agua tratado enzimáticamente en el mismo café verde, es posible obtener a partir de este último un café tostado cuyo contenido de acrilamida se ha reducido significativamente.
- 15 De forma específica, comparando los resultados experimentales del Ejemplo 6 con los resultados experimentales del Ejemplo 5, es destacable la posibilidad de obtener un porcentaje máximo de reducción del contenido de acrilamida que es más grande que el que es posible obtener eliminando enzimáticamente solamente la asparagina (84%, en comparación con el 82,5%).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de reducción del contenido de acrilamida en un café tostado, que comprende reducir el contenido de asparagina y reducir el contenido de ácido aspártico en un café no tostado, obteniéndose dicho café tostado a partir de dicho café no tostado después de dicha reducción del contenido de asparagina y de dicha reducción del contenido de ácido aspártico.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha reducción del contenido de asparagina comprende degradar dicha asparagina enzimáticamente.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha reducción del contenido de ácido aspártico comprende degradar dicho ácido aspártico enzimáticamente.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende someter dicho café no tostado a una extracción en agua, a efectos de obtener un extracto de agua y un café no tostado extraído, y separar dicho extracto de agua de dicho café no tostado extraído.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha extracción en agua se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 50 °C y 90 °C.
- 15 6. Método según la reivindicación 4 o 5, en el que dicha extracción en agua se lleva a cabo durante un tiempo comprendido entre 3 h y 12 h.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en combinación con la reivindicación 2, en el que dicha degradación de dicha asparagina enzimáticamente comprende tratar dicho extracto de agua con una preparación enzimática que comprende una asparaginasa.
- 20 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en combinación con la reivindicación 3, en el que dicha degradación de dicho ácido aspártico enzimáticamente comprende tratar dicho extracto de agua con una preparación enzimática que comprende una aspartasa.
9. Método según la reivindicación 7 o 8, en el que dicho tratamiento de dicho extracto de agua comprende dejar actuar dicha preparación enzimática a una temperatura comprendida entre 25 °C y 60 °C.
- 25 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicho tratamiento de dicho extracto de agua comprende dejar actuar dicha preparación enzimática un tiempo comprendido entre 10 minutos y 120 minutos.
- 30 11. Método según la reivindicación 7 o según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en combinación con la reivindicación 7, en el que dicho tratamiento de dicho extracto de agua comprende usar una fuente de actividad de asparaginasa seleccionada de un grupo que consiste en: enzimas en solución, enzimas inmovilizadas, lisados bacterianos no purificados, bacterias inmovilizadas.
12. Método según la reivindicación 8 o según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en combinación con la reivindicación 8, en el que dicho tratamiento de dicho extracto de agua comprende usar una fuente de actividad de aspartasa seleccionada de un grupo que consiste en: enzimas en solución, enzimas inmovilizadas, lisados bacterianos no purificados, bacterias inmovilizadas.
- 35 13. Método según la reivindicación 4 o según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en combinación con la reivindicación 4, que comprende descafeinar dicho extracto de agua.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, que comprende concentrar dicho extracto de agua después de dicho tratamiento, a efectos de obtener un extracto de agua concentrado.
- 40 15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha concentración se lleva a cabo en vacío y a una temperatura comprendida entre 40 °C y 85 °C.
16. Método según la reivindicación 14 o 15, en el que dicha concentración se obtiene a través de un procedimiento seleccionado de un grupo que consiste en: evaporación a presión atmosférica, pervaporación, concentración por congelación, ósmosis inversa y nanofiltración.
- 45 17. Método según la reivindicación 4 o según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, en combinación con la reivindicación 4, que comprende secar dicho café no tostado extraído.
18. Método según la reivindicación 17, en el que dicho secado continúa hasta que se obtiene un café no tostado extraído secado con una humedad comprendida entre el 10% en peso y el 30% en peso.
- 50 19. Método según la reivindicación 18, en combinación con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 17, que comprende reincorporar dicho extracto de agua concentrado en dicho café no tostado extraído secado, en el que dicha reincorporación comprende permitir que dicho extracto de agua concentrado empape dicho café no tostado

extraído secado hasta obtener un café no tostado reincorporado húmedo.

20. Método según la reivindicación 19, que comprende secar dicho café no tostado reincorporado húmedo hasta obtener un café no tostado reincorporado seco que tiene una humedad residual comprendida entre el 8% en peso y el 12,5% en peso.

5 21. Método según la reivindicación 20, que comprende tostar dicho café no tostado.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho café no tostado comprende granos de café no tostados.