

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 455**

51 Int. Cl.:

A61K 36/899 (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01)
A23K 20/111 (2006.01)
A23L 7/10 (2006.01)
A23L 7/25 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
C12C 1/047 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2010 PCT/CA2010/000458**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10108277**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010 E 10755367 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2411527**

54 Título: **Procedimiento para aumentar la concentración de avenantramidas en la avena**

30 Prioridad:

27.03.2009 US 163975 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2019

73 Titular/es:

**HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA, AS REPRESENTED BY THE MINISTER OF AGRICULTURE AND AGRI-FOOD (100.0%)
Saskatchewan Research Centre 107 Science Place
Saskatoon, Saskatchewan S7N 0X2, CA**

72 Inventor/es:

**COLLINS, FRANK, WILLIAM y
BURROWS, VERNON, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 700 455 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

Procedimiento para aumentar la concentración de avenantramidas en la avena

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a avenantramidas, y más específicamente, a un procedimiento para aumentar la concentración de avenantramidas en la avena.

10 **[0002]** La avena es única entre los cereales en su capacidad para sintetizar y almacenar varios grupos de fitoquímicos bioactivos que incluyen avenantramidas, avenacosilatos, saponinas triterpénicas (avenacósidos) y saponinas esteroideas (avenacinas).

15 **[0003]** Las avenantramidas son un grupo de aproximadamente 30 alcaloides de ácido N-arilntranílico distintos de la fórmula general representada en la FIG. 1.

[0004] Las avenantramidas son antioxidantes y se ha demostrado que están disponibles en humanos y otros animales y tienen un efecto sobre la salud cardiovascular *in vivo*.

20 **[0005]** Mediante mezclas purificadas de avenantramida, se ha demostrado que las avenantramidas están biodisponibles en hámsteres y humanos, y actúan de manera sinérgica con la vitamina C para mejorar la oxidación de la resistencia al colesterol LDL. En otro estudio, se determinó la farmacocinética de la absorción de avenantramida en adultos sanos. En un ensayo aleatorizado, controlado con placebo, cruzado de tres vías con
25 avenantramidas purificadas, a dos niveles de dosis orales, aproximadamente 60 y 120 mg, las avenantramidas fueron biodisponibles y mejoraron el sistema de defensa oxidativa de los humanos, de una manera dependiente de la dosis, según lo medido por niveles de glutatión en plasma. Se puede concluir que, para la bioactividad observada, los niveles de umbral de avenantramidas, aproximadamente 30 a 60 mg de un sistema de suministro de fuente dietética, como una porción de 50 g de salvado de avena, requerirían un producto de avena con aproximadamente
30 600 a 1200 partes por millones (ppm) de avenantramidas totales. Esta es una concentración sustancialmente más alta que las registradas actualmente para las variedades de avena existentes o los productos de avena existentes.

[0006] Es bien sabido que la harina de avena, generalmente formulada en suspensiones coloidales, se ha utilizado tópicamente durante cientos de años para afecciones de la piel como eczema, hiedra venenosa, picaduras de insectos, quemaduras solares y culebrilla, donde se sabe que la inflamación es la principal culpable. La
35 avenantramida a aproximadamente 10 ppm constituye ahora el ingrediente activo principal en una serie de productos para los mercados de cuidado personal y de mascotas en todo el mundo debido a sus actividades tópicas antiirritantes, antiprurito y antiinflamatorias.

[0007] Las avenantramidas también han mostrado propiedades preventivas contra el cáncer *in vitro*.
40 Recientemente se ha demostrado *in vitro* que la avenantramida C (Fig. 1; $n = 1$, $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$.) a aproximadamente 40 ppm inhibe la proliferación de células musculares lisas y la producción de óxido nítrico tanto en ratas como en cultivos de la pared del vaso de la aorta embrionaria humana. En concentraciones de 4 a 20 ppm en este sistema *in vitro*, una mezcla de avenantramida purificada a partir de salvado de VAO-6 redujo significativamente la "adherencia" de estas células al colesterol LDL oxidado e inhibió la formación de moléculas de señalización
45 proinflamatoria que promueven la proliferación de placa arterial a base de colesterol. Además, recientemente se ha descubierto que las avenantramida de avena purificadas, la avenantramida C, en particular, tienen actividad antiinflamatoria y antiproliferativa contra líneas celulares de cáncer de colon cuando se tratan a un nivel aproximado de 20 a 50 ppm, pero no tienen efecto en líneas celulares normales.

50 **[0008]** Las avenantramidas también son potentes antioxidantes *in vitro*. Se ha demostrado que las avenantramidas son inhibidores de ciertas etapas patógenas de la aterosclerosis (enfermedad cardiovascular), la principal causa de morbilidad y mortalidad en la sociedad occidental. Usando cultivos de células epiteliales de aorta humana, tanto las mezclas de avenantramidas individuales como las de avenantramidas purificadas extraídas de salvado de avena mostraron bioactividad antiaterogénica y antiinflamatoria. Más recientemente, el mecanismo de la
55 acción antiinflamatoria de las avenantramidas en cultivos de células monocapa aórticas humanas se ha atribuido a su inhibición de la activación del factor nuclear κB mediante la inhibición de la fosforilación de las proteínas I κ B quinasa e I κ B, factores clave en el inicio, la progresión y la complicación de la aterogénesis.

[0009] Las avenantramidas están presentes en las variedades actuales de avena en concentraciones
60 demasiado bajas para obtener estos beneficios. De la evidencia clínica que involucra a sujetos humanos, los niveles

mínimos efectivos de dosis únicas deberían estar en el rango de 1000 a 3000 ppm de antioxidante.

[0010] Sin embargo, las variedades de avena cubiertas de Norteamérica y Escandinavia generalmente contienen de aproximadamente 4 ppm a aproximadamente 150 ppm de avenantramidas totales y estos niveles pueden variar ampliamente según el genotipo, el ambiente, el año de cosecha y la ubicación. Independientemente de las interacciones genotipo/ambiente, el contenido de avenantramida de las capas externas del grano es siempre más alto que el del endospermo con almidón, lo que indica que las avenantramidas se localizan principalmente en la fracción de salvado. Los esfuerzos de cultivo de la técnica anterior muestran que los niveles pueden aumentarse hasta aproximadamente el 130 % de los niveles iniciales en granos secos.

[0011] Los niveles de avenantramidas en núcleos enteros también pueden aumentarse mediante procesos fisiológicos y/o mecánicos. El malteado es un proceso de remojar y germinar granos de cereales para cambiar la composición del grano para una variedad de propósitos finales y se ha practicado durante milenios. Por ejemplo, el proceso de malteado conduce a la descomposición de los carbohidratos complejos, los lípidos y las proteínas, lo que hace que estas fuentes de reserva de azúcares, ácidos grasos y aminoácidos estén más disponibles nutricionalmente para el propio grano, para un mayor desarrollo de la planta embrionaria y para aquellos organismos que lo consumen.

[0012] Por ejemplo, se ha demostrado que la cantidad total de avenantramidas aumentó un 150 % durante un período de germinación de 48 horas. También se ha demostrado que las avenantramidas totales aumentan en granos de avena enteros de aproximadamente 90 ppm a aproximadamente 110 ppm, un aumento del 27 %, durante 10 horas de maceración en agua del grifo a 20 °C. El aumento en los niveles totales de avenantramida fue dependiente del tiempo y la temperatura. Con el aumento de la temperatura de maceración, los niveles aumentaron hasta en un 50 % hasta aproximadamente 75 ppm durante 10 horas de maceración. El aumento de la temperatura por encima de 20 °C, por ejemplo, a 40 °C, o la prolongación de la maceración, por ejemplo, durante 48 horas, no dio lugar a nuevos aumentos en las avenantramidas. El simple hecho de iniciar las imbibiciones de agua en los granos secos da como resultado un aumento de avenantramidas, aunque los niveles aumentan solo marginalmente y no producen una acumulación de cantidades sustanciales.

[0013] Es evidente a partir de los estudios existentes que las tecnologías actuales para aumentar las avenantramidas a través del malteado no producirán un producto malteado con niveles suficientemente altos de avenantramidas para obtener las respuestas fisiológicas deseadas descritas anteriormente. Además, dado que los procesos de malteado/germinación que producen estos aumentos también dan como resultado una plántula de avena germinada con raíces, brotes y granos de malta parcialmente agotados, especialmente con tiempos de malteado superiores a 2 días, el producto brotado tendría un uso limitado en cualquier otra aplicación de molienda/fraccionamiento en base seca debido a la presencia de raíces, coleópteros y otras modificaciones anatómicas asociadas con los granos germinados. Además, las tecnologías existentes se han desarrollado principalmente para la avena cubierta, lo que da como resultado un grano brotado con cascos aún unidos. La eliminación del descascarillado antes del malteado por medios mecánicos, como el desempañado por impacto o por aire comprimido, ampliamente utilizado en la industria, así como los procedimientos de "pulido" secundarios, es decir, la eliminación de los tricomas ubicados en el exterior del grano de avena puede comprometer la integridad del núcleo intacto resultando en núcleos dañados, lo cual no es deseable para el malteado. Además, el descascarado y el pulido del producto malteado se complican por los cambios en la suavidad y densidad del material malteado.

[0014] Los brotes de avena germinados que consisten en raíces, brotes y granos malteados parcialmente agotados también son difíciles de moler en productos tradicionales de avena como hojuelas de avena enrolladas, salvado de avena o harina de avena, adecuados para incorporarse en alimentos directamente consumibles o para la incorporación en alimentos horneados como un ingrediente.

[0015] Además, dadas las fuertes interacciones genotipo/ambiente ya observadas, la posibilidad de producir una avena con alto contenido de avenantramida mediante técnicas de reproducción clásicas representa una solución a largo plazo que podría tardar muchos años en alcanzarse.

[0016] Por lo tanto, existe la necesidad de un aumento sustancial de la concentración de avenantramidas en los granos de avena para que se puedan realizar los posibles efectos beneficiosos de las avenantramidas, como en la mejora de la salud cardiovascular.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0017] La invención se define por las reivindicaciones.

- [0018] Cuando la avena está activa, se induce la dormición.
- [0019] Preferiblemente, la avena está empapada anaeróbicamente para inducir o aumentar la dormición.
- 5 [0020] La avena se calienta en base seca antes del falso malteado para inducir la dormición.
- [0021] La avena se calienta en base seca a una temperatura de 30 a 40 °C durante 48 a 72 horas, seguido de un calentamiento adicional en base seca a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 144 a 168 horas.
- 10 [0022] Preferiblemente, la avena se remoja anaeróbicamente empapando la avena en agua a una temperatura de 4 a 40 °C durante 12 a 18 horas.
- [0023] Preferiblemente, la avena está empapada anaeróbicamente en agua que incluye ion calcio.
- 15 [0024] La avena se incuba a una temperatura de 4 a 40 °C durante 96 a 120 horas con el propósito de falsos malteados.
- [0025] Preferiblemente, la avena es avena inactiva, sin cáscara.
- 20 [0026] Preferiblemente, el aumento de la concentración de avenantramida en la avena es mayor que 750 ppm en base seca.
- [0027] Preferiblemente, la avena se pela cuando la avena está cubierta y es avena inactiva.
- 25 [0028] Preferiblemente, la avena se seca hasta un contenido de humedad final de aproximadamente 3 a 10 % en base seca.
- [0029] Preferiblemente, la avena está empapada anaeróbicamente hasta aproximadamente un 35 % de contenido de humedad.
- 30 [0030] Preferiblemente, un componente de salvado exterior y una cebada mondada desalvada residual se recuperan utilizando un molino de abrasión.
- 35 [0031] Preferiblemente, el componente de salvado desgastado comprende de 3 a 30 % del peso inicial de la avena antes de la molienda por abrasión.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

- 40 [0032] Estas y otras características de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:
- FIG. 1 muestra una fórmula de estructura general de avenantramidas;
- 45 FIG. 2 ilustra las estructuras de las avenantramidas individuales;
- FIG. 3 ilustra un perfil típico de HPLC de las fracciones de avenantramida;
- FIG. 4 muestra los pasos de un procedimiento ejemplar para aumentar la concentración de avenantramidas;
- 50 FIG. 5 muestra el efecto de la temperatura sobre la concentración total de avenantramidas en avenas sin cáscara, sin casco, maceradas anaeróbicamente y tratadas con calor,
- FIG. 6 muestra el curso temporal de la acumulación de avenantramida en las avenas activas durante el malteado falso a 37 °C;
- 55 FIG. 7 ilustra la distribución del total de avenantramida en el núcleo sin maltear según lo determinado por la molienda en base seca de Satake;
- 60 FIG. 8 ilustra la distribución de la avenantramida total en el grano en un cultivo (VAO-48) después del malteado falso

de acuerdo con lo determinado por la molienda en base seca de Satake; y

FIG. 9 ilustra la distribución de avenantramida total en el grano en otro cultivar (VAO-22) después del malteado falso de acuerdo con lo determinado en la molienda en base seca de Satake.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS

[0033] Ahora se hará referencia en detalle a algunas realizaciones específicas de la invención que incluyen los mejores modos contemplados por los inventores para llevar a cabo la invención. Ejemplos de estas realizaciones específicas se ilustran en los dibujos adjuntos. Aunque la invención se describe junto con estas realizaciones específicas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a las realizaciones descritas. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de la presente invención. La presente invención puede ponerse en práctica sin algunos o todos estos detalles específicos. En otros casos, las operaciones de proceso bien conocidas no se han descrito en detalle para no oscurecer innecesariamente la presente invención.

[0034] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

20

[0035] La presente invención se ha descrito con respecto a una o más realizaciones. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar varias variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

[0036] La avena común (*Avena sativa*) es una especie de grano de cereal. La avena tiene una variedad de usos. La avena para consumo humano se utiliza para hacer gachas, cereales de desayuno, galletas y barritas. En la agricultura, uno de los usos más comunes de la avena es la alimentación del ganado. La avena constituye una gran parte de la dieta para los caballos y también se alimenta regularmente al ganado. La avena también se utiliza en algunas marcas de alimentos para perros y pollos. La avena se cultiva desde hace dos mil años en diversas regiones del mundo. Antes de consumirse como alimento, la avena se usaba con fines medicinales, un uso por el que aún se conocen. El crecimiento de la avena en Europa fue generalizado, y la avena constituyó un importante cultivo comercial, ya que era un alimento básico para la población de muchos países, incluidos Escocia, Gran Bretaña, Alemania y los países escandinavos.

[0037] Las cáscaras, es decir, la lemma y la palea, desempeñan un papel importante durante el desarrollo de los núcleos. Las cáscaras suministran a los núcleos en desarrollo hidratos de carbono. Los aminoácidos son la principal fuente de nitrógeno para el núcleo en desarrollo, y una parte importante de estos puede ser aportada por la lemma y la palea. Además, al ser una cubierta exterior, la lemma y la palea pueden proteger a los flósculos y los granos contra ataque de patógenos e insectos.

40

[0038] La mayoría de la avena, cuando se cosecha, tiene las cáscaras unidas. También hay cultivos, por ejemplo, VAO-48, que no tienen cáscaras, es decir, las cáscaras se adhieren ligeramente al núcleo y se dejan en el campo durante la combinación y la recolección.

[0039] Los granos de avena maduros liberados de la planta madre en un estado inactivo pueden presentar dormición impuesta por la cubierta de la semilla o basada en embriones o ambos, conocida como dormición primaria.

[0040] El término "dormición" se destina a describir un estado en el que se evita que las semillas germinen temporalmente incluso en condiciones ambientales normalmente favorables para la germinación. Estas condiciones pueden ser una combinación compleja de agua, luz, temperatura, gases, restricciones mecánicas, capas de semillas y estructuras hormonales. La dormición de la semilla se ha descrito, por ejemplo, en "Genetic and Molecular Control of Seed Dormancy, B. Li and M. E. Foley, Trends in Plant Science, (1997) Vol. 2 (10), pp. 384-389".

[0041] La dormición retrasa la germinación y deja tiempo para la dispersión y previene la germinación de todas las semillas al mismo tiempo. El escalonamiento de la germinación protege a algunas semillas y plántulas de sufrir daños o la muerte por cortos períodos de mal tiempo o por herbívoros transitorios.

[0042] Después de un período de "maduración posterior" y en condiciones favorables para el medio ambiente, como la luz, la temperatura, la humedad, los granos activos experimentan una transición rápida que

60

resulta en el inicio de la germinación.

[0043] Sin embargo, los núcleos activos parcial o totalmente maduros después de la exposición a condiciones ambientales desfavorables pueden presentar un estado de inactividad inducida, conocido como "dormición secundaria".

[0044] El término "dormición secundaria" está destinado a describir un estado de semillas activas y posactivas que han sido expuestas a condiciones que no son favorables para la germinación, tales como altas temperaturas. El término "dormición" pretende incluir cualquier semilla en un estado inactivo, incluida la dormición primaria, por ejemplo, pero sin limitarse a la dormición revestida o verdadera del embrión; dormición secundaria, por ejemplo, pero sin limitarse a la dormición inducida químicamente, inducida físicamente o cualquier otra forma de dormición inducida, dormición secundaria natural; o cualquier otra forma de dormición.

[0045] Muchas plantas de jardín tienen semillas que germinarán fácilmente tan pronto como tengan agua y estén lo suficientemente calientes, aunque sus antepasados salvajes tenían dormición. Estas plantas cultivadas carecen de dormición debido a generaciones de presión selectiva por parte de los fitomejoradores y jardineros que cultivaron y mantuvieron plantas que carecían de dormición.

[0046] A la inversa, hay cultivos, por ejemplo, VAO-48 de las semillas de avena que se describen a continuación, que se han seleccionado genéticamente para tener una dormición secundaria prolongada.

[0047] Cuando la avena se trata empapando o macerando y dejando germinar, como se practica durante un proceso de malteado típico familiar para los expertos en la técnica del malteado, los niveles de avenantramidas aumentan en las plántulas brotadas, de una manera dependiente del tiempo, por encima de los niveles iniciales de avenantramida en las semillas secas. La utilidad de un malteado de corto período para mejorar los niveles de avenantramida está limitada por los aumentos modestos de avenantramida, y los periodos prolongados de malteado, por ejemplo, 4-5 días, dan como resultado un producto de grano brotado con niveles más altos de avenantramida, pero una utilidad reducida en los mercados de molienda y procesamiento convencionales.

[0048] De acuerdo con una realización de la presente invención, grandes cantidades de avenantramidas se acumulan a través de la inducción de la dormición secundaria y el malteado falso como se describe a continuación. Cuando la avena en la dormición secundaria está sujeta a un proceso de malteado, sorprendentemente, los niveles de avenantramida pueden incrementarse drásticamente hasta 25 a 35 veces, aunque no germinen.

[0049] En otras palabras, utilizar la dormición secundaria de una manera predecible para crear condiciones en las que no se produce la germinación, puede alterar el valor nutricional de los granos enteros, en comparación con los granos brotados.

[0050] Durante la maceración y la germinación de la avena inactiva durante hasta 6 días, las avenantramidas continúan produciéndose, a pesar del hecho de que no se observa ninguno de los indicadores visuales macroscópicos de la germinación, por ejemplo, emergencia radical, ramificación y elongación, expansión y alargamiento de los brotes y el coleóptilo, etc. Este tratamiento en el que se siguen los procedimientos de malteado típicos, el grano en dormición no germinará en lo llamado "falso malteado" en adelante.

[0051] El término "falso malteado" pretende describir un tratamiento similar o idéntico a las técnicas de malteado practicadas por un experto en la materia. Sin embargo, como las semillas están en dormición, por ejemplo, en dormición secundaria, las semillas sometidas a falso malteado no germinan.

[0052] El falso malteado representa una nueva técnica para alterar la composición de los granos de cereales en general y la avena en particular. La supresión de la germinación de la avena durante el malteado da como resultado un producto de avena total con un contenido elevado de avenantramida que conduce a la incorporación en numerosos mercados establecidos de alimentos, piensos y utilización industrial.

Procedimiento de análisis cuantitativo de avenantramidas.

[0053] La determinación de las composiciones cualitativas y cuantitativas de avenantramida del material de avena se realizó como se describe a continuación. Las muestras de avena, es decir, las semillas, se secaron en un horno a 37 °C a un peso constante (aproximadamente 48 horas) y se almacenaron en bolsas de plástico al vacío a -20 °C hasta su análisis. Las semillas se molieron utilizando un molino de café comercial antes de la extracción. Las extracciones y los análisis cuantitativos se realizaron generalmente utilizando dos réplicas.

Extracción

[0054] A 75 ml de etanol al 80 % acidulado a reflujo (etanol:agua:ácido acético glacial, 80:19,9:0,1 (v / v / v)), se agregaron 10 g de muestra de avena molida con agitación vigorosa junto con 5 mg de ditionito de sodio como antioxidante. La mezcla se retiró del calor y se dejó enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. El contenido completo se decantó luego en una columna de cromatografía de vidrio graduada equipada con un disco fritado. Se dejó que la suspensión se asentara por gravedad formando un lecho de extracción ligeramente empaquetado (volumen del lecho = V_b ml) con un sobrenadante transparente. El sobrenadante se recogió por flujo de gravedad y el lecho de extracción se eluyó con $3 \times V_b$ de etanol al 80 % acidificado mediante "extracción por percolación", lo que dio como resultado un eluido amarillo verdoso claro.

Purificación de avenantramidas mediante interacción hidrófoba y cromatografía de absorción aromática:

[0055] Para eliminar los componentes lipófilos de este extracto, se agregaron esferas de cromatografía Octyl Sepharose® CL 4-B (se extrajeron 0,5 ml por g) y la mezcla se concentró a sequedad al vacío a 40 °C mediante evaporación rotatoria. Con el fin de evitar la oxidación, se añadió agua destilada a la mezcla para asegurar que la avenantramida precipitase durante el secado. La mezcla seca se resuspendió en etanol acidificado al 50 % (etanol:agua:ácido acético glacial, 50:49,9:0,1 (v/v/v)) y se transfirió cuantitativamente a una columna de cromatografía de vidrio graduada que contiene Octyl Sepharose® CL 4-B, que había sido previamente envasada por gravedad y preequilibrada en etanol al 50 % acidificado (por ejemplo, para una muestra de 10 g, 25 ml, volumen del lecho final $V_b = 30$ ml). La columna se eluyó luego con $3 \times V_b$ del etanol al 50 % acidificado. El eluido combinado se concentró al vacío a 40 °C por evaporación rotatoria para dar un extracto esencialmente libre de lípidos.

[0056] Para eliminar las saponinas, glucósidos flavonoides, proteínas y péptidos solubles en alcohol, azúcares libres, aromáticos, orgánicos y aminoácidos, el extracto concentrado se disolvió en un pequeño volumen (aproximadamente 3 ml de etanol al 40 % acidificado (etanol:agua:ácido acético glacial, 40:59,9:0,1 (v/v/v)) por 10 g de muestra) y se purificó por cromatografía utilizando Sephadex® LH-20. La solución se transfirió cuantitativamente a una columna de cromatografía de vidrio graduada que contenía Sephadex® LH 20, que había sido previamente empaquetada por gravedad y preequilibrada en etanol al 40 % acidificado (por ejemplo, para una muestra de 10 g, volumen de lecho final $V_b = 25$ ml). Primero, las saponinas, azúcares libres, aminoácidos, etc. se eliminaron eluyendo con $2 \times V_b$ de etanol al 40 % acidulado. Las avenantramidas absorbidas se recuperaron eluyendo con $3 \times V_b$ de etanol al 95 % acidulado (etanol:agua:ácido acético glacial, 95:4,9:0,1 (v/v/v)). Nuevamente, se añadió agua antes de la evaporación junto con 5 mg de ditionito sódico para evitar la oxidación. El eluido se concentró a sequedad a vacío a 40 °C mediante evaporación rotatoria para dar la fracción de avenantramida purificada.

Análisis por HPLC de la fracción de avenantramida

[0057] En un primer procedimiento, la fracción de avenantramida purificada se disolvió en 5 ml de etanol al 50 % (etanol:agua, 50:50 (v/v)), se filtró a través de un filtro de 0,45 mm y se realizó en una HPLC. Las muestras (10 μ l) se inyectaron utilizando un inyector Rheodyne® en una columna de fase inversa C18 (ODS Hypersil® C₁₈, 5 mm, 4,6 mm x 250 mm) mantenidas a 25 °C mediante un enfriador de columna CERA 250 equipado con un protector C₁₈ de columna. Los análisis por HPLC se realizaron utilizando una bomba Spectra System P4000 de Thermo Separation Products (TSP) y se controlaron a 330 nm mediante un detector de barrido espectral TS3 SpectraSystem® UV3000 y el software ChromQuest. El caudal se mantuvo a 0,8 ml por minuto. Los disolventes para HPLC fueron A: metanol, B: agua y C: ácido acético al 5 %. El gradiente de solvente (% en volumen) consistió en 40A:55B:5C, aumentando linealmente a 50A:45B:5C durante 40 min, y aumentando linealmente a 80A:15B:5C en 15 min, luego alcanzando 100A en 3 min y manteniéndose durante 3 min. El gradiente de disolvente se devolvió a las condiciones originales durante 3 minutos y se dejó equilibrar durante 4 minutos. Todos los picos principales de avenantramida se identificaron mediante la comparación del tiempo de retención relativo y los espectros UV (monitorizados de 240 a 380 nm) con estándares auténticos. Todas las avenantramidas secundarias fueron identificadas por espectrometría de masas HPLC solo.

[0058] En un segundo procedimiento, el sistema de disolventes del primer procedimiento se cambió de la siguiente manera: Los disolventes para la HPLC fueron A: metanol, B: agua y C: ácido fosfórico 0,1 M. El gradiente de disolvente (% en volumen) consistió en 45A:45B:10C, aumentando linealmente a 60A:30B:10C durante 55 min, luego alcanzando 100A en 3 min y manteniéndose durante 3 min. El gradiente de disolvente se devolvió a las condiciones originales durante 3 minutos y se dejó equilibrar durante 4 minutos.

[0059] En un tercer procedimiento, se inyectaron muestras (10 μ l) en una columna de fase inversa C₁₈

(Zorbax Stable® bond C₁₈, 3,5 µm, 4,6 mm x 150 mm) mantenida a 30 °C. Los disolventes para la HPLC fueron A: metanol, B: agua y ácido fórmico C: 0,5 M. El gradiente de disolvente (% volumen) consistió en 45A:45B:10C, aumentando linealmente a 55A: 35B: 10C durante 24 min, y aumentando linealmente a 70A: 20B: 10C en 9 min, luego alcanzando 95A:5C en 3 min y manteniendo durante 3 min. El gradiente de disolvente se devolvió a las 5 condiciones originales durante 3 minutos y se dejó equilibrar durante 3 minutos.

Análisis espectrométrico de masas por HPLC de la fracción de avenantramida

[0060] Se identificaron picos menores de avenantramida mediante HPLC-MS-MS utilizando un espectrómetro de masas Thermo Finnigan LCQ Advantage® equipado con un sistema de detector de matriz de diodos UV Surveyor® HPLC (condiciones de la HPLC: columna Hypersil® ODS, 120Å, 5 µ, 250 x 4,6 mm). La monitorización por HPLC UV se realizó a 330 nm. Se utilizó el mismo sistema de disolventes que el descrito anteriormente en el primer procedimiento a un caudal de 0,8 ml por minuto. El gradiente de disolventes (% volumen) consistió en 40A:55B:5C incrementando linealmente a 60A:35B:5C durante 80 min, y aumentando linealmente a 80A:15B:5A 15 durante 5 min, luego alcanzando 100A durante 3 min y manteniéndolo durante 3 min. El gradiente de disolvente regresó a las condiciones originales durante 3 min. Se permitió el equilibrio durante 3 minutos. Condiciones MS-MS: ionización por electroaspersión (ESI, modo negativo), voltaje de fuente: 4,5 Kilovoltios, voltaje capilar: -10 voltios, temperatura capilar: 300 °C, flujo de gas de la vaina: 80 % lleno, flujo de gas auxiliar: 20 % máximo (sin división de la corriente).

20 Estimación cuantitativa de avenantramidas

[0061] Se cuantificaron las avenantramidas individuales determinando las áreas de los picos a 330 nm en relación con un estándar de avenantramida A auténtica externa y se expresaron como equivalentes en peso de la 25 avenantramida A. El total de avenantramidas se calculó sumando todas las cantidades individuales de avenantramida calculadas como equivalentes en peso de avenantramida A y expresadas como partes por millón (ppm) de equivalentes de avenantramida A en base al peso seco.

[0062] Las avenantramidas son un grupo de aproximadamente 30 alcaloides de ácido N-arilntranílico 30 distintos de la fórmula general representada en la FIG. 1. La FIG. 2 ilustra estructuras de las avenantramidas individuales que ocurren tanto en la avena malteada como en la no malteada.

[0063] La Fig. 3 ilustra un perfil típico de HPLC de las fracciones de avenantramida de la avena utilizando el 35 tercer procedimiento descrito anteriormente malteado y con la nomenclatura asignada en la FIG. 2.

[0064] La Fig. 4 muestra los pasos de un procedimiento para aumentar la concentración de avenantramidas de acuerdo con una realización de la presente invención.

[0065] Si la avena no está en dormición 402, se puede inducir una dormición secundaria 404. De lo contrario, 40 la avena está en dormición, generalmente en dormición secundaria natural o inducida.

[0066] Las semillas en dormición secundaria pueden perder la dormición con el tiempo, por lo tanto, incluso si las semillas están en dormición, se puede incluir un paso opcional para mejorar la dormición 406.

45 **[0067]** Un procedimiento no limitativo para inducir o aumentar la dormición secundaria es hidratar anaeróbicamente, o atemperar, la avena.

[0068] El malteado generalmente comienza con remojar la avena en agua hasta que la avena alcanza un 50 cierto contenido de humedad. La impregnación generalmente se intercala con la aireación de la avena, lo que permite que la avena obtenga oxígeno adicional.

[0069] La dormición de la avena se puede inducir 404 o potenciar 406 a través de macerado anaeróbico. Con el macerado anaeróbico, la avena se temple o hidrata anaeróbicamente, por ejemplo, a temperaturas superiores a 30 °C durante 12 a 18 horas.

55 **[0070]** La avena se somete luego a un falso malteado 408, es decir, en una condición similar o idéntica al malteado, pero sin germinación, por ejemplo, a 23-37 °C durante 96 a 120 horas. Después del falso malteado, la avena se seca 410, por ejemplo, a 35 °C durante 24 a 48 horas, antes de su almacenamiento o posterior procesamiento.

60

[0071] Los siguientes son ejemplos no limitativos que muestran el aumento de la concentración de avenantramidas de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1: avena inactiva vs. activa

5

[0072] Muestras de semillas de una línea de reproducción de avena con semilla, calva, sin cáscara, inactiva (VAO-48) y de una línea de reproducción de avena con semilla, calva, sin cáscara, activa (VAO-2, ahora registrada como variedad AC GEHL) recién cosechadas fueron malteadas como se describe a continuación.

10 **[0073]** Aproximadamente 20 g de cada línea de reproducción se esterilizaron brevemente en la superficie por inmersión en solución acuosa de hipoclorito de sodio al 1 % durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, luego se retiraron y se enjuagaron a fondo para eliminar el exceso de solución de hipoclorito de sodio. Las semillas se germinaron luego en placas de Petri cubiertas (150 x 15 mm) en discos de papel de filtro húmedo a temperatura ambiente y luz difusa durante 4 días. Se reservó una muestra separada de 20 g de cada línea de reproducción como control.

[0074] Después de cuatro días, se determinaron las tasas de germinación de las dos muestras. Las semillas, incluidas las germinadas y las no germinadas, se retiraron y se secaron en un secador de semillas a temperatura ambiente durante dos días. Las tasas medias de germinación fueron:

20

Inactiva, sin cáscara, calva (VAO-48) 1 %

Activa, sin cáscara, calva (VAO-22) 75 %

25 **[0075]** El contenido total de avenantramida de las dos muestras antes y después del malteado (falso) se determinó utilizando el primer procedimiento descrito anteriormente y se resume en la Tabla 1:

Tabla 1. Acumulación de avenantramida en avenas inactivas y activas				
Tipo de avena	Material	Avenantramida totales	% de aumento	Coefficiente de aumento
Inactiva	Antes del malteado	77 ppm		
	Después del malteado	534 ppm	590	6,9
Activa	Antes del malteado	54 ppm		
	Después del malteado	340 ppm	530	6,3

30 **[0076]** La tabla 1 muestra que la avena inactiva acumuló sorprendentemente avenantramidas durante el período de falso malteado.

[0077] Las semillas inactivas tienen una morfología similar a la del material de partida y, a diferencia de las semillas activas, no tenían raíces, coleópteros, ni hojas y brotes emergentes.

35 Ejemplo 2: Efecto de la maceración anaeróbica y almacenamiento de semillas inactivas en dormición

40 **[0078]** Se sabe que la avena inactiva pierde su dormición secundaria con el tiempo, según las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, nivel de oxígeno, temperatura, contenido de humedad). En particular, los niveles bajos de oxígeno prolongan la dormición y/o inhiben la germinación. También es conocido por los criadores de avena y las personas expertas en la técnica de conservación de plasma de germen de semilla que las semillas almacenadas a temperaturas bajo cero (por ejemplo, -20 °C) pueden conservar la mayoría de sus características genéticamente heredadas durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, para ser práctico en un proceso a gran escala, como el malteado, debería haber un suministro constante de avena inactiva de forma regular durante todo el año, sin depender del costoso almacenamiento en frío para mantener la semilla inactiva. Por lo tanto, es preferible prolongar y mejorar la dormición en avena inactiva, e inducir una dormición secundaria en avena activa.

50 **[0079]** Las semillas de la línea de avena inactiva utilizada en el Ejemplo 1 (VAO-48), que se habían almacenado durante 3 semanas a temperatura ambiente, luego 1 semana a -20 °C, se sumergieron durante varios tiempos hasta aproximadamente 48 horas en agua del grifo, a aproximadamente 23 °C. En un experimento a pequeña escala, las semillas se distribuyeron en placas de Petri herméticas, completamente llenas de agua y selladas con Parafilm (es decir, maceración anaeróbica). Después de aproximadamente 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas, las semillas se retiraron y se secaron brevemente al aire en un secador de semillas a temperatura ambiente. Las

semillas fueron luego esterilizadas en superficie y malteadas como antes durante cuatro días a temperatura ambiente en luz difusa. Después de cuatro días, la tasa de germinación se determinó como anteriormente.

[0080] En un experimento adicional, se usaron cantidades mayores de semilla y la maceración anaeróbica se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer hermético lleno de agua del grifo y sellado con Parafilm®. Este "estrechamiento" en la parte superior de la configuración del matraz facilitó la exclusión del aire residual y aseguró la inmersión de las semillas por debajo del nivel del agua. Los resultados de ambos experimentos se resumen en la Tabla 2.

Duración de la maceración	% de germinación en placa de Petri tras cuatro días	% de germinación en matraz Erlenmeyer tras cuatro días
0,0 horas	48,5 ± 4,5	35,5 ± 3,5
2,0 horas	30,0 ± 1,0	22,0 ± 1,0
4,0 horas	16,5 ± 2,5	10,5 ± 5,5
6,0 horas	ND	9,5 ± 6,5
8,0 horas	6,0 ± 2,0	2,5 ± 0,5
11,75 horas	3,0 ± 1,0	ND
24,0 horas	19,5 ± 9,5	ND
47,5 horas	16,5 ± 1,5	ND

10

[0081] Se encontró que, simplemente empapando o macerando las semillas durante la noche, aproximadamente de 8 a 18 horas, sin exposición al aire, la tasa de germinación disminuyó considerablemente, de aproximadamente el 50 % sin maceración a menos del 10 % después de la maceración anaeróbica. Esto indica que la germinación puede disminuirse sustancialmente mediante la maceración anaeróbica durante 8 a 18 horas.

15 Experimentos adicionales para optimizar la temperatura de maceración indicaron una temperatura de 30 ° a 32 °C durante 18 horas, lo que resultó en una tasa de germinación constante de menos de 3 % de germinación (es decir, >97 % de dormición).

[0082] Para probar la retención de los atributos de dormición de la línea de avena inactiva después de varios períodos de almacenamiento, se realizaron experimentos de germinación utilizando muestras almacenadas a temperatura ambiente durante varios períodos de tiempo de hasta 14 semanas. Además, las muestras duplicadas se sometieron adicionalmente a una maceración anaeróbica durante la noche, se secaron al aire brevemente y luego se analizaron para determinar la germinación en condiciones similares. En ambos experimentos de curso de tiempo, las semillas germinaron en placas de Petri a temperatura ambiente y luz difusa durante cuatro días y se calcularon las tasas de germinación. Los resultados de ambos experimentos se muestran en la Tabla 3.

Semanas almacenadas a 23 °C	% germinación sin maceración	% germinación con maceración anaeróbica a 32 °C
0	35,0 ± 2,6	6,7 ± 2,1
2	1,0 ± 1,0	2,3 ± 2,3
4	2,7 ± 0,6	3,7 ± 0,6
6	ND	ND
8	9,0 ± 2,0	2,0 ± 1,0
10	29,0 ± 3,6	7,0 ± 3,6
14	89,7 ± 1,5	30,3 ± 4,0

[0083] La dormición, de la línea de avena inactiva aumenta durante las primeras 8 a 10 semanas de almacenamiento y luego disminuye drásticamente de tal manera que alrededor del 90 % de las semillas germinan. Como era de esperar, la avena macerada anaeróbicamente durante 16 horas mostró una mayor dormición después de un almacenamiento de 8 semanas o más a temperatura ambiente que las muestras no maceradas correspondientes. De esta manera, la dormición de la avena que pierde gradualmente la dormición en el almacenamiento a temperatura ambiente puede mejorarse y, por lo tanto, ser más adecuada para este proceso.

35 Ejemplo 3: Efectos del pretratamiento con calor y la maceración anaeróbica en la dormición y la acumulación de avenantramida 5 en avena sin cáscara y activa.

[0084] Hay otros procedimientos para mejorar e inducir una dormición secundaria. Un procedimiento ejemplar no limitativo para aumentar e inducir la dormición de la avena es tratar la avena con calor seco de 30 a 70 °C durante varios períodos de tiempo de hasta 2 semanas. Este procedimiento generalmente se lleva a cabo en 2 fases: la primera fase involucra temperaturas de aproximadamente 10 a 30 °C durante varios días para reducir el contenido de humedad de la semilla a aproximadamente un 3 %, seguido de una segunda fase a aproximadamente 70 °C durante hasta una semana. También se ha demostrado que tal tratamiento es eficaz para reducir el moho transmitido por las semillas y las esporas bacterianas. Bajo este régimen, las semillas no se dañan y, en algunos casos, la tasa de germinación, de hecho, aumenta.

[0085] Las semillas (500 g) de la línea de avena sin cáscara activa (VAO-2) se trataron con calor en un horno de secado por convección a 37 °C durante 72 horas y luego a 70 °C durante 144 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la semilla tratada térmicamente se dividió en submuestras, un grupo (5 réplicas) se maceró anaeróbicamente durante 18 horas a 32 °C, el otro grupo no se maceró anaeróbicamente (5 réplicas). Ambos grupos se esterilizaron en la superficie como antes, luego se maltearon en placas de Petri (150 x 50 mm) en luz difusa a temperatura ambiente durante cuatro días. Después del malteado, las 20 semillas se evaluaron para determinar la tasa de germinación (% germinado) y el contenido de avenantramida usando el primer procedimiento descrito anteriormente (μg equivalentes de avenantramida A / g en peso seco = ppm de avenantramida A). Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tratamiento	% germinación (\pm DE)	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)			
		Avenantramida A (ppm)	Avenantramida B (ppm)	Avenantramida C (ppm)	Avenantramida total (ppm)
Sin calor, sin maceración	35,0 \pm 2,6	ND	ND	ND	77
Calor, pero sin maceración	14,9 \pm 4,2	34,2	42,7	24,9	272,4
Calor y maceración	0,4 \pm 0,	42,3	64,0	40,7	445,1

[0086] Como se describió anteriormente, tanto el calentamiento en base seca de la avena bajo el tratamiento de calentamiento de dos fases, como la maceración anaeróbica durante 18 horas redujeron por separado la germinación de la avena durante el malteado (es decir, el aumento de la dormición). Cuando se usó en concreto, tratamiento térmico seguido de maceración anaeróbica, la tasa de germinación se redujo a prácticamente el 0 % y las semillas permanecieron activas durante todo el período de malteado de cuatro días. Además, el contenido total de avenantramida de los cuatro días de avena "malteada falsa" de los tratamientos combinados de calor y maceración anaeróbica aumentó de 77 ppm al inicio, a 445 ppm después del malteado, lo que representa un aumento de aproximadamente el 480 % (5,8 veces) por encima de los valores iniciales.

[0087] Se observa que el proceso de calentamiento en base seca de dos fases para inducir la dormición no dio lugar a una pérdida de viabilidad. Cuando la avena tratada con calor se incubó en presencia de 100 ppm de giberelina (por ejemplo, GA3) durante 5 días, se observó una restauración casi completa de la germinación.

35 Ejemplo 4: Efectos de la temperatura en la acumulación de avenantramida durante el falso malteado

[0088] En el malteado tradicional, las temperaturas óptimas se eligen para maximizar la germinación y la hidrólisis concurrente de las reservas de almidón de la semilla a azúcares libres para la fermentación posterior. Para estos fines, las temperaturas óptimas suelen estar por debajo de unos 25 °C. Para estudiar el efecto de la temperatura en la acumulación de avenantramidas, se llevó a cabo un falso malteado a cuatro temperaturas diferentes en la oscuridad durante cuatro días. Para comparar, también se realizó un falso malteado en luz difusa a temperatura ambiente. Para estos estudios, se usó una variedad de avena sin cáscara, activa, que se había vuelto inactiva por pretratamiento con calor y remojo anaeróbico.

45 **[0089]** Las cuatro temperaturas para el proceso fueron 3 °C, 23 °C (temperatura ambiente), 30 °C y 37 °C y el falso malteado se llevó a cabo en la oscuridad con una muestra de comparación malteada a 23 °C en luz difusa. El malteado a 3 °C se llevó a cabo en un refrigerador de laboratorio, y el malteado a 30 °C y 37 °C se llevó a cabo en

un horno de convección a temperatura controlada.

[0090] Se utilizaron 50 g de muestra de avena sin cáscara AC Baton (AC Baton, velocidad de germinación > 95 %). Las semillas se trataron térmicamente de la siguiente manera: 72 horas a 37 °C seguidas de 144 horas a 70 °C como en el Ejemplo 3 anterior, se enfriaron brevemente a temperatura ambiente (23 °C) y luego se maceraron anaerómicamente en agua corriente a 32 °C durante 18 Horas y secado al aire en un secador de semillas durante unas cuatro horas. Las semillas se esterilizaron en la superficie como anteriormente solo con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,25 % a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se dividieron en cuatro submuestras y se sometieron a falso malteado a las cuatro temperaturas distintas en la oscuridad durante 96 horas, utilizando la temperatura controlada mediante el horno de convección del ejemplo 3.

[0091] Después del malteado, las semillas se evaluaron para determinar la tasa de germinación (% germinado), se secaron al aire en un secador de semillas a temperatura ambiente durante la noche, y el contenido de avenantramida se determinó mediante el primer procedimiento descrito anteriormente (μg equivalentes de avenantramida A / g en peso seco = ppm avenantramida A). El contenido de las tres avenantramidas principales (avenantramidas A, B y C), todas las demás avenantramidas y el total de avenantramidas se calcularon y compararon con los niveles correspondientes en el material sin maltear. Los resultados se resumen en la Tabla 5:

Tabla 5.Efectos de la temperatura durante un macerado falso de cuatro días de una avena activa (AC Baton) sobre la acumulación de avenantramida						
Tratamiento	% germinación (\pm DE)	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
		Avenantramida A (ppm \pm DE)	Avenantramida B (ppm \pm DE)	Avenantramida C (ppm \pm DE)	El resto (ppm \pm DE)	Avenantramida total (ppm \pm DE)
Control	96,0 \pm 2*	(28,0 \pm 0,6)*	(29,4 \pm 0,3)*	(16,1 \pm 4,5)*	(40,6 \pm 3,1)*	(114,1 \pm 8,5)*
4 días a 3 °C en oscuridad	0,0 \pm 0,0	31,1 \pm 0,2	38,2 \pm 0,2	22,4 \pm 0,5	50,6 \pm 3,2	142,2 \pm 4,1
4 días a 23 °C en oscuridad	3,1 \pm 1,3	71,4 \pm 4,7	88,0 \pm 7,7	65,3 \pm 4,7	90,9 \pm 21,6	615,6 \pm 38,7
4 días a 30 °C en oscuridad	ND	106,3 \pm 0,7	178,1 \pm 1,9	150,2 \pm 6,5	751,7 \pm 42,7	1 186,3 \pm 51,7
4 días a 37 °C en oscuridad	0,0 \pm 0,0	276,4	251,6	234,3	1.235,3	1.997,6

*Los valores del % de germinación representan una tasa de germinación de 4 días. Los valores de avenantramidas en las celdas representan los valores antes del malteado.

[0092] Desde un punto de vista comparativo, la Tabla 5 muestra que los niveles acumulados de avenantramida A, B, C y todas las demás avenantramidas aumentaron durante el falso malteado al aumentar la temperatura del malteado. La temperatura más baja utilizada (3 °C) produjo un aumento de 114 ppm en el material no malteado a alrededor de 142 ppm después del malteado (aproximadamente el 25 % o 1,25 veces), mientras que la temperatura más alta (37 °C) produjo niveles totales de avenantramida de casi 2,000 ppm (alrededor del 1650 % o 17,5 veces). Bajo el régimen de tratamiento previo utilizado aquí, tanto las temperaturas altas como las bajas disminuyeron ligeramente la germinación.

[0093] El efecto de la temperatura en el total de avenantramidas acumuladas durante 96 horas de falso malteado usando avena AC Baton sin cáscara activa (>95 % de semillas viables) que se hizo inactiva por el calentamiento y el procedimiento de maceración anaeróbica se muestra en la FIG. 5. Los aumentos drásticos sobre el control (es decir, sin maltear) de las semillas exhibidas simplemente por el malteado a temperaturas superiores a las utilizadas en la técnica del malteado más practicada (generalmente de 10 a 25 °C) se pueden ver fácilmente.

Ejemplo 5: Efectos del tiempo en la acumulación de avenantramida durante el falso malteado

[0094] Para estudiar el curso temporal de la acumulación de avenantramida durante el proceso de falso malteado, el proceso se llevó a cabo durante varios períodos utilizando una variedad de avena sin cáscara activa y

se determinaron los niveles de avenantramida acumulados.

[0095] Utilizando una muestra de 120 g de avena AC Baton sin cáscara (AC Baton, tasa de germinación >95 %). Las semillas se trataron térmicamente como en el Ejemplo 3, se enfriaron brevemente a temperatura ambiente (23 °C), luego se maceraron anaeróticamente en agua corriente a 32 °C durante 18 horas y se secaron al aire en un secador de semillas durante aproximadamente cuatro horas. Las semillas se esterilizaron superficialmente como en el Ejemplo 4, luego se sometieron a falso malteado en la oscuridad a 37 °C durante varios periodos de tiempo en una bandeja poco profunda sobre toallas de papel húmedas y se cubrieron con papel de aluminio. La tasa de germinación fue inferior al 1 % después de cuatro días. Después de cada período de malteado, se retiró una submuestra representativa (aproximadamente 30 g) de las semillas, se secó a temperatura ambiente (aire forzado) durante cuatro horas y luego se llevó a peso constante al secar a 37 °C durante -40 horas y se almacenó a -20 °C hasta que se analizó el contenido de avenantramida mediante HPLC usando el primer procedimiento descrito anteriormente (μg de equivalentes de avenantramida A / g en peso seco = ppm de avenantramida A), y se comparó con material no malteado. Los resultados se resumen en la Tabla 6 y se muestran en Figura 6.

Tabla 6. Curso del tiempo de acumulación de avenantramida durante el "malteado falso" de avenas AC Baton activas a 37 °C					
Tiempo (horas)	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
	Avenantramida A (ppm \pm DE)	Avenantramida B (ppm \pm DE)	Avenantramida C (ppm \pm DE)	El resto (ppm \pm DE)	Avenantramida total (ppm \pm DE)
Control (0)	(28,0 \pm 0,6)*	(29,4 \pm 0,3)*	(16,1 \pm 4,5)*	(40,6 \pm 3,1)*	(114,1 \pm 8,5)*
24	75,3 \pm 0,4	62,0 \pm 0,8	55,9 \pm 1,8	126,6 \pm 0,6	319,8 \pm 2,3
48	111,8 \pm 0,3	104,3 \pm 0,9	76,8 \pm 0,9	291,3 \pm 2,6	584,2 \pm 5,7
72	139,1 \pm 1,0	148,9 \pm 0,8	88,6 \pm 3,2	461,5 \pm 0,1	838,1 \pm 3,2
96	144,4 \pm 17,9	175,6 \pm 28,4	9,9 \pm 17,9	557,3 \pm 92,8	957,2 \pm 161,3

* Los valores de avenantramidas en las celdas representan los valores antes del malteado.

[0096] A partir de los datos de la Tabla 6 y la FIG. 6, se puede ver que el nivel de avenantramidas A, B, C y el de avenantramida total aumentaron con el tiempo durante el período de falso malteado, y el transcurso del tiempo sigue un patrón algo lineal hasta el día 3 y se nivela para el día 4. La acumulación total de cuatro días de avenantramidas representó un aumento de aproximadamente el 740 % (8,4 veces) sobre el valor inicial.

Ejemplo 6: Efectos del tratamiento de maceración con iones de calcio en la acumulación de avenantramida durante el falso malteado de avena inactiva VAO-48

[0097] Para examinar si la presencia de ion Ca^{+2} durante la fase de maceración anaeróbica tiene algún efecto sobre la acumulación de avenantramidas durante la posterior fase de malteado, se usaron una serie de concentraciones crecientes de Ca^{+2} en el agua de maceración y se determinó el contenido de avenantramida después del malteado.

[0098] Las muestras de 25 g de VAO-48 de avena sin cáscara, sin pelo, inactivas se maceraron anaeróticamente en agua o en varias concentraciones de soluciones de $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ de grado USP a 35 °C. Después de dejar reposar durante 18 horas y secar al aire en un secador de semillas durante aproximadamente cuatro horas, las semillas se esterilizaron en la superficie como se indica anteriormente y luego se sometieron a falso malteado utilizando placas de Petri (150 x 50 mm) en la oscuridad a 30 °C en un horno a temperatura controlada durante cuatro días. La tasa de germinación en todos los casos fue inferior al 1 % después de cuatro días. Después del malteado, se retiraron las semillas, se secaron a temperatura ambiente (aire forzado) durante cuatro horas y luego se llevaron a un peso constante al secarlas a 37 °C durante 40 horas y se almacenaron a -20 °C hasta que se analizó el contenido de avenantramida mediante el tercer procedimiento descrito anteriormente (mg de avenantramida A equivalentes / g en peso seco = ppm de avenantramida A), y se comparó con el material no malteado. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

[0099] Como se muestra en la Tabla 7, el nivel de avenantramidas individuales fue muy bajo en las semillas sin maltear y el contenido total de avenantramida antes del malteado fue solo de aproximadamente 32 ppm. Después de macerar en agua sin ion calcio agregado, y un malteado de cuatro días a 30 °C, los niveles de todas las avenantramidas fueron mucho más altos y la concentración total de avenantramida de 439 ppm representó un aumento de aproximadamente 13,7 veces. Con el aumento de la concentración de Ca^{+2} en el agua de maceración, la concentración de avenantramida en los granos malteados mostró una tendencia creciente, con un aumento en la

maceración sin Ca²⁺ agregado de aproximadamente 439 ppm a aproximadamente 757 ppm al 1 % de Ca²⁺ agregado (aproximadamente 1,7 veces) y un aumento general sobre las semillas sin maltear con un 1 % de Ca²⁺ de aproximadamente 23,6 veces. Estos resultados muestran que la adición de Ca²⁺ durante el período de maceración mejora la acumulación subsiguiente de avenantramidas durante el malteado.

5

Tabla 7. Efectos de la concentración de CaCl₂ durante el macerado anaeróbico sobre la acumulación de avenantramidas durante el malteado falso de VAO-48 a 30 °C

Concentración de CaCl ₂ añadida al agua del macerado	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
	Avenantramida A (ppm ± DE)	Avenantramida B (ppm ± DE)	Avenantramida C (ppm ± DE)	El resto (ppm ± DE)	Avenantramida total (ppm ± DE)
	5,21 ± 0,10	6,30 ± 0,35	2,72 ± 0,28	17,88 ± 2,08	32,12 ± 2,82
0 %	32,4 ± 1,8	103,9 ± 7,4	63,5 ± 8,9	239,2 ± 26,4	438,9 ± 44,5
0,05 %	37,7 ± 5,6	122,0 ± 14,8	81,5 ± 9,4	287,3 ± 30,9	528,4 ± 30,9
0,10 %	27,2 ± 11,4	113,4 ± 5,8	75,7 ± 4,6	251,4 ± 10,4	467,7 ± 32,1
0,50 %	59,9 ± 1,1	155,3 ± 2,3	126,4 ± 2,8	400,1 ± 0,3	741,7 ± 65
1,0 %	68,7 ± 3,3	149,0 ± 8,2	138,1 ± 4,0	401,1 ± 15,4	757,0 ± 30,9

Ejemplo 7: Efectos de altas concentraciones de tratamiento de maceración con cloruro de calcio en la acumulación de avenantramida durante el falso malteado de avena activa VAO-22

10 **[0100]** En el Ejemplo 7 se usó la línea de avena sin pelo, sin cáscara, activa VAO-22 y una mayor concentración de Ca²⁺ en el agua de maceración.

[0101] Se usó una muestra de 1,300 g de semilla de criador de avena sin cáscara, sin pelo, activa VAO-22 (84 % de tasa de germinación después de cuatro días). Las semillas se trataron térmicamente como en el Ejemplo 5.

15 Se usó una muestra de 25 g como control que representaba las semillas no malteadas y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El resto del material tratado térmicamente se maceró anaeróticamente a 35 °C en CaCl₂•(H₂O)₂ al 1,0 % o al 2,0 % durante 18 horas y se secó al aire en un secador de semillas durante aproximadamente cuatro horas. Luego, las semillas se esterilizaron en la superficie como antes y se sometieron a falso malteado en la oscuridad a 30 °C en un horno a temperatura controlada durante cuatro días utilizando placas de Petri (150 x 50 mm).

20 Después del malteado, se retiraron las semillas y se secaron a temperatura ambiente (aire forzado) durante cuatro horas, luego se llevó a peso constante mediante secado a 37 °C durante aproximadamente 40 horas y se almacenaron a -20 °C hasta que se analizó el contenido de avenantramida mediante HPLC utilizando el tercer procedimiento descrito anteriormente (mg equivalentes de avenantramida A / g en peso seco = ppm avenantramida A), y en comparación con el material no malteado. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

25

Tabla 8. Efectos de la concentración de CaCl₂ durante el macerado anaeróbico sobre la acumulación de avenantramidas durante el malteado falso de VAO-22 a 30 °C

Concentración de CaCl ₂ añadida al agua del macerado	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
	Avenantramida A (ppm ± DE)	Avenantramida B (ppm ± DE)	Avenantramida C (ppm ± DE)	El resto (ppm ± DE)	Avenantramida total (ppm ± DE)
Sin maltear	2,6 ± 0,37	3,4 ± 0,77	2,3 ± 0,39	13,7 ± 1,5	22,1 ± 3,01
1,0 %	27,0 ± 0,22	79,7 ± 0,26	65,2 ± 0,26	360,1 ± 2,4	532,0 ± 3,16
2,0 %	46,7 ± 0,08	103,0 ± 0,06	100,1 ± 0,38	461,7 ± 8,8	711,4 ± 9,32

[0102] Como se puede ver en la Tabla 8, los niveles de avenantramida individual y total de esta variedad de avena aumentaron durante un falso malteado de cuatro días después de macerar en CaCl₂ a concentraciones de 1 y 2 %. Por ejemplo, la avenantramida B aumentó de 3,4 ppm a casi 80 ppm (2.240 %; 23,4 veces más que el valor inicial) cuando se maceró anaeróticamente durante 18 horas en CaCl₂ al 1 % y se sometió a falso malteado durante cuatro días a 30 °C mientras que a CaCl₂ al 2 %, el nivel alcanzó 103 ppm (2.930 %; 30,3 veces más que la inicial). Para la avenantramida C, los aumentos correspondientes fueron de 2,3 ppm a 65,2 ppm (2.735 %; 28,4 veces más que la inicial) al 1 % de CaCl₂ y a 100,1 ppm (4.252 %; 43,5 veces más que la inicial) al 2 % de CaCl₂. Otras avenantramidas similares aumentaron y los niveles totales de avenantramida representaron niveles de 2.307 % y 3.190 % a 1 % y 2 % de CaCl₂ (24,1 y 31,9 veces más que la inicial) respectivamente. Los datos en estos dos ejemplos apoyan claramente un papel potenciador del CaCl₂ en un rango de concentración de al menos hasta el 2 % agregado durante la etapa de maceración anaeróbica, en la posterior acumulación y/o retención de avenantramidas en la avena malteada.

35

Ejemplo 8. Efectos de la molienda Satake de avena VAO 48 latente antes y después del malteado falso, sobre la acumulación de avenantramidas en el salvado y en las fracciones molidas secas de la avena deshidratada

5 **[0103]** Como se señaló anteriormente, el falso malteado da lugar a un grano de avena que es en su mayor parte esencialmente el mismo que un grano no malteado y, por lo tanto, fácilmente utilizable para el procesamiento en un salvado y un producto desalvado a través de la molienda convencional por abrasión en base seca, por ejemplo, fresado de Satake.

10 **[0104]** Se molió una muestra (aproximadamente 380 g) de avena inactiva, sin pelo, sin cáscaras VAO-48 mediante un Satake para obtener las siguientes fracciones secuenciales:

0-7 % (en peso) fracción de salvado

7-15 % (en peso) de fracción de salvado

15 15-23 % (en peso) de fracción de salvado

> 23 % (en peso) de cebada mondada desalvada

[0105] Todas las fracciones de la molienda se enfriaron inmediatamente en hielo y se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron.

20

[0106] Las muestras duplicadas de la semilla entera sin moler y las fracciones de la molienda de Satake se analizaron para determinar el contenido de avenantramida mediante HPLC usando el primer procedimiento descrito anteriormente (μg equivalentes de avenantramida A / g en peso seco = ppm de avenantramida A) y los resultados se resumen en las Tabla 9 y FIG.7.

25

Tabla 9. Niveles de avenantramidas en semillas enteras y fracciones de molienda por abrasión Satake de avenas VAO-48 sin maltear					
Material sin maltear utilizado	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
	Avenantramida A (ppm \pm DE)	Avenantramida B (ppm \pm DE)	Avenantramida C (ppm \pm DE)	El resto (ppm \pm DE)	Avenantramida total (ppm \pm DE)
Semilla entera	8,5 \pm 0,7	9,9 \pm 1,1	2,3 \pm 0,6	21,1 \pm 1,0	41,9 \pm 3,4
fracción de salvado 0-7 %	23,0 \pm 0,2	25,3 \pm 1,5	7,0 \pm 2,2	110,0 \pm 12,1	165,3 \pm 16,0
fracción de salvado 7-15 %	10,5 \pm 0,7	13,5 \pm 0,7	7,3 \pm 0,3	23,6 \pm 1,9	54,9 \pm 0,2
fracción de salvado 15-23 %	7,1 \pm 0,5	9,1 \pm 0,6	2,0 \pm 0,1	15,2 \pm 0,7	33,4 \pm 0,3
cebada mondada desalvada >23 %	4,4 \pm 0,2	5,2 \pm 0,5	1,3 \pm 0,1	8,3 \pm 0,2	19,2 \pm 0,5

[0107] Como se muestra en la Tabla 9, el contenido de avenantramida en avena VAO-48 no malteada varió considerablemente entre fracciones, con los niveles más altos (casi cuatro veces el nivel en granos enteros) mostrados por la capa de salvado más externa (es decir, 0-7 %) y disminuyendo hacia el interior en las fracciones de salvado posteriores. El resto de la cebada mondada desalvada, después de que se eliminase el 23 % del núcleo, tenía el nivel más bajo de avenantramida, menos de la mitad del contenido de avenantramida de todo el núcleo. Esta tendencia de disminución del contenido al aumentar la eliminación de las capas externas se observó no solo en el contenido total de la avenantramida, sino que, en su mayor parte, también en los niveles de cada una de las avenantramidas individuales.

35

[0108] Una muestra adicional (377 g) del mismo material, que se había tratado térmicamente como en el Ejemplo 5 y se almacenó a -20 °C hasta su uso, se maceró anaeróticamente en agua corriente a 35 °C durante 18 horas. Las semillas se esterilizaron superficialmente como en el Ejemplo 4, luego se sometieron a falso malteado a 30 °C en un horno a temperatura controlada durante cuatro días. La tasa de germinación en todos los casos fue inferior al 1 % después de cuatro días. Tras el malteado se retiraron las semillas, se secaron a peso constante a 37 °C en un horno de temperatura controlada y se almacenaron a -20 °C hasta que se molieron. Las siguientes

40

fracciones de molienda Satake se prepararon como anteriormente:

- 0-10,7 % (por peso) de fracción de salvado
- 10,7-20,6 % (por peso) de fracción de salvado
- 5 > 20,6 % (por peso) de cebada mondada desalvada

[0109] Las muestras duplicadas de la avena malteada entera sin moler y cada una de las fracciones de molino se analizaron para determinar el contenido de avenantramida mediante HPLC usando el segundo procedimiento descrito anteriormente (μg equivalentes de avenantramida A / g en peso seco = ppm avenantramida A). Los resultados se resumen en la Tabla 10 y la FIG. 8.

Tabla 10. Niveles de avenantramidas en semillas enteras y fracciones de molienda por abrasión Satake de avenas VAO-48 malteadas					
Material utilizado	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
	Avenantramida A (ppm \pm DE)	Avenantramida B (ppm \pm DE)	Avenantramida C (ppm \pm DE)	El resto (ppm \pm DE)	Avenantramida total (ppm \pm DE)
Semilla malteada entera	186,1 \pm 10,6	324,8 \pm 19,2	303,2 \pm 22,0	1.056 \pm 64,1	1.870 \pm 116
fracción de salvado 0-10,7 %	335,8 \pm 11,0	564,7 \pm 13,5	4257 \pm 24,1	2.506 \pm 168	3.832 \pm 219
fracción de salvado 10,7-20,6 %	286,3 \pm 10,1	4689 \pm 16,7	444,3 \pm 23,1	1.744 \pm 60,3	2.943 \pm 110
cebada mondada desalvada >20,6 %	117,3 \pm 11,7	209,8 \pm 15,7	210,9 \pm 26,5	589,7 \pm 63,8	1.128 \pm 118

[0110] La tendencia a disminuir los niveles de avenantramida con el aumento del grado de desalvado fue similar en las fracciones individuales recogidas, aunque el grado aparente de caída fue menos drástico que en los núcleos sin maltear, y el contenido relativo de material de salvado intermedio y la cebada mondada desalvada fue proporcionalmente ligeramente más alto que las fracciones similares en el material sin maltear. El total de avenantramidas acumulado en la fracción de desalvado del 0-10,7 % alcanzó 3.832 ppm, lo que representa un aumento del 2.218 % (22,2 veces) sobre una fracción similar del grano no malteado, y un aumento de 91,5 veces sobre todo el material no malteado .

[0111] Si las fracciones de salvado del 0-10,7 % y del 10,7-20,6 % se combinan para formar una fracción global del 0-20,6 % (es decir, un rendimiento de molienda del 20,6 %), el material tiene una concentración total de avenantramida de aproximadamente 3,388 ppm.

[0112] Estos resultados indican que las capas externas del grano contienen los niveles más altos de todas las avenantramidas.

Ejemplo 9. Efectos de la molienda Satake de avena VAO 22 sin cáscara, sin pelo, activa, antes y después del falso malteado, sobre la acumulación de avenantramidas en el salvado y en las fracciones molidas secas de cebada mondada desalvada.

[0113] Aunque la concentración de avenantramidas en las capas externas del salvado falso malteado es alta con respecto a los niveles en núcleos enteros, el rendimiento de este salvado (de 7 a 10 % del grano malteado) es bajo. Debido a la forma alargada característica y la morfología del pliegue central profundamente definida del grano, la separación limpia de salvado y endospermo es limitada y los rendimientos de salvado con mínima contaminación con tejido de endospermo se restringen a un ligero desalvado y un bajo rendimiento de molienda de fracción de salvado. Sin embargo, la línea de reproducción VAO-22 sin cáscara, sin pelo y activa tiene un grano corto y un pliegue relativamente poco profundo y se asemeja a un grano de trigo en su forma y morfología macroscópicas, lo que la hace mucho más adecuada para la molienda por abrasión Satake.

[0114] Se utilizó una muestra adicional del material utilizado en el Ejemplo 7 de semilla de criador de avena

activa sin pelo, sin cáscara VAO-22 (tasa de germinación del 84 % después de cuatro días). Las semillas se trataron térmicamente como en el Ejemplo 5. Se utilizó una muestra de 25 g como control que representaba las semillas no malteadas y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El resto del material tratado térmicamente fueron soluciones maceradas anaeróbicamente a 35 °C en agua del grifo durante 18 horas. Luego, las semillas se esterizaron en la superficie como en el Ejemplo 5 y se sometieron a falso malteado en la oscuridad a 30 °C en un horno a temperatura controlada durante cuatro días. Después del malteado, se retiraron las semillas y se secaron hasta alcanzar un peso constante a 37 °C en un horno a temperatura controlada y se almacenaron a -20 °C hasta la molienda. Las siguientes fracciones de molienda Satake se prepararon como anteriormente:

- 10 0-10,1 % (por peso) de fracción de salvado
- 10,1-20,1 % (por peso) de fracción de salvado
- > 20,1 % (por peso) de cebada mondada desalvada

[0115] Las muestras duplicadas de la avena malteada entera sin moler y cada una de las fracciones de molino se analizaron para determinar el contenido de avenantramida mediante HPLC utilizando el procedimiento 2 y el contenido de avenantramida mediante HPLC utilizando el tercer procedimiento descrito anteriormente (μg equivalentes de avenantramida A / g peso seco = ppm avenantramida A), y en comparación con el material no malteado. Los resultados se resumen en la Tabla 11 y la FIG. 9.

Tabla 11. Niveles de avenantramidas en semillas enteras y fracciones de molienda por abrasión Satake de avenas VAO-22 con malteado falso					
Material utilizado	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
	Avenantramida A (ppm \pm DE)	Avenantramida B (ppm \pm DE)	Avenantramida C (ppm \pm DE)	El resto (ppm \pm DE)	Avenantramida total (ppm \pm DE)
Semilla sin maltear entera	7,3 \pm 0,6	10,1 \pm 0,3	7,7 \pm 2,3	16,6 \pm 1,6	41,7 \pm 4,1
Semilla malteada entera	97,7 \pm 0,6	162 \pm 0,1	201,4 \pm 3,5	647,1 \pm 68,5	1.108 \pm 73
fracción de salvado 0-10,1 %	267,4 \pm 66	246,4 \pm 13,6	311,8 \pm 19,5	1.372 \pm 80	2.197 \pm 120
fracción de salvado 10,1-20,1 %	288,4 \pm 9,1	272,0 \pm 9,3	353,1 \pm 18,8	1.256 \pm 29	2.169 \pm 67
cebada mondada desalvada >20,1 %	93,6 \pm 8,6	109,6 \pm 8,1	136,5 \pm 75	405,6 \pm 39,0	745,3 \pm 63

[0116] El contenido total de avenantramida de los granos malteados completos que se muestra en la Tabla 11 aumentó de aproximadamente 42 ppm a aproximadamente 1.100, lo que representa un aumento sobre los granos sin maltear de aproximadamente 2.560 % (26,6 veces). El nivel de avenantramidas en la fracción de salvado del 0-10,1 % aumentó a casi 2.200 ppm, lo que representa un aumento del 5.170 % (52,7 veces) en avenantramidas en este material sobre los niveles en un núcleo entero sin maltear. También se observaron aumentos similares en la fracción de salvado de 10,1-20,1 %, y si se combinan para formar una fracción global de 0-20,1 % (a un rendimiento de molienda del 20,1 %), se obtiene una concentración total de avenantramida de aproximadamente 2.183 ppm.

[0117] Esto es inferior a los resultados comparables mostrados en la Tabla 10 que utilizan avena VAO-48, pero aún representa un aumento considerable de avenantramida con un rendimiento de molienda de aproximadamente el 20 %. Sin embargo, es evidente que esta avena no contiene la tendencia rápidamente decreciente en el contenido de avenantramida en la fracción de molienda intermedia comparable observada en el material VAO-48.

[0118] También es evidente a partir de los Ejemplos 8 y 9 que el fraccionamiento de molienda por abrasión en base seca, como los generados por la molienda Satake de avena sin pelo, sin cáscara sometida a falso malteado, se puede usar para producir mezclas de salvado a concentraciones de avenantramida totales de cualquier nivel deseado, y tan alto como alrededor de 3.000 ppm desde el mismo grado de desalvado, para minimizar los cambios en la composición de otros componentes como proteínas, β -glucanos, fitatos, etc. asociados con la

localización dentro del núcleo.

Ejemplo 10: Acumulación de avenantramidas en variedades de avena cubiertas activas después de un falso malteado de cuatro días a 30 °C

[0119] A pesar de las ventajas económicas de usar variedades de avena sin pelo y sin cáscara, existen aplicaciones potenciales de la tecnología en las que la inclusión de cáscaras en el producto final puede estar justificada, por ejemplo, pero no limitada a, aplicaciones de piensos, fraccionamiento industrial para aplicaciones no alimentarias, donde la eliminación de cáscaras puede no ser económica.

[0120] El malteado de avena cubierta utilizando la tecnología desarrollada en esta invención dará como resultado un producto en el que las cáscaras se eliminan después de la malta o aún están presentes en el producto: Intentos de retirar la cáscara de la avena cubierta y eliminar el vello (tricomas) mediante equipos convencionales de descascarado y pulido dan como resultado un cierto grado de daño mecánico a los granos y complicaciones posteriores durante el proceso de malteado.

[0121] Sin embargo, se realizaron intentos para utilizar avena cubierta quitando cuidadosamente la cáscara a avenas comerciales y maltear con los mismos procedimientos descritos anteriormente. Alternativamente, la avena cubierta entera también se evaluó como se describe a continuación.

[0122] Se utilizó una muestra de aproximadamente 500 g de semilla experimental Jordan de avena activa cubierta. Las semillas se trataron térmicamente como en el Ejemplo 5 con las cáscaras y se esterilizaron en la superficie como en el Ejemplo 5. Se usó una submuestra de 80 g como control que representaba las semillas no malteadas y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. El resto del material tratado térmicamente se maceró anaeróbicamente a 35 °C en agua corriente durante 18 horas. Luego, las semillas se esterilizaron en la superficie como en el Ejemplo 5 utilizando una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,25 % a temperatura ambiente durante 1 hora y se sometieron a falso malteado en la oscuridad a 30 °C en un horno a temperatura controlada durante cuatro días. Después, se retiraron las semillas. Tras el malteado se retiraron las semillas, se secaron a peso constante a 37 °C en un horno de temperatura controlada y se almacenaron a -20 °C. Se duplicaron muestras de toda la avena malteada y se analizaron para determinar el contenido de avenantramida mediante HPLC utilizando el tercer procedimiento descrito anteriormente (μg equivalentes de avenantramida A / g de peso seco = ppm avenantramida A), y se compararon con el material no malteado.

[0123] Se usó una muestra de 1.000 g de AC Goslin activa con cubierta. Las semillas se trataron térmicamente como en el Ejemplo 5 con las cáscaras, se descascararon mecánicamente usando un pelador pequeño para evitar dañar el grano y se esterilizaron en la superficie como en el Ejemplo 5. Se usó una submuestra de 25 g como control que representaba las semillas sin maltear y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. El resto de la semilla se maceró anaeróbicamente a 35 °C en agua del grifo durante 18 horas, se secó brevemente al aire durante cuatro horas en un secador de semillas a temperatura ambiente y se esterilizó en la superficie como en el Ejemplo 5 utilizando una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,25 % a temperatura ambiente durante 1 hora. Las semillas fueron entonces sometidas a falso malteado en placas de Petri grandes (150 x 15 mm) en discos de papel de filtro húmedo a temperatura ambiente y luz difusa durante cuatro días. Después de retirar las semillas, se secaron durante cuatro días en un secador de semillas y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Se duplicaron muestras de toda la avena malteada y se analizaron para determinar el contenido de avenantramida mediante HPLC utilizando el primer procedimiento descrito anteriormente (μg equivalentes de avenantramida A / g en peso seco = ppm de avenantramida A), y se compararon con el material sin maltear.

[0124] Los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Niveles avenantramidas en avenas cubiertas enteras antes y después de cuatro días de malteado falso a 30 °C					
Material utilizado	Contenido de avenantramida (equivalentes avenantramida A)				
	Avenantramida A (ppm \pm DE)	Avenantramida B (ppm \pm DE)	Avenantramida C (ppm \pm DE)	El resto (ppm \pm DE)	Avenantramida total (ppm \pm DE)
Semilla sin maltear entera Jordan (cáscaras incluidas)	3,5 \pm 0,1	3,1 \pm 0,4	3,5 \pm 0,4	47,0 \pm 4,6	57,1 \pm 5,4

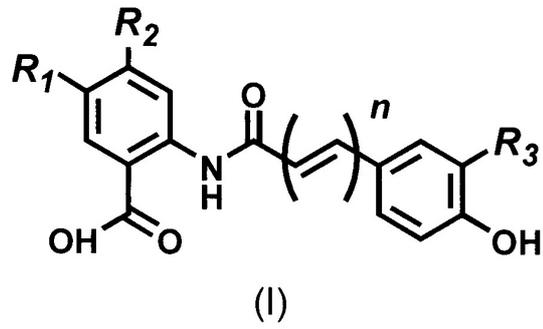
ES 2 700 455 T3

Semilla malteada entera Jordan (cáscaras incluidas)	19,6 ± 0,3	20,1 ± 0,3	34,9 ± 0,5	108,5 ± 6,3	183,1 ± 6,7
Semilla sin maltear entera AC Goslin (pelada)	31,7 ± 1,1	35,4 ± 1,3	33,3 ± 7,7	56,8 ± 3,4	157,2 ± 13,4
Semilla malteada entera AC Goslin (pelada)	24,1 ± 0,5	30,0 ± 0,7	31,8 ± 5,2	101,6 ± 3,6	187,4 ± 18

[0125] Como se puede ver en la Tabla 12, la muestra intacta sin maltear con cáscara tenía un contenido total de avenantramida de aproximadamente 57 ppm. Cuando fueron malteadas durante cuatro días a 30 °C, las semillas acumularon avenantramidas por un total de 183,7 ppm, lo que representa un aumento de alrededor del 220 % sobre la muestra sin maltear.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar la concentración de avenantramida en semillas de avena, que comprende:
- 5 inducir un estado de dormición secundaria en las semillas de avena calentando en base seca las semillas de avena a una temperatura de 30 a 40 °C durante 48 a 72 horas, seguido de un calentamiento adicional en base seca a 70 °C durante 144 a 168 horas; y someter las semillas de avena a un falso malteado macerando las semillas de avena en el estado de dormición secundaria, e incubando las semillas de avena a una temperatura de 4 a 40 °C durante 96
- 10 a 120 horas,
- en el que dicho falso malteado aumenta la concentración de avenantramida en las semillas de avena, sin germinación de las semillas de avena.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha inducción del estado de dormición secundaria comprende además macerar anaeróbicamente las semillas de avena.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la maceración anaeróbica comprende macerar las semillas de avena en agua a una temperatura de 4 a 40 °C durante 12-18 horas.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la maceración anaeróbica en agua incluye iones de calcio.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las semillas de avena son semillas de
- 25 avena sin cáscara, inactivas.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aumento de la concentración de avenantramida en las semillas de avena es mayor que 750 ppm en base seca.
- 30 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las semillas de avena están cubiertas e inactivas, y el procedimiento comprende además una etapa de descascarillado de las semillas de avena.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las semillas de avena se secan hasta un contenido de humedad final del 3 a 10 % en base seca.
- 35 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las semillas de avena están maceradas anaeróbicamente con un contenido de humedad del 35 %.
10. Una semilla de avena entera con una concentración de avenantramida que se incrementa de acuerdo con el
- 40 procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración incrementada de avenantramida en la semilla de avena es mayor que 750 ppm en base seca.
11. Un uso de semillas de avena enteras con una concentración de avenantramida que se incrementa de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1 para la fabricación de productos alimenticios, en el que el
- 45 aumento de la concentración de avenantramida en las semillas de avena es mayor que 750 ppm en base seca.
12. Un salvado de avena derivado de semillas de avena enteras con una concentración de avenantramida que se incrementa de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, en el que el aumento de la concentración de avenantramida en el salvado de avena es mayor que 750 ppm en base seca, y en el que se obtiene el salvado
- 50 sometiendo las semillas de avena al molino de abrasión para recuperar el componente de salvado.
13. El salvado de avena de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el componente de salvado comprende de 3 a 30 % del peso inicial de las semillas de avena antes de la molienda por abrasión.



Técnica anterior

FIG. 1

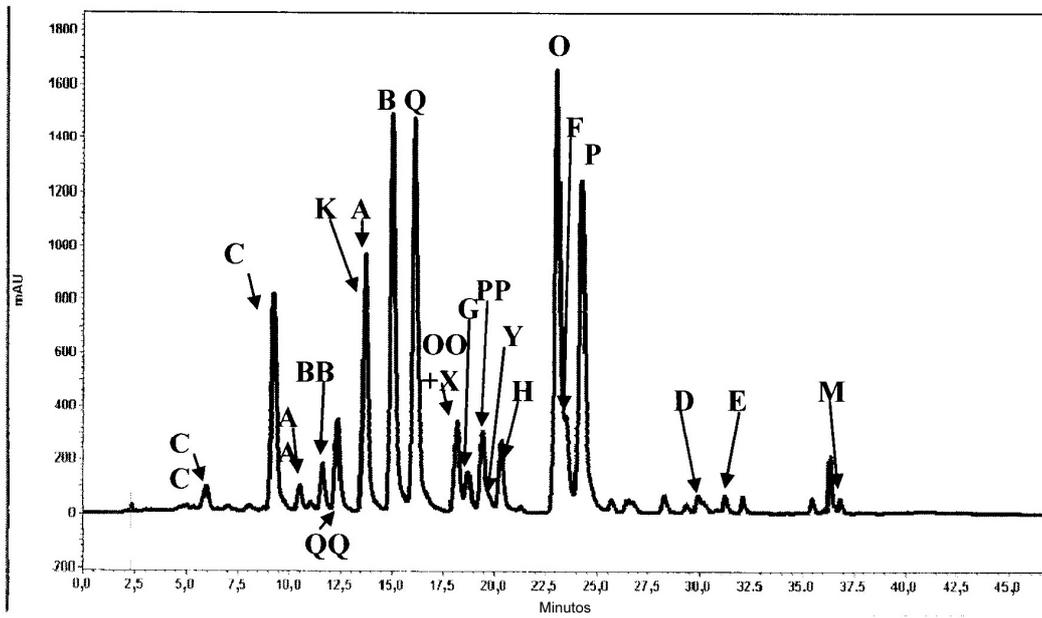
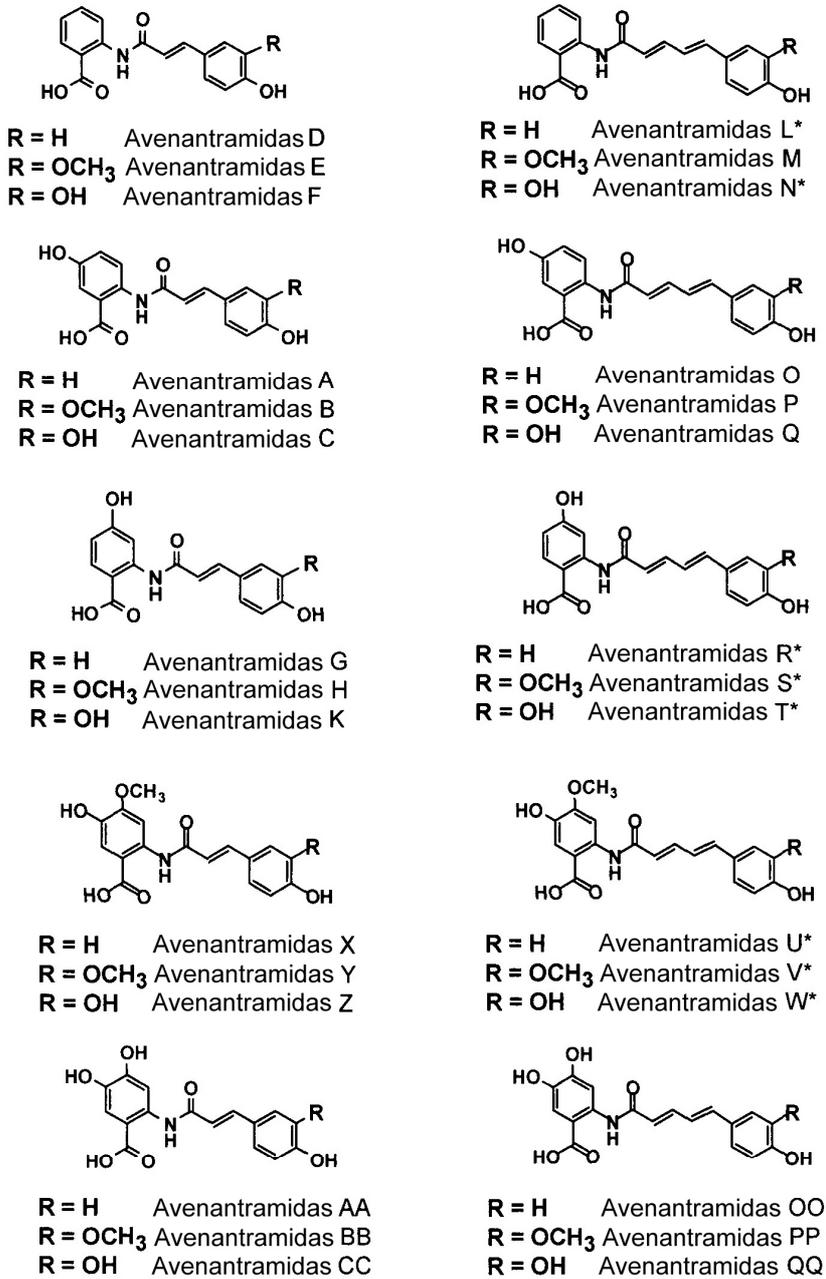


FIG. 3



*Avenantramidas secundarias identificadas por espectro UV y LC-MS/MS

FIG. 2

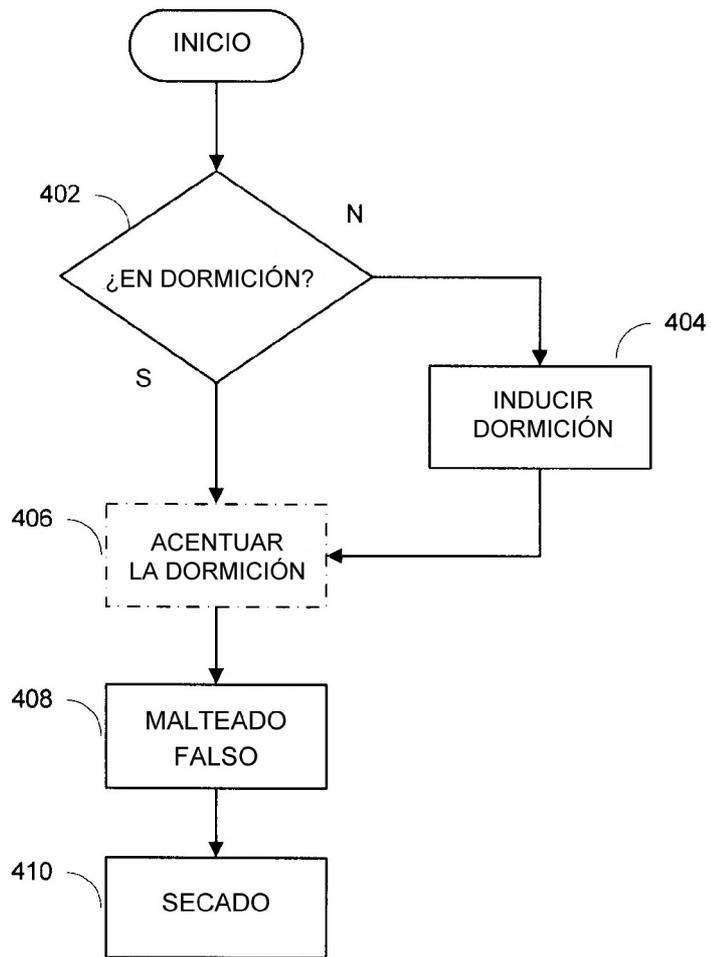


FIG. 4

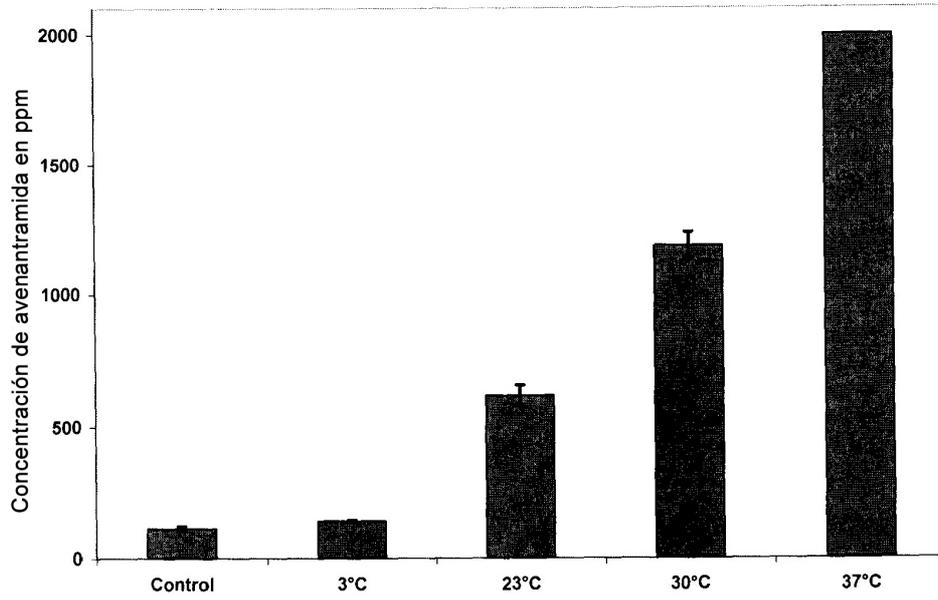


FIG. 5

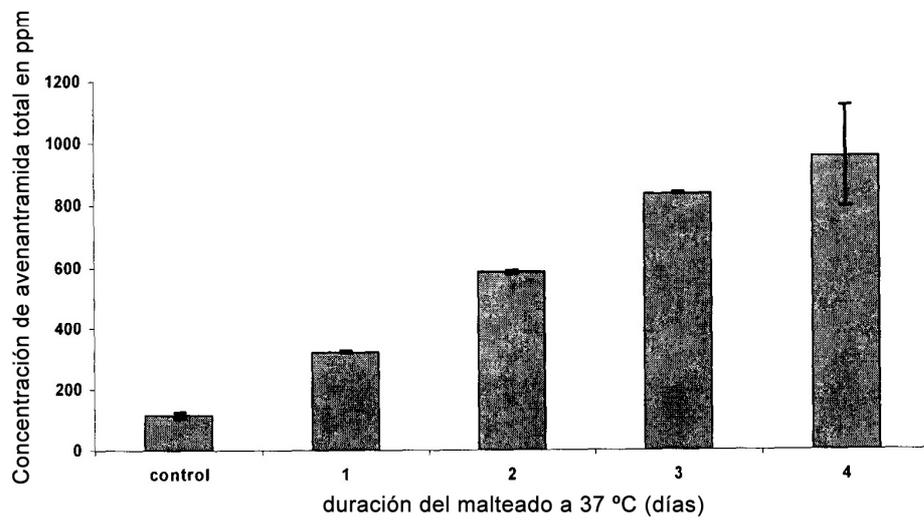


FIG. 6

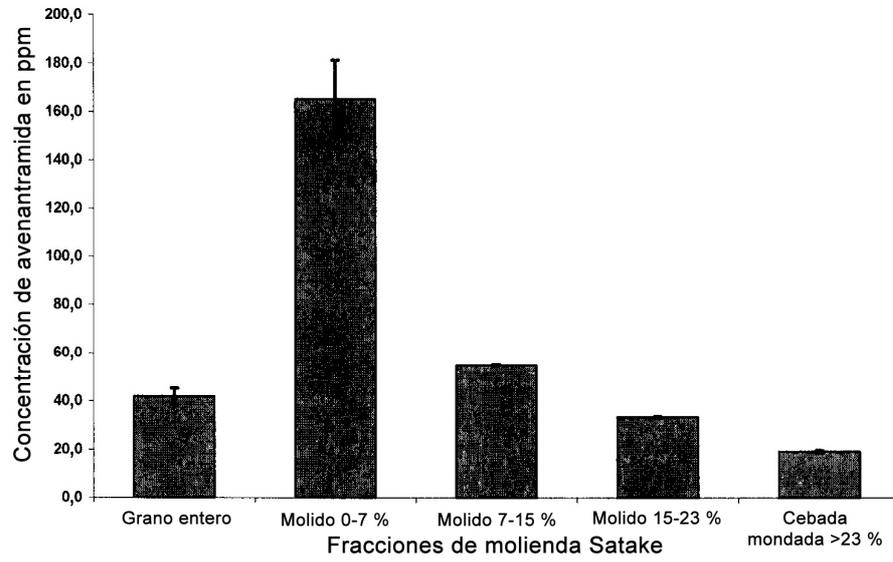


FIG. 7

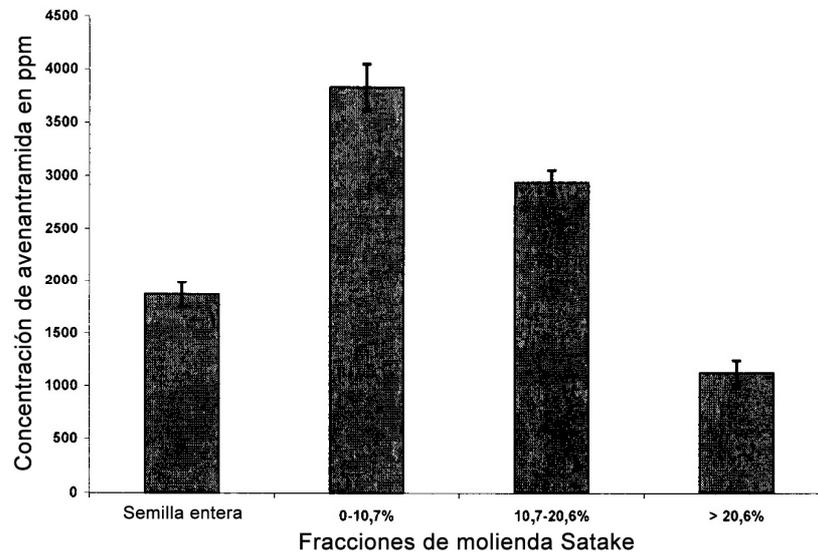


FIG. 8

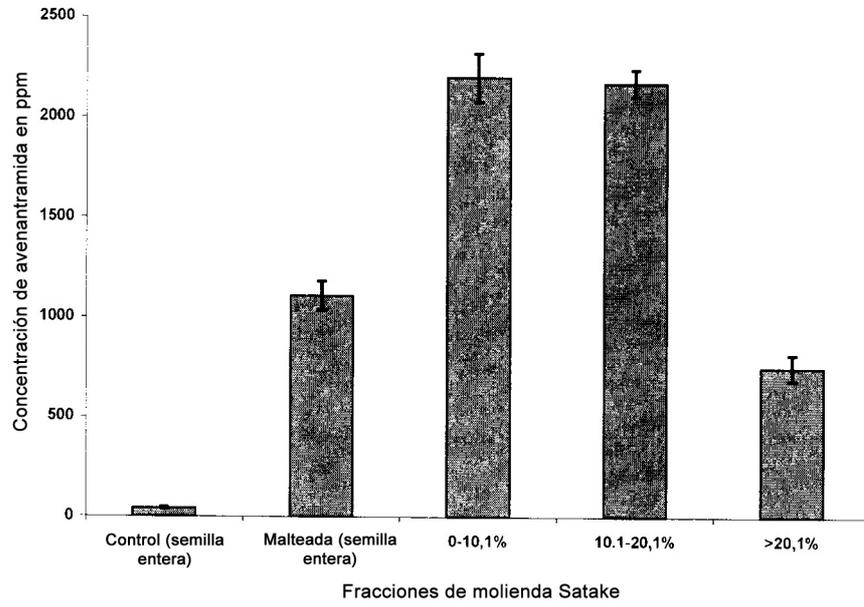


FIG. 9