

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 849**

51 Int. Cl.:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>A21D 2/38</b>  | (2006.01) |
| <b>A21D 13/02</b> | (2006.01) |
| <b>A21D 2/36</b>  | (2006.01) |
| <b>A21D 2/14</b>  | (2006.01) |
| <b>A23L 7/10</b>  | (2006.01) |
| <b>A21D 6/00</b>  | (2006.01) |
| <b>B02B 1/08</b>  | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/US2012/033500**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12142399**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12720718 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2696695**

54 Título: **Método de producción de harina de trigo integral estabilizada**

30 Prioridad:

**14.04.2011 US 201161457514 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.05.2020**

73 Titular/es:

**INTERCONTINENTAL GREAT BRANDS LLC  
(100.0%)  
100 Deforest Avenue  
East Hanover, NJ 07936, US**

72 Inventor/es:

**ZHAO, BIN;  
ZHOU, NING;  
HANSEN, TIMOTHY S.;  
DUFFIN, MICHAEL A.;  
CASSONE, DOMENICO R.;  
GANNON, DIANE L.;  
HAYNES, LYNN C.;  
MANN, JAMES M.;  
ZIMMER, JEANNY E.;  
WORFOLK, PETER y  
PRACEK, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 761 849 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 producción de harina de trigo integral estabilizada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para prolongar el período de validez de las harinas integrales mediante la inhibición o la reducción de las enzimas que producen rancidez. El método de la presente invención proporciona harinas integrales estabilizadas.

10

**Antecedentes**

El contenido de ácidos grasos libres de la harina integral aumenta durante el almacenamiento, lo que da lugar, posteriormente, al sabor rancio y al corto período de validez de la harina integral y los productos elaborados con la harina integral. La lipasa es la enzima en la harina integral que hidroliza los lípidos para producir ácidos grasos libres. Las harinas integrales de trigo que contienen salvado y germen son menos estables que las harinas de trigo refinadas porque, generalmente, las enzimas responsables de la producción de ácidos grasos libres y rancidez y los lípidos sobre los que las enzimas actúan se eliminan en gran medida con el salvado y el germen durante la molienda de los granos o semillas enteras para producir harinas de trigo refinadas blancas. El almacenamiento de las harinas de trigo integrales durante un período de tan solo 30 días a 75 °F puede dar lugar a la aparición de aromas y sabores indeseables en productos fabricados con la harina integral. En paralelo con la aparición de malos sabores se produce un aumento en la cantidad de ácidos grasos libres en las harinas, correlacionado con un aumento de la tasa de absorción de oxígeno de las harinas y la formación de los componentes oxidativos de rancidez. La disminución del tamaño de partícula aumenta la velocidad y la extensión del deterioro de los componentes del grano. El tratamiento con calor y humedad se utiliza habitualmente para inactivar enzimas responsables del deterioro de la harina, aunque se ha demostrado recientemente que contribuyen a la rancidez oxidativa medido por la formación de hexanal, un marcador habitual utilizado para detectar la rancidez oxidativa, en harina de avena. Se cree que este aumento de la rancidez oxidativa se debe a la desintegración de las estructuras celulares, tal como mediante molienda y tratamiento con calor y humedad, que tienden a estabilizar los lípidos, o a la inactivación de antioxidantes lábiles frente al calor. Además, el uso de calor y humedad para inactivar enzimas tiende a dar lugar a la desnaturalización de proteínas y la gelatinización del almidón, lo que puede influir negativamente en la funcionalidad de la proteína y la funcionalidad del almidón, lo que a su vez puede influir negativamente en las características de capacidad de procesamiento mecánico de la masa y de horneado. Al aumentar las temperaturas de estabilización, el contenido de humedad y los tiempos de tratamiento para lograr una mayor inactivación enzimática tiende a exacerbar los problemas con la funcionalidad de la proteína y la funcionalidad del almidón.

La lipasa, que causa la ranciedad hidrolítica en los productos molidos de trigo no germinado y en buen estado se encuentra casi exclusivamente en el componente de salvado. La otra enzima degradadora de lípidos clave, la lipoxigenasa (LPO), está presente casi exclusivamente en el germen y también está implicada en la aparición de rancidez. Por lo tanto, las harinas de trigo que contienen salvado o harinas graham son mucho más susceptibles a la aparición de enranciamiento que las harinas blancas que contienen poca o ninguna cantidad de salvado y germen.

La degradación de lípidos catalizada por enzimas que se produce en las harinas de trigo de extracción alta, que produce enranciamiento en este tipo de harina, se considera producida por la acción de la lipasa seguida por la acción de la LPO. Se cree que cuando la lipasa, la enzima que se encuentra casi exclusivamente en la parte del salvado del grano, se activa durante la molienda, reacciona con los aceites inestables que se encuentran de modo natural en el grano y descompone los aceites inestables a sus free fatty acids (ácidos grasos libres - FFA). Este proceso puede tardar semanas o incluso meses. A continuación, LPO, la enzima que se encuentra casi exclusivamente en la porción del germen del grano, oxida los FFA en presencia de oxígeno, produciendo productos de degradación volátiles tales como peróxidos que, a su vez, generan aldehídos de rancidez. En ausencia de humedad, la oxidación de los FFA es también un proceso muy lento que puede durar incluso varias semanas hasta que se puedan detectar cantidades notables de los aldehídos de enranciamiento. Sin embargo, en presencia de humedad, o agua, que se añade normalmente a la harina de trigo en grandes cantidades durante la etapa de amasado, la oxidación catalizada por enzimas de los ácidos grasos libres tiende a proceder en gran medida muy rápidamente, causando la formación de grandes cantidades de aldehídos rancios en un plazo de solo unos pocos minutos.

En WO99/37169 se describe un grano adecuado para usar en productos horneados que se ha inducido de modo que tuviera una extensa red capilar capaz de embeber rápidamente la humedad.

En EP 1900290 se describe un procedimiento de limpieza, decoloración y desinfección para grano de trigo. En RU2220001 se describe un método de preparación del grano para una molienda de harina.

En US2930699 se describe un método de molienda de determinados granos de cereales.

En US3832472 se describe un producto de trigo que comprende endosperma en el que la estructura celular está completamente alterada y dispersa.

En consecuencia, existe desde hace mucho tiempo la necesidad de contar con un método para producir una harina integral estabilizada frente a la degradación enzimática.

65

## Resumen

La presente invención proporciona un método como se define en las reivindicaciones adjuntas.

5 Una harina estabilizada (que no pertenece a la invención), tal como harina de trigo integral estabilizada, que presenta un período de validez inesperadamente mayor y una funcionalidad de horneado de galleta superior, se puede producir con o sin calentamiento para inhibir o inactivar la lipasa sometiendo granos enteros o una fracción o componente de salvado y germen a tratamiento con un inhibidor de lipasa para obtener una harina estabilizada que tiene un contenido de ácidos grasos libres inferior a 3.000 ppm cuando se almacena a 37,8 °C (100 °F) durante 30 días, en donde las cantidades del  
10 inhibidor durante el tratamiento son de 1 mol a 5 moles de inhibidor por 45,4 kg (100 libras) de granos enteros. El tratamiento con el inhibidor de lipasa se suministra en una solución acuosa con una concentración de 2 a 7 molar y puede reducir el pH de la fracción o componente de harina integral, salvado y germen a un pH inferior a 6, preferiblemente inferior o igual a 5,8, por ejemplo, de 4,4 a 5,8. El tratamiento con el inhibidor de lipasa se puede realizar durante el atemperado de los granos enteros o durante la hidratación de la fracción o componente de salvado y germen para obtener un contenido  
15 final de humedad en los granos enteros de 10 % en peso a 14 % en peso, con respecto al peso de los granos enteros;

En la presente memoria se describe un método (que no pertenece a la invención) para producir harina integral estabilizada que incluye salvado, germen y endosperma, con un período de validez prolongado y una funcionalidad de horneado mejorada e incluye las etapas de tratar el salvado y el germen con un inhibidor de lipasa; y producir una harina integral estabilizada en donde la gelatinización del almidón puede ser inferior a 10 %, medida mediante calorimetría diferencial de barrido y en donde la capacidad de retención de disolvente del ácido láctico es superior a 70 %.

En la presente descripción se describe una harina integral estabilizada (que no pertenece a la invención) que incluye salvado, germen y endosperma con un período de validez más largo y una funcionalidad de horneado mejorada, en donde la harina integral estabilizada tiene un contenido en ácidos grasos libres inferior a 4.200 ppm cuando se almacena a 37,8 °C (100 °F) durante 30 días, una gelatinización de almidón inferior a 10 %, medida mediante calorimetría diferencial de barrido y en donde la capacidad de retención de disolvente de ácido láctico es superior a 70 %.

En la presente memoria se describe un método (que no pertenece a la invención) en el que el salvado y el germen se pueden tratar con el inhibidor de lipasa después de la molienda de los granos enteros.

En la presente memoria se describen artículos horneados (que no pertenecen a la invención) proporcionados que contienen harina integral estabilizada, al menos un azúcar, al menos un aceite o grasa, y un inhibidor de lipasa que estabiliza la harina integral, donde los productos horneados tienen cualidades sensoriales positivas aumentadas y propiedades sensoriales negativas disminuidas en comparación con un control producido sin tratamiento de estabilización o usando estabilización por calor solamente sin inhibidor de lipasa, en al menos 3 %, basado en la evaluación sensorial realizada por un panel de expertos del gusto utilizando una escala de 1 a 100 donde una puntuación de 1 tiene la intensidad mínima y una puntuación de 100 tiene la máxima intensidad de la propiedad sensorial.

## 40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de bloques del proceso para la producción de harina integral estabilizada donde el tratamiento de granos enteros con un inhibidor de lipasa se realiza durante el atemperado según los métodos de la presente invención.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de bloques del proceso para la producción de harina integral estabilizada en la que se trata una fracción o componente de salvado y germen con un inhibidor de lipasa según métodos de la presente invención.

50 La Figura 3 es una representación que muestra el efecto del pH en la actividad de lipasa extraíble para las harinas integrales del ejemplo 2.

La Figura 4 es una representación de los ácidos grasos libres totales formados después de 30 días a 33,3 °C (92 °F) en función del pH inicial de la harina integral del ejemplo 3.

55 La Figura 5 es una representación que muestra el efecto de la concentración del ácido y del tipo de ácido en la supresión de ácidos grasos libres formados en la harina integral del ejemplo 3.

La Figura 6 es una representación de análisis bivariable que muestra el efecto del ácido láctico y el nivel de agua de atemperado en el contenido de ácidos grasos libres de la harina integral del ejemplo 7 después de 28 días a 33,3 °C (92 °F).

La Figura 7 es una representación que muestra el efecto del tiempo de atemperado y la cantidad de ácido láctico añadido en la resistencia de la harina medido mediante el valor de SRC del ácido láctico para las harinas integrales del ejemplo 7.

65

La Figura 8 es una representación que muestra la formación de free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) en la harina integral final del ejemplo 7 en función de la concentración de ácido y la cantidad aplicada al trigo.

5 La Figura 9 es una representación que muestra el pH en función de la concentración de ácido para la harina de salvado fino y de reducción del ejemplo 7.

La Figura 10 es una representación que muestra los free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) formados en la harina integral del ejemplo 7 en función del pH y de la concentración de ácido aplicado al trigo.

10 La Figura 11 es una representación que muestra el efecto de la concentración del ácido láctico en el agua de atemperado en la relación de SRC de ácido láctico/SRC de agua de la harina integral del ejemplo 7 al cabo de 28 días a 33,3 °C (92 °F).

15 La Figura 12 es una representación que muestra el efecto de la concentración de ácido láctico en el agua de atemperado en la relación de SRC de ácido láctico/SRC de agua de la harina integral del ejemplo 7 al cabo de 28 días a 33,3 °C (92 °F).

### Descripción detallada de la invención

20 Se hará referencia ahora a determinados aspectos detallados de diversas realizaciones de la invención. Debe entenderse que los detalles específicos descritos en la presente memoria no deben interpretarse como limitantes, sino meramente como una base representativa de cualquier aspecto de la invención.

25 Excepto en los ejemplos, o donde se indique de forma expresa otra cosa, todas las cantidades numéricas en esta descripción que indican cantidades de material y/o uso deben entenderse como modificadas por el término “aproximadamente” en la descripción del alcance más amplio de la invención. Se prefiere generalmente la práctica en los límites numéricos indicados.

30 Se entiende también que la presente invención no está limitada a las realizaciones y métodos específicos descritos a continuación.

Además, la terminología utilizada en el presente documento se usa solo a fines de describir realizaciones concretas de la presente invención y no se pretende que la limiten en ningún modo. En particular, las figuras no están dibujadas a escala.

35 Debe señalarse también que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular “un” “uno/a” y “el” comprende los referentes plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la referencia a un componente en el singular, se pretende que comprenda una pluralidad de componentes.

40 El término “grano entero” incluye el grano en su totalidad, por ejemplo, como grano de trigo o endospermo, antes de cualquier procesamiento. Como ha indicado la U.S. Food and Drug Administration (FDA) en el proyecto de directrices del 15 de febrero de 2006, y como se usa en el presente documento, el término “grano entero” incluye granos de cereales que consisten en el fruto intacto, molido, partido o en forma de copos de los granos cuyos componentes principales -el endospermo amiláceo, el germen y el salvado- están presentes en las mismas proporciones relativas en que existen en el grano intacto. La FDA reseñó que dichos granos pueden incluir cebada, alforfón, trigo bulgur, maíz, mijo, fleo, centeno, avena, sorgo, trigo y arroz silvestre.

45 El término “producto de harina de trigo refinada” es una harina de trigo que cumple los estándares de la FDA para un producto de harina de trigo refinada de un tamaño de partículas en que no menos de 98 % pasa a través de un tamiz de malla U.S. 70 (210 micrómetros).

50 El término “molturación” como se usa en la presente memoria incluye las etapas de estiramiento, rotura, tamizado y clasificación del grano entero para separarlo en sus partes constituyentes, que puede dar también como resultado alguna reducción del tamaño de partículas de las partes constituyentes.

55 El término “molienda” como se usa en la presente memoria incluye cualquier proceso dirigido a reducir el tamaño de partículas, incluyendo, aunque no de forma limitativa las partículas que colisionan entre sí o reducir mecánicamente el tamaño de partículas.

60 El término “atemperación” como se usa en el presente documento es el proceso de añadir agua al trigo antes de la molienda para endurecer el salvado y suavizar el endospermo del grano y de este modo mejorar la eficacia de separación de la harina.

65 El término “hidratación” o “hidratación posterior” como se usa en la presente memoria se refiere a la etapa de ajustar la hidratación posterior a la molturación o posterior a la molienda para ajustar el contenido de humedad de un constituyente individual y/o ajustar el contenido de humedad de la harina final.

También, como se usa en la presente memoria, la “inhibición” de la lipasa o enzima significa que la lipasa o enzima ya no produce su producto enzimático o tiene sustancialmente reducida la producción de su producto enzimático. El término “inhibición” como se usa en la presente memoria incluye además la inactivación de la lipasa, en donde la lipasa o enzima se inactiva o se inactiva sustancialmente. Por ejemplo, la inhibición de la lipasa significa que la enzima lipasa no está hidrolizando los triglicéridos y liberando los ácidos grasos en la harina. La inhibición o la capacidad de la enzima para producir su producto enzimático puede ser reversible o irreversible. Por ejemplo, el calentamiento de una enzima para desnaturalizar la enzima puede inactivar de forma irreversible la enzima. El tratamiento con un inhibidor enzimático puede inactivar de forma reversible o irreversible una enzima. Por ejemplo, el tratamiento ácido para inhibir la lipasa reduce la producción del producto enzimático, es decir, la formación de ácidos grasos libres. Sin embargo, con la inhibición reversible, puede seguir existiendo actividad enzimática extraíble o actividad lipasa medible. Cuando se extrae la enzima para medir su actividad, se puede eliminar la inhibición de su actividad colocando la enzima en un entorno de pH más alto en donde su actividad se restaura o invierte. También, el tratamiento ácido puede disminuir el pH en tal extensión que la inhibición de la lipasa es irreversible, o la inactivación de la lipasa es irreversible, de tal manera que existe la formación reducida del producto enzimático y una menor actividad de la enzima extraíble.

En otras realizaciones, toda o parte de la lipasa se puede inhibir o inactivar de forma reversible o irreversible. En realizaciones de la invención, la totalidad o una parte de la lipasa se puede inhibir o inactivar primero de forma reversible en una primera etapa de estabilización y a continuación inhibir o inactivar de forma irreversible en una segunda etapa de estabilización. El inhibidor de lipasa puede retenerse en la fracción o componente de harina integral o salvado y germen para inhibir o inactivar sustancialmente la lipasa para reducir sustancialmente la formación de ácidos grasos libres, sobre la cual la lipoxigenasa actuaría si no para producir en última instancia aldehídos de rancidez. En otra modalidad, el inhibidor de lipasa reduce la formación de ácidos grasos libres y permite la reducción de la cantidad de exposición de la fracción o componente de grano integral, salvado y germen, o almidón a la alta temperatura y humedad que se dan con estabilización térmica. La exposición reducida ayuda a evitar la excesiva gelatinización del almidón y la desnaturalización o alteración de la proteína, lo que puede influir negativamente en la capacidad de procesamiento mecánico de la masa, la funcionalidad del almidón y las características de horneado. Se ha descubierto que el uso del inhibidor de lipasa para inhibir o inactivar de forma reversible la lipasa de forma inesperada hace que la lipasa tenga mayor tendencia a destruir o desnaturalizar o inactivar de forma permanente la lipasa con el calor. El empleo del inhibidor de lipasa con estabilización térmica proporciona de forma inesperada cantidades inferiores de lipasa viva o activa o actividad de lipasa extraíble, o producción de ácidos grasos libres. La reducción sustancial en la producción de ácidos grasos libres se logra con la gelatinización reducida de almidón y la desnaturalización o alteración de la proteína con temperaturas de estabilización más bajas, menos agua, o tiempos de estabilización más cortos incluso cuando se emplea un triturado muy fino.

#### Harina integral y el problema de enranciamiento

Como se ha expuesto anteriormente, el problema del enranciamiento es un problema que limita el período de validez de las harinas integrales. Se han propuesto varias teorías, algunas de las cuales se detallan a continuación, pero no se pretende que ninguna de ellas limite cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria.

El enranciamiento en productos de cereales puede deberse a reacciones de degradación hidrolítica (enzimática) u oxidativa, o ambas. A menudo, la hidrólisis puede predisponer a los productos al posterior enranciamiento oxidativo. La naturaleza ha proporcionado numerosos rasgos protectores a las semillas para prevenir el enranciamiento y el deterioro, permitiendo a las semillas sobrevivir a períodos de condiciones adversas antes de alcanzar un entorno adecuado para la germinación y el crecimiento. Es menos probable que aparezca enranciamiento cuando los materiales lípidos, por ejemplo, aceite de semillas, no pueden interactuar con reactivos o catalizadores tales como aire y enzimas. Un rasgo protector de los granos de cereales es la provisión de compartimentos separados para almacenar lípidos y enzimas de forma que no puedan interactuar.

La molienda de los granos de cereales supone destruir los compartimentos separados, el salvado, el germen y el endospermo, de forma que los componentes lípidos y enzimáticos del grano pueden interactuar, aumentando en gran medida la aparición de enranciamiento. El aumento de la molienda para reducir la arenosidad causada por las partículas de salvado tiende a aumentar el área superficial, reducir la encapsulación natural de los lípidos, y aumentar la interacción entre los lípidos y los componentes enzimáticos, aumentando de esta forma la aparición de enranciamiento.

Por lo tanto, las harinas de extracción alta, esto es, las que contienen cantidades sustanciales de salvado y germen, son menos estables que las harinas blancas. El almacenamiento prolongado de las harinas de extracción alta a menudo conduce a la aparición de enranciamiento. El enranciamiento incluye factores de calidad adversos derivados directa o indirectamente de las reacciones con los lípidos endógenos, que producen una reducción en la calidad de horneado de la harina, sabores y olores desagradables, y/o propiedades funcionales inaceptables. Una razón principal para la aparición de enranciamiento en las harinas de extracción alta es la degradación enzimática de aceites naturales inestables. En la porción de los granos utilizada para fabricar las harinas de extracción alta existe un importante suministro de aceites naturales inestables. Las harinas blancas, por otra parte, contienen poca o ninguna cantidad de aceites o grasas naturales inestables porque se fabrican predominantemente a partir de la parte del endosperma de los granos y están generalmente sustancialmente exentas de salvado y germen.

## Solución al enranciamiento y problemas relacionados

Un aspecto de la invención proporciona un proceso para prolongar el período de validez de las harinas integrales que contienen proporciones naturales de salvado, germen y endosperma utilizando un inhibidor de lipasa. El inhibidor de lipasa se retiene en la harina integral para inhibir la lipasa para reducir la formación de ácidos grasos libres. En realizaciones de la invención, el inhibidor de lipasa puede emplearse con o sin estabilización térmica, para inhibir de manera permanente o irreversible la lipasa para reducir la formación de ácidos grasos libres. El inhibidor de lipasa reduce la formación de ácidos grasos libres reduciendo al mismo tiempo la cantidad de exposición del grano entero a altas temperaturas y humedad que tienden a aumentar la gelatinización del almidón y la desnaturalización o alteración de la proteína, y que pueden influir negativamente en la capacidad de procesamiento mecánico de la masa, la funcionalidad del almidón y las características de horneado.

En realizaciones donde se emplea estabilización térmica, se ha descubierto que el uso del inhibidor de lipasa para inhibir o inactivar la lipasa inesperadamente hace que la lipasa sea más susceptible a destruir o desnaturalizar o permanentemente inactivar la lipasa con calor. Se cree que la mayor susceptibilidad de la lipasa al calor se debe a la abertura o despliegue de las moléculas de lipasa mediante la acción del inhibidor. El empleo del inhibidor de lipasa con estabilización térmica proporciona de forma inesperada cantidades inferiores de lipasa viva o activa o actividad de lipasa extraíble, o producción de ácidos grasos libres. La reducción sustancial en la producción de ácidos grasos libres se logra con la gelatinización reducida de almidón y la desnaturalización o alteración de la proteína con temperaturas de estabilización más bajas, menos agua, o tiempos de estabilización más cortos incluso cuando se emplea un triturado muy fino. En los molinos de harina existentes, donde la adición de equipos de calentamiento o inyección de vapor para la estabilización térmica puede no ser factible o puede estar limitada debido al espacio, tiempo o consideraciones de costo, la reducción sustancial de la producción de ácidos grasos libres puede lograrse fácilmente mediante el uso de un inhibidor de lipasa según los métodos de la presente invención.

Esta metodología se puede emplear para producir harinas integrales estabilizadas incluso con tamaño de partículas muy fino, como la producción de una harina de trigo integral en la que no pasa menos de 98 % a través de un tamiz de luz de malla 70 de EE. UU. (210 micrómetros). Las harinas integrales estabilizadas se producen con bajos grados de daño al almidón debido a la abrasión y bajos grados de gelatinización o desnaturalización de proteína del almidón debido al tratamiento con calor y humedad. En un aspecto de la invención, las harinas de trigo integral estabilizadas tienen funcionalidades de amasado y horneado, y pueden tener tamaños de partícula que se acercan a los de la harina de trigo refinada blanca. Se pueden usar en la producción coherente masiva de masas muy maquinables y amasables para fabricar productos horneados tales como galletas, galletas saladas, y aperitivos con excelente dispersión en el horno y aspecto, y sin una sensación en boca arenosa.

En otro aspecto de la invención, esta metodología se puede utilizar para producir harinas integrales estabilizadas, tales como harina de trigo integral finamente molida, y un componente de salvado estabilizado muy finamente molidos presentan una sorción de carbonato de sodio-agua inesperadamente baja, y un período de validez inesperadamente prolongado, con un contenido en ácidos grasos libres y un contenido de hexanal a 1 mes o más en condiciones de almacenamiento acelerado inesperadamente bajo. Se puede conseguir un elevado nivel de inhibición y/o inactivación de enzimas para reducir sustancialmente la producción de ácidos grasos libres reteniendo al mismo tiempo niveles inesperadamente elevados de nutrientes esenciales, tales como antioxidantes y vitaminas que se pierden durante los tratamientos de estabilización a alta temperatura. Además, la formación de acrilamida se puede controlar a niveles inesperadamente bajos utilizando las condiciones de estabilización de la presente invención.

En el método de la invención, el período de validez de una harina integral se prolonga tratando el salvado y el germen de granos o semillas enteras con una solución acuosa de un inhibidor de lipasa para inhibir o inactivar la lipasa para obtener una harina integral estabilizada que tiene un contenido de ácidos grasos libres inferior a 3.000 ppm, por ejemplo, de 2.000 ppm a aproximadamente 2.800 ppm, cuando se almacena a 37,8 °C (100 °C) durante 30 días. Los resultados inesperadamente superiores se obtienen cuando la concentración del inhibidor de lipasa en la solución acuosa durante el tratamiento es de 2 molar a 7 molar, con máxima preferencia de aproximadamente 3 molar a aproximadamente 5 molar, por ejemplo, de aproximadamente 3,3 molar a aproximadamente 4 molar, y la cantidad del inhibidor empleado durante el tratamiento es de 1 mol a 5 moles, con máxima preferencia de aproximadamente 2 moles a aproximadamente 4 moles de inhibidor por 45,4 kg (100 libras) de granos o semillas entera o de harina integral.

Los granos enteros tratados pueden molerse para obtener una harina integral estabilizada sin realizar ninguna estabilización adicional, tal como calentamiento o exposición al vapor, u opcionalmente se puede emplear una segunda etapa de estabilización.

En realizaciones de la invención, el tratamiento con la solución acuosa de inhibidor de lipasa para inhibir o inactivar la lipasa se lleva a cabo a una temperatura inferior a 38 °C, por ejemplo, de aproximadamente 24 °C a aproximadamente 30 °C. En dichas realizaciones, el tratamiento se puede realizar sin la aplicación de calor, o con la etapa opcional de estabilización por calor/térmica. En realizaciones en las que se emplea la etapa opcional de estabilización térmica, se puede realizar una estabilización térmica de baja temperatura sin la aplicación de vapor, de manera que la lipasa se inhibe o inactiva a una temperatura inferior a aproximadamente 98 °C, por ejemplo, puede realizarse una estabilización térmica baja a una temperatura de aproximadamente 80 °C a aproximadamente

98 °C. En otras realizaciones de la invención, se puede proporcionar una estabilización térmica alta, con o una harina integral estabilizada (que no pertenece a la invención) con un pH inferior a 6, preferiblemente inferior o igual a 5,8, por ejemplo de 4,4 a 5,8, un contenido de ácidos grasos libres inferior a 3.000 ppm, por ejemplo de 2.000 ppm a aproximadamente 2.800 ppm, cuando se almacena a 37,8 °C (100 °F) durante 30 días, una capacidad de retención de disolvente del ácido láctico (SRC del ácido láctico) superior o igual a 65 %, preferiblemente superior a 70 %, y una relación de SRC del ácido láctico a capacidad de retención de disolvente carbonato de sodio-agua (SRC del carbonato de sodio) superior a 1, preferiblemente superior a 1,1. La harina integral estabilizada que tiene germen de salvado y endosperma puede tener una distribución de 0 % en peso sobre un tamiz estándar del n.º 35 (500 micrómetros) de EE. UU. e inferior o igual a aproximadamente 10 % en peso sobre un tamiz estándar del n.º 70 (210 micrómetros) de EE. UU.: La harina integral estabilizada puede tener una distribución de tamaño de partículas de al menos aproximadamente 85 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 90 % en peso a aproximadamente 98 % en peso a través de un tamiz estándar del n.º 100 (149 micrómetros) de EE. UU.

El documento de publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20070292583, y el documento de publicación de solicitud de patente internacional n.º WO/2007/149320, concedida a Haynes y col., describen la producción de harina integral estabilizada triturando granos de cereal integral para obtener granos de cereal integral molido.

El documento de solicitud provisional de tramitación conjunta de EE. UU. n.º 61/457.315, presentada el 24 de febrero de 2011, y en nombre de Derwin G. Hawley y col. para "Process And Apparatus For Mass Production of Stabilized Whole Grain Flour" (proceso y aparato para la producción en masa de harina integral estabilizada) y su solicitud internacional n.º PCT/US12/26490, presentada el 24 de febrero de 2012, en nombre de Hawley y col., describen que la producción de harinas integrales estabilizadas que tienen un tamaño de partículas fino y que exhiben buena funcionalidad de horneado puede producirse con alto rendimiento utilizando dos fracciones de salvado y germen y una fracción de endosperma.

Según la solicitud provisional de tramitación conjunta de EE. UU. n.º 61/457.315, presentada el 24 de febrero de 2011, en nombre de Derwin G. Hawley y col. y la solicitud internacional n.º PCT/US12/26490, presentada el 24 de febrero de 2012, en nombre de Derwin G. Hawley y col., y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20070292583, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO/2007/149320 cada una de ellas concedida a Haynes y col. se puede estabilizar o desactivar enzimáticamente al menos una, o todas, de las fracciones de salvado y germen triturado retenidas o recuperadas utilizando un agente estabilizante comestible, tal como el tratamiento con metabisulfito de sodio, ácidos orgánicos, tales como ácido sórbico, dióxido de azufre, cisteína, ácido tioglicólico, glutatión, sulfuro de hidrógeno u otros agentes reductores comestibles solos o en combinación con tratamiento térmico.

Un aspecto de la invención proporciona métodos para la producción de una harina estabilizada, sin dañar sustancialmente el almidón o influir negativamente en la funcionalidad del horneado mediante el uso de un inhibidor de lipasa. El tratamiento con el inhibidor de lipasa puede inhibir de manera reversible o irreversible al menos una parte de la lipasa presente en los granos enteros. Los métodos pueden emplearse para prolongar el período de validez de las harinas proporcionando una producción de ácidos grasos libres inesperadamente baja y una gelatinización de almidón y desnaturalización de proteína inesperadamente bajas. Las condiciones de estabilización no influyen negativamente en la capacidad de procesamiento mecánico de la masa ni en la funcionalidad de horneado de la harina integral estabilizada aun cuando se obtienen tamaños finos de la harina integral. La harina de trigo integral, que contiene proporciones naturales de endosperma, salvado y germen análogas a las del grano intacto, tiene una funcionalidad de almidón y de proteína inesperadamente alta, con bajo daño del almidón, baja desnaturalización de proteínas y bajo grado de gelatinización, y un período de validez inesperadamente largo. La concentración del inhibidor de lipasa en la solución acuosa durante el atemperado y la cantidad del inhibidor empleada durante el atemperado proporcionan una reducción inesperadamente superior en la producción de ácidos grasos libres obteniéndose al mismo tiempo una funcionalidad de almidón y de proteína y características de horneado inesperadamente superiores como ponen de manifiesto la solvent retention capacity (capacidad de retención de disolvente - SRC) de ácido láctico, la relación de SRC de ácido láctico a SRC de agua SRC y la relación de SRC de ácido láctico a SRC de carbonato de sodio.

El inhibidor de lipasa puede ser cualquier inhibidor de lipasa no tóxico y comestible que pueda ser absorbido por y retenido en la harina sin influir sustancialmente de forma negativa en el sabor o el aroma, el olor o la sensación en boca del producto. El inhibidor de lipasa empleado en las realizaciones de la invención puede ser un inhibidor reversible, un inhibidor irreversible, y combinaciones o mezclas de los mismos. Los inhibidores reversibles pueden unirse a enzimas con interacciones no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas y enlaces iónicos. Se pueden combinar múltiples enlaces débiles entre el inhibidor y el sitio activo para producir una unión fuerte y específica. A diferencia de los sustratos e inhibidores irreversibles, los inhibidores reversibles generalmente no experimentan reacciones químicas cuando se unen a la enzima y pueden eliminarse fácilmente mediante dilución o diálisis. Los inhibidores reversibles que se pueden emplear incluyen los cuatro tipos de inhibidores de enzimas reversibles, que se clasifican según el efecto de la variación de la concentración del sustrato de la enzima en el inhibidor, especialmente, inhibidores competitivos, inhibidores que no pueden ser competitivos, inhibidores mixtos e inhibidores no competitivos. Los inhibidores irreversibles usualmente modifican de forma covalente una enzima, y la inhibición no se puede revertir. Los inhibidores irreversibles frecuentemente contienen grupos funcionales reactivos, tales como mostazas de nitrógeno, aldehídos, haloalcanos, alquenos, aceptores de Michael, sulfonatos de fenilo, o fluorofosfonatos. Estos grupos electrófilos reaccionan con cadenas laterales de aminoácido para formar aductos covalentes. Los residuos modificados

son los que tienen cadenas laterales que contienen nucleófilos, tales como grupos hidroxilo o sulfhidrilo; estos incluyen los aminoácidos serina (como en el DFP, derecha), cisteína, treonina o tirosina.

Los inhibidores de lipasa ilustrativos que pueden emplearse son bisulfatos alcalinos, bisulfitos, metabisulfitos y metabisulfatos, tales como metabisulfito de sodio, ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, té verde o extracto de té verde, extracto de romero, dióxido de azufre, cisteína, ácido tioglicólico, glutatión, sulfuro de hidrógeno, otros agentes reductores comestibles, y mezclas de los mismos. Los inhibidores de lipasa preferidos que pueden emplearse son componentes ácidos, tales como al menos un ácido orgánico, por ejemplo, ácido láctico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido sórbico, ácido tartárico, ácido málico, ácido fumárico, ácido acético y ácido oxálico, y al menos un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico, y té verde o extracto de té verde, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el ácido láctico, el ácido clorhídrico y el ácido fosfórico son preferidos para usar como inhibidor de lipasa.

En realizaciones en las que se emplea un componente ácido como inhibidor de lipasa, el tratamiento con el inhibidor de lipasa puede reducir el pH de la fracción o componente de harina integral, salvado y germen a un pH inferior a 6, preferiblemente inferior o igual a 5,8, por ejemplo, de 4,4 a 5,8.

El inhibidor de lipasa puede disolverse en agua y aplicarse a aproximadamente temperatura ambiente para su absorción en el salvado y el germen: 1) remojando los granos enteros en la solución de inhibidor de lipasa, o 2) pulverizando la solución de inhibidor de lipasa sobre los granos enteros. En el método de la invención, la solución acuosa de inhibidor de lipasa se emplea como un medio de atemperado para atemperar granos enteros.

La concentración del inhibidor de lipasa en la solución acuosa durante el atemperado es de 2 molar a 7 molar, con máxima preferencia de aproximadamente 3 molar a aproximadamente 5 molar, por ejemplo, de aproximadamente 3,3 molar a aproximadamente 4 molar. La cantidad del inhibidor empleada durante el atemperado es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por 45,36 kg (100 libras) de granos enteros. La cantidad de inhibidor de lipasa empleado depende de su peso molecular, por lo que las cantidades se expresan en moles. Por ejemplo, cuando se emplea ácido clorhídrico como inhibidor de lipasa, este puede utilizarse en una cantidad de al menos aproximadamente 300 ppm, en base al peso de los granos enteros, y el ácido láctico puede emplearse en una cantidad de al menos aproximadamente 3.000 ppm, en base al peso de los granos enteros.

La etapa de atemperado con la solución acuosa de inhibidor de lipasa se lleva a cabo para obtener un contenido final de humedad en los granos enteros de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 14 % en peso, con respecto al peso de los granos enteros.

Los granos enteros contienen principalmente el endospermo, el salvado, y el germen, en proporciones decrecientes, respectivamente. En los granos de cereal entero, por ejemplo, con una humedad de campo de aproximadamente 13 % en peso, el endospermo o almidón constituye aproximadamente 83 % en peso, el salvado constituye aproximadamente 14,5 % en peso, y el germen constituye aproximadamente 2,5 % en peso, basándose en el peso del grano intacto. El endospermo contiene el almidón, y tiene menos contenido de proteína que el germen y el salvado. Tiene también poca grasa bruta y constituyentes de cenizas. El salvado (pericarpo o cáscaras) es la pared del ovario maduro que está por debajo de la cutícula, y comprende todas las capas celulares externas por debajo del revestimiento de la semilla. Tiene muchos polisacáridos no de almidón, tales como celulosa y pentosanos. El salvado o pericarpo tiende a ser muy duro debido a su alto contenido en fibra y transmite una sensación en boca seca, arenosa, particularmente cuando están presentes en tamaños de partículas grandes. Contiene también la mayoría de lipasas y lipooxigenasas del grano y necesita ser estabilizado. A medida que aumenta la extensión de la molienda o molturación, el tamaño de partículas del salvado se aproxima al tamaño de partículas del almidón, haciendo que el salvado y el almidón sean más difíciles de separar. También, el daño del almidón tiende a aumentar debido a una mayor entrada de energía mecánica, y la aspereza del salvado en comparación con el endospermo, y la ruptura de los gránulos de almidón. También, el almidón dañado mecánicamente tiende a ser más susceptible a la gelatinización. El germen se caracteriza por su alto contenido en aceite graso. Es también rico en proteínas brutas, azúcares, y constituyentes de cenizas.

El contenido de humedad de la fracción de salvado puede controlarse atemperando los granos enteros de tal manera que las porciones exteriores de las semillas o granos se humedezcan sin humedecer sustancialmente el interior de sus porciones. Dicho tratamiento evita o reduce sustancialmente la necesidad de secar la fracción fina obtenida a partir del interior o endospermo de la semilla o grano, humedeciendo a la vez el exterior o las porciones de salvado y germen de la semilla para el tratamiento de estabilización. Los métodos de atemperamiento que se pueden usar para conseguir humedecer una superficie o salvado incluyen, por ejemplo, el enjuagado de los granos enteros durante periodos de tiempo limitados en un baño o cuba. En otras realizaciones, los granos enteros pueden pulverizarse superficialmente con agua y permitir que se atemperen. Pueden emplearse tiempos de atemperamiento de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 24 horas según algunas realizaciones de la invención. El enjuagado de los granos durante un periodo prolongado de tiempo no es deseable debido a que puede dar como resultado una penetración en profundidad de agua en el grano, humedeciendo la porción interior del grano, y dando como resultado una excesiva gelatinización del almidón.

El tratamiento del salvado y el germen de los granos o semillas enteras con una solución acuosa de un inhibidor de lipasa para inhibir o inactivar sustancialmente la lipasa con o sin estabilización térmica proporciona una harina

estabilizada que tiene un contenido de ácidos grasos libres inferior a 3.000 ppm, por ejemplo de 2.000 ppm a aproximadamente 2.800 ppm, cuando se almacenan a 37,8 °C (100 °F) durante 30 días, cuando el inhibidor de lipasa se utiliza en una concentración de 2 molar a aproximadamente 7 molar, con máxima preferencia de aproximadamente 3 molar a aproximadamente 5 molar, por ejemplo de aproximadamente 3,3 molar a aproximadamente 4 molar. Además, el uso del inhibidor de lipasa combinado con estabilización térmica proporciona una reducción inesperadamente superior en la producción de ácidos grasos libres, en comparación con el uso de la estabilización térmica sola o el uso del inhibidor de lipasa solo. La ventaja de la estabilización mejorada de tratamiento ácido combinado con tratamiento térmico permite reducir la actividad de lipasa y reducir el nivel de ácidos grasos libres formados durante el almacenamiento que no se puede conseguir mediante tratamiento ácido o tratamiento térmico solamente. Se ha descubierto que se obtiene un efecto sinérgico inesperado con el uso del inhibidor de lipasa y la estabilización térmica para la reducción de la formación de ácidos grasos libres en comparación con la reducción de ácidos grasos libres con tratamiento térmico solo o tratamiento de reducción con inhibidor de lipasa solo.

Se cree que el uso del inhibidor de lipasa para inhibir sustancialmente o inhibir de forma reversible o inactivar de forma reversible la lipasa, hace de forma inesperada que la lipasa tenga mayor tendencia a destruir o desnaturalizar o inactivar permanentemente la lipasa con calor. Se cree que la mayor susceptibilidad de la lipasa al calor se debe a la abertura o despliegue de las moléculas de lipasa mediante la acción del inhibidor. El empleo del inhibidor de lipasa con estabilización térmica proporciona de forma inesperada cantidades inferiores de lipasa viva o activa o actividad de lipasa extraíble, o producción de ácidos grasos libres. La reducción sustancial en la producción de ácidos grasos libres se logra con la gelatinización reducida de almidón y la desnaturalización o alteración de la proteína con temperaturas de estabilización más bajas, menos agua, o tiempos de estabilización más cortos incluso cuando se emplea un triturado muy fino.

En realizaciones de la invención, el tratamiento con la solución acuosa de inhibidor de lipasa para inhibir o inactivar la lipasa se lleva a cabo a una temperatura inferior a 38 °C, por ejemplo, de aproximadamente 24 °C a aproximadamente 30 °C. El tratamiento se puede realizar sin la aplicación de calor o con la etapa opcional de estabilización térmica. En realizaciones en las que se emplea la etapa opcional de estabilización térmica, se puede realizar una estabilización térmica de baja temperatura sin la aplicación de vapor, de manera que la lipasa se inhibe o inactiva a una temperatura inferior a aproximadamente 98 °C, por ejemplo, puede realizarse una estabilización térmica baja a una temperatura de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 98 °C. Una estabilización térmica a alta temperatura, con o sin vapor, puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 140 °C, preferiblemente de aproximadamente 115 °C a aproximadamente 125 °C, para inhibir o inactivar la lipasa después del tratamiento con la solución acuosa del inhibidor de lipasa. El tiempo de tratamiento térmico puede ser de aproximadamente 0,25 minutos a aproximadamente 12 minutos, preferiblemente de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 7 minutos, utilizándose por lo general los tiempos de tratamiento más prolongados con las temperaturas más bajas y el contenido de humedad más bajo.

La temperatura de estabilización y el tiempo de estabilización, y el contenido de humedad se pueden controlar de tal manera que la gelatinización del almidón resultante de la estabilización en la fracción gruesa o componente de salvado triturado o molido y estabilizado puede ser inferior a aproximadamente 25 %, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 %, con máxima preferencia inferior a aproximadamente 5 %, determinado mediante differential scanning calorimetry (calorimetría diferencial de barrido - DSC). El bajo grado de gelatinización del almidón y el bajo grado de daño del almidón conseguido en la presente invención se ilustran por una entalpía de fusión del almidón superior a aproximadamente 4 J/g, preferiblemente superior a aproximadamente 5 J/g, basado en el peso de almidón en el componente de salvado estabilizado o fracción molida gruesa, medida por calorimetría de barrido diferencial (DSC), a una temperatura de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 70 °C. El componente de salvado estabilizado puede tener una entalpía de fusión del almidón superior a aproximadamente 2 J/g, basado en el peso de la fracción gruesa molida estabilizada, medida por differential scanning calorimetry (calorimetría diferencial de barrido - DSC), a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 65 °C. En general, la gelatinización del almidón se produce cuando: a) se añade agua, y se mezcla con almidón, en una cantidad suficiente, en general de al menos aproximadamente 30 % en peso, con respecto al peso del almidón, y b) la temperatura del almidón se eleva a al menos aproximadamente 80 °C (176 °F), preferiblemente a 100 °C (212 °F) o más. La temperatura de gelatinización depende de la cantidad de agua disponible para su interacción con el almidón. Cuanto menor es la cantidad disponible de agua, en general, mayor es la temperatura de gelatinización. La gelatinización puede definirse como el colapso (alteración) de órdenes moleculares dentro del gránulo de almidón, que se manifiesta en cambios irreversibles en las propiedades tales como hinchazón granular, fusión de cristalito nativo, pérdida de birrefringencia y solubilización del almidón. La temperatura de la etapa inicial de gelatinización y el intervalo de temperaturas en el que se produce, dependen de la concentración del almidón, método de observación, tipo de gránulo, y de la heterogeneidad en la población de gránulos en observación. El pegado es el fenómeno de la segunda etapa que sigue a la gelatinización en la disolución del almidón. Implica un aumento de la hinchazón granular, de la exudación de componentes moleculares (p. ej. amilosa, seguido de amilopectina) del gránulo, y eventualmente, una, total colapso de los gránulos. Véase Atwell y col., "The Terminology and Methodology Associated with Basic Starch Phenomena," *Cereal Foods World*, Vol. 33, N.º 3, págs. 306-311 (marzo 1988).

La harina integral estabilizada que tiene salvado, germen y endosperma obtenidos con los métodos de la presente invención (pero que no pertenece a la propia invención) presenta una funcionalidad de horneado y una funcionalidad de las proteínas superiores como mostraba una capacidad de retención de disolvente del ácido

láctico (SRC del ácido láctico) superior o igual a 65 %, preferiblemente superior a 70 % y una relación de SRC del ácido láctico a la capacidad de retención del disolvente carbonato de sodio-agua (SRC del carbonato de sodio) superior a 1, preferiblemente superior a 1,1.

5 La harina integral estabilizada puede tener una distribución de tamaño de partículas de 0 % en peso en un tamiz normalizado de EE. UU. de malla n.º 35 (500 micrómetros), e inferior o igual a aproximadamente 20 % en peso, preferiblemente inferior o igual a aproximadamente 10 o 5 % en peso sobre un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 70 (210 micrómetros). En otra realización de la invención, la harina integral estabilizada puede tener una distribución de tamaño de partículas de hasta aproximadamente 100 % en peso a través de un tamiz estándar de EE. UU. del n.º 70 (210 micrómetros). Además, la harina integral estabilizada puede tener también una distribución de tamaño de partículas de al menos 75 % en peso, preferiblemente al menos 85 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 90 % en peso a aproximadamente 98 % en peso, inferior o igual a 149 micrómetros e inferior o igual a 5 % en peso superior a 250 micrómetros. En aspectos de la invención, la fracción de salvado y germen estabilizada o componente de salvado puede tener una distribución de tamaño de partículas finas de 0 % en peso sobre un tamiz estándar de 0 a 35 (500 micrómetros), e inferior o igual a aproximadamente 20 % en peso sobre un tamiz estándar de aproximadamente 70 (210 micrómetros).

20 Como se muestra esquemáticamente en la Figura 1, en realizaciones de la invención se puede producir una harina integral estabilizada mediante el tratamiento de granos enteros, tales como granos 1 de trigo con un inhibidor 3 de lipasa, tal como una mezcla de ácido láctico y extracto de té verde, durante una etapa 5 de atemperado. El inhibidor 3 de lipasa puede mezclarse previamente con agua 7 para formar una solución acuosa 10 del inhibidor 3 de lipasa. La solución acuosa 10 del inhibidor 3 de lipasa puede mezclarse con los granos 1 de trigo en una cuba para atemperar las semillas 3 de trigo en la etapa 5 de atemperado. Durante la etapa 5 de atemperado, el inhibidor 3 de lipasa se absorbe en el salvado y el germen de las semillas 1 todavía intactas, preferiblemente sin penetración en el endosperma de las semillas intactas 1, para inhibir o inactivar al menos una parte de la lipasa en el salvado y el germen para reducir la producción de ácidos grasos libres. Los granos 12 enteros atemperados pueden molerse en la operación 15 de molienda de harina para obtener una fracción 18 de endosperma o corriente 20, y una fracción de salvado y germen o componente 22 de salvado o corriente 25. La fracción de salvado y germen o componente 22 de salvado puede estabilizarse opcionalmente en una operación 30 opcional de estabilizador térmico o segunda etapa de estabilización para obtener una fracción de salvado y germen estabilizada o componente 32 de salvado estabilizado. La estabilización térmica o segunda etapa de estabilización 30 puede emplearse para inhibir o inactivar de forma reversible o irreversible cantidades adicionales de lipasa y/o inhibir o inactivar de forma irreversible lipasa que ha sido inhibida reversiblemente o inactivada reversiblemente mediante el inhibidor 3 de lipasa en la primera etapa de estabilización o etapa 5 de atemperado. La fracción de salvado y de germen estabilizada o componente 32 de salvado estabilizado se puede combinar con la fracción 20 de endosperma usando equipos de mezclado y transporte convencionales, tales como un transportador mecánico de husillo, para obtener una harina 40 integral estabilizada.

40 Como se muestra esquemáticamente en la Figura 2 (que no pertenece a la invención) se puede producir una harina integral estabilizada mediante el tratamiento de una fracción de salvado y germen o componente 200 de salvado o corriente 202 con un inhibidor 203 de lipasa, tal como una mezcla de ácido láctico y extracto de té verde, durante una etapa 205 de hidratación o primera etapa de estabilización o como una etapa aparte. Notablemente, el inhibidor de lipasa puede ser suministrado mediante cualquier solución o mediante cualquier otro mecanismo de suministro compatible. En una modalidad, el inhibidor 203 de lipasa puede premezclarse con agua 207 para formar una solución acuosa 210 del inhibidor 203 de lipasa. En otras realizaciones, pueden emplearse otros disolventes con o sin agua para formar una solución para suministrar el inhibidor de lipasa durante el atemperado o hidratación o en una etapa aparte de tratamiento con lipasa. La fracción de salvado y germen o componente 200 de salvado se puede obtener opcionalmente atemperando los granos enteros 212 en una etapa 213 de atemperado opcional donde las semillas se pueden atemperar opcionalmente en agua de forma convencional sin ningún inhibidor de lipasa. Los granos 214 enteros opcionalmente atemperados pueden molerse en la operación 215 de molienda de harina para obtener una fracción 218 de endosperma o corriente 220, y la fracción de salvado y germen o componente 200 de salvado o corriente 202. La solución acuosa 210 del inhibidor 203 de lipasa puede mezclarse con o pulverizarse sobre la fracción de salvado y germen o componente 200 de salvado en un hidratador para hidratar o remojar la fracción o componente 200 de salvado y germen en la etapa 205 de hidratación o primera etapa de estabilización. Durante la etapa 205 de hidratación, el inhibidor 203 de lipasa se absorbe en la fracción de salvado y germen o componente 200 de salvado, para inhibir o inactivar al menos una parte de la lipasa en el salvado y el germen para reducir la producción de ácidos grasos libres. La fracción de salvado y germen estabilizada e hidratada o el componente 222 de salvado de la primera etapa 205 de estabilización se puede estabilizar térmicamente de forma opcional en una operación 230 en estabilizador térmico opcional o segunda etapa de estabilización para obtener una fracción de salvado y germen estabilizada o componente 232 de salvado estabilizado. La estabilización térmica o la estabilización 230 de la segunda etapa puede emplearse para inhibir o inactivar de forma reversible o inactivar las cantidades adicionales de lipasa y/o inhibir irreversiblemente o inactivar la lipasa que ha sido inhibida reversiblemente o inactivada reversiblemente por el inhibidor 203 de lipasa en la primera etapa de estabilización o etapa 205 de hidratación. La fracción de salvado y de germen estabilizada o componente 232 de salvado estabilizado se puede combinar con la fracción 220 de endosperma usando equipos de mezclado y transporte convencionales, tales como un transportador mecánico de husillo, para obtener una harina 240 integral estabilizada.

65

La molienda de los granos enteros puede realizarse utilizando operaciones de molienda y/o trituración de la harina conocidas para obtener una fracción de salvado y germen o un componente de salvado y una fracción de endosperma, y para obtener harinas y fracciones y componentes que tienen distribuciones de tamaño de partículas tales como las descritas en la publicación de solicitud de patente US-2005/0136173 A1, concedida a Korolchuk, publicación de solicitud de patente US-2006/0073258 A1, concedida a Korolchuk, publicación de solicitud de patente US-20070292583, y publicación de solicitud de patente internacional WO/2007/149320, concedida cada una de ellas a Haynes y col., publicación de solicitud de patente US-2007/0269579 concedida a Dreese y col. y la patente US-7.258.888, concedida a Dreese y col. En realizaciones preferidas, se pueden emplear las operaciones de molienda y/o trituración de la harina para obtener una fracción de salvado y germen o componente de salvado y una fracción de endosperma, y para obtener harinas y fracciones y componentes que tienen distribuciones de tamaño de partículas como se describe en la publicación de solicitud de patente US-20070292583, y en la publicación de solicitud de patente internacional WO/2007/149320, concedida cada una de ellas a Haynes y col., y en la solicitud provisional US-61/457.315 de tramitación conjunta, presentada el 24 de febrero de 2011 y la solicitud internacional PCT/US-12/26490 presentada el 24 de febrero de 2012, cada una de ellas en nombre de Derwin G. Hawley y col. La estabilización por tratamiento con un inhibidor de lipasa como se describe en la presente descripción puede emplearse con métodos de estabilización térmica o al vapor, tales como los descritos en dichas solicitudes, publicaciones y patentes para mejorar la estabilidad o el período de validez de las harinas, y las fracciones y componentes producidos mediante los métodos descritos en la presente descripción.

Por ejemplo, en realizaciones de la invención, las operaciones de molienda y trituración, como se describe en dicha solicitud provisional de patente de EE. UU. de tramitación conjunta n.º 61/457.315, presentada el 24 de febrero de 2011, y en la solicitud internacional PCT/US12/26490, presentada el 24 de febrero de 2012, cada una de ellas en nombre de Derwin G. Hawley y col., para producir una harina integral estabilizada que tiene una distribución de tamaño de partículas de 0 % en peso en un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 35 (500 micrómetros), e inferior a o igual a aproximadamente 20 % en peso, preferiblemente inferior a o igual a aproximadamente 10 % en peso en un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 70 (210 micrómetros) o una harina integral estabilizada que tiene una distribución de tamaño de partículas de hasta aproximadamente 100 % en peso a través de un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 70 (210 micrómetros) o una harina integral estabilizada que tiene una distribución de tamaño de partículas de al menos 75 % en peso, preferiblemente al menos 85 % en peso inferior o igual a 149 micrómetros e inferior o igual a 5 % en peso superior a 250 micrómetros.

En otras realizaciones de la invención, las operaciones de molienda y trituración, como se describe en la mencionada publicación de solicitud de patente US-20070292583, y la publicación de solicitud de patente internacional WO/2007/149320, concedida cada una de ellas a Haynes y col., pueden emplearse para producir una harina integral estabilizada que tiene una distribución de tamaño de partículas inferior a aproximadamente 10 % en peso, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 % en peso en un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 35 (500 micrómetros), aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 40 % en peso en un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 60 (250 micrómetros), aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 60 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 40 % en peso en un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 100 (149 micrómetros), e inferior a aproximadamente 70 % en peso, por ejemplo de aproximadamente 15 % a aproximadamente 55 % en peso, a través de un tamiz normalizado de EE. UU. del n.º 100 (149 micrómetros).

La estabilización se puede llevar a cabo de forma discontinua, semi discontinua o continua, siendo la última la preferida. Recipientes de calentamiento conocidos, tales como ollas discontinuas, mezcladores, tambores rotatorios, mezcladores continuos, y extrusoras se pueden utilizar para calentar la fracción gruesa para estabilizarla. El aparato de calentamiento puede ser recipientes encamisados provistos de camisas de calentamiento o enfriamiento para un control externo de la temperatura de estabilización y/o boquillas de inyección de vapor para la inyección directa de humedad y calor dentro de la fracción gruesa. En otras realizaciones, se puede utilizar radiación infrarroja (IR) o energía para calentar la fracción de salvado gruesa para estabilizarla. En una realización preferida, se puede utilizar un estabilizador fabricado por Bepex, o un recipiente de cocción de salvado fabricado por Lauhoff para la estabilización de una fracción de forma continua. En realizaciones donde la molienda o molturación se realizan simultáneamente con la estabilización térmica, se pueden emplear rodillos calentadores. En dichas realizaciones, la temperatura y el contenido de humedad se pueden ajustar a un valor superior para acortar el tiempo de estabilización para ajustarse a un tiempo de molienda deseado para conseguir una distribución del tamaño de partículas buscada.

La fracción tratada térmicamente se puede dejar enfriar al aire ambiente. En otras realizaciones, el enfriamiento de una fracción de salvado y de germen molida o molturada o componente de salvado después del tratamiento térmico se puede controlar de forma opcional para minimizar adicionalmente la gelatinización del almidón no deseada. Generalmente, no se produce gelatinización significativa adicional en el componente de salvado estabilizado a temperaturas inferiores a aproximadamente 60 °C. A continuación, la fracción gruesa tratada térmicamente se puede enfriar a temperatura ambiente, o aproximadamente 25 °C. En las realizaciones de la invención, la velocidad de enfriamiento promedio utilizada para conseguir una temperatura superficial de aproximadamente 25 °C puede ser un descenso de temperatura de aproximadamente 1 °C/min a aproximadamente 3 °C/min.

La velocidad de enfriamiento se deberá seleccionar para minimizar la gelatinización del almidón adicional en la fracción gruesa después del tratamiento térmico, pero no debería ser tan rápida como para evitar la inactivación adicional de la lipasa y la LPO, en caso necesario. Si no se desea una inactivación adicional de la lipasa y la LPO,

el enfriamiento se puede realizar para reducir rápidamente la temperatura de la fracción gruesa tratada térmicamente a menos de aproximadamente 60 °C.

Los refrigeradores que se pueden utilizar para los procesos de la invención incluyen tubos o túneles refrigerantes por los que la fracción gruesa tratada con calor pasa bajo la fuerza de la gravedad o sobre un dispositivo transportador. Aunque la fracción gruesa tratada térmicamente pasa por el dispositivo, se puede hacer pasar aire enfriado por encima y a través de la fracción gruesa o componente de salvado. El aire de enfriamiento agotado se puede recoger o eliminar por succión después, por ejemplo, mediante una campana, y tratarse adicionalmente en un separador ciclónico. Un enfriador preferido suministra aire de enfriamiento a diferentes regiones a lo largo de la longitud de un tubo o túnel de refrigeración. Preferiblemente, el aire de enfriamiento se hace pasar por un dispositivo de refrigeración antes de ponerse en contacto con la fracción gruesa térmicamente tratada para conseguir una temperatura que es inferior a la del aire ambiente.

Tras el enfriamiento, el contenido de humedad de la fracción gruesa térmicamente tratada se puede reducir además opcionalmente mediante secado. Se prefieren temperaturas de deshidratación inferiores a aproximadamente 60 °C para que no se produzca una gelatinización adicional del almidón durante el proceso de deshidratación. En una realización, las temperaturas de deshidratación pueden estar comprendidas en un intervalo de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 60 °C. Sin embargo, el secado a temperatura ambiente es menos caro que el secado a una temperatura de enfriamiento e impedirá la gelatinización del almidón adicional en la fracción gruesa térmicamente tratada durante el secado. Preferiblemente, el secado se lleva a cabo en una atmósfera que tenga una humedad relativa baja, y se puede llevar a cabo preferiblemente en una atmósfera a presión reducida. Si el tratamiento térmico, hidratación, y enfriamiento adicional consigue un contenido de humedad comprendido en el intervalo deseado, no se considera necesaria la etapa de secado.

#### Producción de la harina integral estabilizada

Según la invención, los granos enteros estabilizados con un inhibidor de lipasa se muelen para obtener la harina integral estabilizada. La harina integral estabilizada, tal como la harina de trigo integral estabilizada, incluye salvado, germen y endospermo.

El contenido de humedad de la harina integral estabilizada, tal como la harina de trigo integral estabilizada, puede variar de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 14,5 % en peso, con respecto al peso de la harina integral estabilizada, y la actividad del agua puede ser inferior a aproximadamente 0,7. La harina de trigo integral estabilizada puede tener un contenido de proteínas de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 14 % en peso, por ejemplo, aproximadamente 12 % en peso, un contenido de grasa de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 3 % en peso, por ejemplo, aproximadamente 2 % en peso, y un contenido de cenizas de aproximadamente 1,2 % en peso a aproximadamente 1,7 % en peso, por ejemplo, aproximadamente 1,5 % en peso, estando referido cada uno de los porcentajes al peso de la harina integral estabilizada.

La harina de trigo integral estabilizada presenta una funcionalidad de horneado excelente donde un estiramiento en el horno o estiramiento de la galleta puede ser al menos aproximadamente 130 % del diámetro original de la masa prehorneada, tal como se mide según el método de laboratorio AACC 10-53.

Las realizaciones descritas son aplicables a todos y cada uno de los tipos de trigo. Aunque de manera no limitativa, los granos de trigo pueden seleccionarse de granos de trigo blando/blando y blando/duro. Pueden comprender granos de trigo blanco o rojo, granos de trigo duro, granos de trigo blando, granos de trigo de invierno, granos de trigo de primavera, granos de trigo duro o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de otros granos enteros que se pueden procesar según diversas o determinadas realizaciones o aspectos de la presente invención incluyen, por ejemplo, avena, maíz, arroz, arroz silvestre, centeno, cebada, alforfón, trigo bulgur, mijo, sorgo, y similares, y las mezclas de granos enteros.

Ciertas realizaciones de la invención proporcionan una estabilidad mejorada de la materia prima y un período de validez de más de un mes, por ejemplo, 2 meses o más, en condiciones de almacenamiento aceleradas, para una harina integral estabilizada, tal como una harina de trigo integral estabilizada. Se puede almacenar un producto alimenticio más estable en condiciones similares durante un periodo prolongado de tiempo que un producto alimenticio más estable antes de ser rancio. Puede vigilarse y medirse la presencia de ranciedad en una multiplicidad de diferentes maneras, incluyendo la prueba sensorial (por ejemplo, análisis del sabor y/u olor), mediciones del nivel de la actividad lipoxigenasa o lipasa, mediciones del nivel de ácidos grasos libres, y/o mediciones del nivel de hexanal.

La harina integral estabilizada, tal como la harina de trigo integral estabilizada, puede combinarse, premezclarse, o mezclarse con harina de trigo refinada para obtener una harina, producto o ingrediente, reforzada, tal como una harina de trigo reforzada. El producto de harina de trigo reforzada puede contener el componente de salvado o el germen estabilizado o la harina integral estabilizada, tal como la harina de trigo integral estabilizada, en una cantidad de aproximadamente 14 % en peso a aproximadamente 40 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 30 % en peso, basándose en el peso total del producto de harina reforzada, tal como el producto de harina de trigo reforzada.

La harina integral estabilizada, tal como la harina de trigo integral estabilizada, puede emplearse para sustituir parcial o completamente la harina de trigo refinada, u otras harinas, en una variedad de productos alimenticios. Por ejemplo, al menos aproximadamente 10 % en peso, como máximo 100 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de la harina de trigo refinada, puede sustituirse por la harina de trigo integral estabilizada para aumentar los valores nutricionales de los productos de harina de trigo refinada con un efecto negativo reducido, si no nulo, en el aspecto, la textura, el aroma, o el sabor del producto.

Las harinas integrales estabilizadas, tales como las harinas de trigo integral estabilizadas pueden envasarse, almacenarse de forma estable y utilizarse además posterior o inmediatamente en la producción de alimentos. Los productos de harina estabilizada están listos para ser procesados adicionalmente para obtener los productos alimenticios acabados añadiendo agua y otros ingredientes alimenticios aplicables, mezclándolos, conformándolos, y horneándolos o friéndolos, etc. Las masas que contienen el salvado estabilizado y las harinas integrales, tales como harina de trigo integral, pueden producirse y mecanizarse continuamente, por ejemplo, triturarse, laminarse, moldearse, extrudirse, o coextrudirse, y cortarse, sobre una base de producción de masa. Los productos integrales acabados (p. ej., galletas de mantequilla, galletas, galletas saladas, barritas de aperitivo, etc.) tienen una textura agradable con la característica de un sabor de grano entero.

Los productos de harinas integrales estabilizados, tales como los productos de harina de trigo integral estabilizados pueden utilizarse en una amplia variedad de productos alimenticios. Los productos alimenticios incluyen productos alimenticios farináceos, y en particular productos de tipo galleta de mantequilla, productos de pasta, cereales listos para consumir, y confites. Los productos alimenticios son productos de panadería o aperitivos. Los productos de panadería pueden incluir galletas, galletas saladas, masa de pizza, masa de tarta, panes, bagels, pretzels, brownies, magdalenas, gofres, pasteles, tartas, panes rápidos, bollos dulces, donuts, barritas de frutas y granos, tortillas, y productos de panadería precocidos. Los productos de aperitivo pueden incluir patatas fritas y aperitivos extrudidos inflados. El producto alimenticio puede seleccionarse particularmente de galletas, galletas saladas, y barritas crujientes de cereales. Las galletas pueden ser productos de tipo barrita, extrudidos, coextrudidos, triturados y cortados, moldeados por rotación, cortados con alambre, o galletas de tipo sándwich. Los ejemplos de galletas que se pueden producir incluyen barquillos azucarados, galletas rellenas de fruta, galletas con pepitas de chocolate, galletas azucaradas, y similares. Los aperitivos pueden ser aperitivos de tipo fermentado o tipo no fermentado, y galletas Graham. Los productos horneados producidos pueden ser aperitivos o galletas que tienen un contenido de grasa entera o puede ser un contenido de grasa reducido, un contenido bajo de grasa, o un producto sin grasa.

Además del agua, los ingredientes de la galleta, galleta salada, y aperitivo que pueden premezclarse con la harina integral estabilizada, tales como harina de trigo integral estabilizada, incluyen harina de trigo enriquecida, manteca vegetal, azúcar, sal, jarabe de maíz con un alto contenido en fructosa, agentes de la fermentación, agentes saborizantes y agentes colorantes. Las harinas de trigo enriquecidas que se pueden utilizar incluyen harinas de trigo enriquecidas con niacina, hierro reducido, mononitrato de tiamina y riboflavina. Las mantecas vegetales que se pueden utilizar incluyen aquellas preparadas de aceite de soja parcialmente hidrogenado. Los agentes de la fermentación que se pueden utilizar incluyen fosfato de calcio y bicarbonato de sodio. Los agentes colorantes que se pueden utilizar incluyen agentes colorantes vegetales tales como extracto de annato y oleorresina de cúrcuma.

La masa preparada incluye masa que comprende diversas combinaciones de ingredientes de las galletas, galletas saladas, y aperitivos anteriormente mencionados. Todos los ingredientes anteriores se premezclan homogéneamente y la cantidad de agua se controla para formar una masa de la consistencia deseada. La masa puede formarse a continuación en piezas y hornearse o freírse para producir productos que tienen atributos de humedad, geometría, aspecto y textura excelentes.

La cantidad total del componente de harina, tal como la harina integral estabilizada y otras harinas opcionales que se puede usar en las composiciones de productos horneados, tales como galletas, galletas de mantequilla y aperitivos puede estar comprendida, por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 80 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 45 % en peso a aproximadamente 75 % en peso, con respecto al peso de la masa, sin incluir el peso de las inclusiones. Salvo que se indique lo contrario, todos los porcentajes son referidos al peso total de todos los ingredientes que forman las masas o formulaciones, excepto para las inclusiones tales como productos de confitería o trocitos o pedacitos de sabores, nueces, pasas y lo similar. De esta manera, "el peso de la masa" no incluye el peso de las inclusiones, sino que "el peso total de la masa" incluye el peso de las inclusiones.

Los ingredientes compatibles con el proceso, que se pueden usar para modificar la textura de los productos producidos, incluyen azúcares, tales como sacarosa, fructosa, lactosa, dextrosa, galactosa, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz, hidrolizados de almidón hidrogenado, hidrolizados de proteínas, jarabe de glucosa, mezclas de los mismos y lo similar. Los azúcares reductores, como la fructosa, maltosa, lactosa, y dextrosa, o mezclas de azúcares reductores, pueden utilizarse para favorecer el acaramelado. Ejemplos de fuentes de fructosa incluyen jarabe invertido, jarabe de maíz de alto contenido en fructosa, melazas, azúcar moreno, jarabe de arce, mezclas de los mismos y lo similar.

El ingrediente texturizante, como el azúcar, puede mezclarse con los demás ingredientes sea en forma sólida o cristalina, como sacarosa cristalina o granulada, azúcar moreno granulada, o fructosa cristalina, o en forma

líquida, como jarabe de sacarosa o jarabe de maíz de alto contenido en fructosa. Pueden utilizarse azúcares humectantes, tales como el jarabe de maíz de alto contenido en fructosa, la maltosa, la sorbosa, la galactosa, el jarabe de maíz, el jarabe de glucosa, el jarabe de azúcar invertido, la miel, la melaza, la fructosa, la lactosa, la dextrosa, y mezclas de los mismos, para facilitar la masticación del producto horneado.

5 Además de los azúcares humectantes, también pueden emplearse en la masa otros humectantes, o soluciones acuosas de humectantes que no son azúcares o que poseen un bajo grado de dulzor con respecto a la sacarosa, pueden también emplearse en la masa o pasta. Por ejemplo, pueden utilizarse como humectantes el glicerol, azúcares-alcoholes como manitol, maltitol, xilitol y sorbitol, y otros polioles. Ejemplos adicionales de polioles humectantes (es decir, alcoholes polihídricos) incluyen glicoles, por ejemplo, propilenglicol y jarabes de glucosa hidrogenada. Otros humectantes incluyen ésteres de azúcar, dextrinas, hidrolizados de almidón hidrogenado, y otros productos de la hidrólisis del almidón.

10 El contenido total de sólidos azucarados, o el contenido de ingredientes texturizantes, tales como de las masas producidas, puede variar desde cero a aproximadamente 50 % en peso, con respecto al peso de la masa, sin incluir el peso de las inclusiones.

15 Los sólidos azucarados pueden sustituirse total o parcialmente por un sustituto de azúcar convencional o un agente de carga convencional, tal como povidex, holocelulosa, celulosa microcristalina, mezclas de las mismas y lo similar. La povidex es un sustituto de azúcar o agente de carga preferido para preparar productos horneados con una baja cantidad de calorías. Las cantidades de sustitución ilustrativas pueden ser al menos aproximadamente 25 % en peso, por ejemplo, al menos aproximadamente 40 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 50 % en peso a aproximadamente 75 % en peso, del contenido original de sólidos azucarados.

20 La cantidad del sustituto de azúcar convencional, el agente de carga convencional, o sustituto de harina convencional, tal como povidex, puede ser de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 35 % en peso, por ejemplo de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 25 % en peso, con respecto al peso de la masa, sin incluir el peso de las inclusiones.

25 El contenido de humedad de las masas debería ser suficiente para proporcionar la consistencia deseada como para posibilitar una conformación, maquinado y corte adecuados de la masa. El contenido total de humedad de las masas incluirá el agua incluida como ingrediente añadido por separado, así como la humedad proporcionada por la harina (que normalmente contiene de aproximadamente 12 % a aproximadamente 14 % en peso de humedad), y el contenido de humedad de cualquier agente de carga o sustituto de harina tal como un ingrediente resistente de almidón de tipo III, y el contenido de humedad de otros aditivos de la masa incluidos en la formulación, como jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, jarabes de azúcar invertido, u otros humectantes líquidos.

30 Teniendo en cuenta todas las fuentes de humedad en la masa o pasta, incluyendo el agua añadida por separado, el contenido de humedad total de las masas o pastas que se puede usar es generalmente inferior a aproximadamente 50 % en peso, preferiblemente inferior a aproximadamente 35 % en peso, basándose en el peso de la masa o pasta, sin incluir el peso de las inclusiones. Por ejemplo, las masas de galletas empleadas pueden tener un contenido de humedad inferior a aproximadamente 30 % en peso, generalmente de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, basándose en el peso de la masa, sin incluir el peso de las inclusiones.

35 Las composiciones oleaginosas que pueden utilizarse para obtener las masas y los productos horneados pueden incluir cualquier manteca o mezclas o composiciones de grasa conocidas, útiles para aplicaciones de horneado, tales como manteca, y pueden incluir emulsionantes convencionales de calidad alimentaria. Los aceites vegetales, manteca de cerdo, aceites de animales marinos, y mezclas de los mismos que están fraccionados, parcialmente hidrogenados, y/o interesterificados, son ejemplos ilustrativos de las mantecas o grasas que pueden utilizarse. También pueden utilizarse grasas comestibles con calorías reducidas o bajas, parcialmente digeribles o no digeribles, sustitutas de grasa o grasas sintéticas tales como poliésteres de sacarosa o triacilglicéridos que sean compatibles con el proceso. Pueden utilizarse mezclas de grasas y mantecas y aceites duros o blandos para lograr una consistencia deseada o un perfil de fusión en la composición oleaginosa. Ejemplos de triglicéridos comestibles que pueden utilizarse para obtener las composiciones oleaginosas para usar incluyen triglicéridos naturales derivados de fuentes vegetales tales como el aceite de soja, aceite de palmiste, aceite de palma, aceite de colza, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de semilla de girasol y mezclas de los mismos. También pueden utilizarse aceites de origen marino y animal como el aceite de sardina, aceite de menhaden, aceite de babasu, manteca de cerdo, y sebo. También pueden utilizarse triglicéridos sintéticos, así como triglicéridos naturales de ácidos grasos, para obtener la composición oleaginosa. Los ácidos grasos pueden tener una longitud de cadena de 8 a 24 átomos de carbono. Pueden utilizarse mantecas o grasas sólidas o semisólidas a temperaturas ambiente, por ejemplo, de aproximadamente 75 °F a aproximadamente 95 °F. Las composiciones oleaginosas preferidas comprenden aceite de soja. En realizaciones, la masa puede incluir hasta aproximadamente 30 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 25 % en peso de al menos un aceite o grasa, basándose en el peso de la masa.

60 Los artículos horneados que pueden producirse incluyen artículos horneados bajos en calorías que también son productos de contenido reducido en grasa, de bajo contenido en grasas o sin grasa. Tal como se usan en la

- 5 presente memoria, un producto alimenticio de contenido reducido en grasas es un producto con su contenido graso reducido en al menos 25 % en peso respecto al producto estándar o convencional. Un producto bajo en grasa tiene un contenido graso inferior a, o igual a, tres gramos de grasa por cantidad de referencia o porción de la etiqueta. Sin embargo, para cantidades pequeñas de referencia (es decir, cantidades de referencia de 30
- 10 gramos o menos o dos cucharadas o menos), un producto bajo en grasa tiene un contenido en grasa inferior o igual a 3 gramos por 50 gramos de producto. Un producto sin grasa o de cero grasas tiene un contenido graso de menos de 0,5 gramos de grasa por cantidad de referencia y por porción de la etiqueta. Para galletas saladas de acompañamiento, como una galletita salada, la cantidad de referencia es de 15 gramos. Para las galletas saladas utilizadas como snacks y para las galletas, la cantidad de referencia es de 30 gramos. Por tanto, el contenido
- 15 graso de una galleta o galleta salada de bajo contenido en grasa podría ser inferior o igual a 3 gramos de grasa por 50 gramos, o inferior o igual a aproximadamente 6 % de grasa, con respecto al peso total del producto final. Una galleta salada de acompañamiento no grasa tendría un contenido en grasa inferior a 0,5 gramos por 15 gramos o inferior a aproximadamente 3,33 %, con respecto al peso del producto final.
- 20 Además de lo anterior, las masas pueden incluir otros aditivos empleados de forma convencional en galletas saladas y galletas. Dichos aditivos pueden incluir, por ejemplo, subproductos lácteos, huevo o subproductos del huevo, cacao, vainilla u otros saborizantes, en cantidades convencionales.
- 25 Puede incluirse una fuente de proteína, adecuada para la inclusión en productos horneados, en las masas empleadas para promover el oscurecimiento por la reacción de Maillard. La fuente de proteína puede incluir sólidos de leche en polvo desnatada, huevo seco o en polvo, mezclas de los mismos, y similares. La cantidad de la fuente de proteínas puede ser, por ejemplo, de hasta aproximadamente 5 % en peso, con respecto al peso de la masa, sin incluir el peso de las inclusiones.
- 30 Las composiciones de masa pueden contener hasta aproximadamente 5 % en peso de un sistema de fermentación, con respecto al peso de la masa, sin incluir inclusiones. Ejemplos de agentes de fermentación químicos o de agentes de ajuste del pH que pueden utilizarse incluyen materiales alcalinos y materiales ácidos como el bicarbonato de sodio, el bicarbonato amónico, el fosfato ácido de calcio, el pirofosfato ácido de sodio, el fosfato diamónico, el ácido tartárico, mezclas de los mismos y lo similar. La levadura puede utilizarse sola o en combinación con agentes químicos de fermentación.
- 35 Las masas empleadas pueden incluir antimicóticos o conservantes, tales como el propionato de calcio, el sorbato de potasio, el ácido sórbico, y lo similar. Las cantidades ilustrativas, para asegurar la autoestabilidad microbiana, pueden variar hasta aproximadamente 1 % en peso de la masa, sin incluir el peso de las inclusiones.
- 40 Pueden incluirse emulsionantes en cantidades eficaces y emulsionantes en las masas. Los emulsionantes ilustrativos que pueden utilizarse incluyen, monoglicéridos y diglicéridos, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán, lecitina, estearoil-lactilatos, y mezclas de los mismos. Ejemplos ilustrativos de los ésteres de ácido graso de polioxietilén sorbitán que pueden utilizarse son polisorbato hidrosolubles tales como el monoestearato de polioxietilén (20) sorbitán (polisorbato 60), mono-oleato de polioxietilén (20) sorbitán (polisorbato 80), y mezclas de los mismos. Ejemplos de
- 45 lecitinas naturales que pueden utilizarse incluyen las derivadas de plantas como la soja, la colza, el girasol, o el maíz, y las derivadas de fuentes animales como la yema de huevo. Se prefieren las lecitinas derivadas del aceite de soja. Ejemplos de los estearoil lactilatos son los estearoil lactilatos alcalinos y alcalinotérreos como el estearoil lactilato de sodio, el estearoil lactilato de calcio, y mezclas de los mismos. Las cantidades ilustrativas del emulsionante que pueden utilizarse varían hasta aproximadamente 3 % en peso de la masa, sin incluir el peso de las inclusiones.
- 50 Se puede llevar a cabo la producción de las masas utilizando técnicas y equipo de mezclado de masas convencionales utilizados en la producción de masas de galletas y galletas saladas.
- 55 Aunque los tiempos y temperaturas de horneado variarán para diferentes masas o formulaciones de pasta, tipos de hornos, etc., en general, los tiempos de horneado para galletas comerciales, brownies y tartas pueden estar comprendidos de aproximadamente 2,5 minutos a aproximadamente 15 minutos, y las temperaturas de horneado pueden estar comprendidas de aproximadamente 250 °F (121 °C) a aproximadamente 600 °F (315 °C).
- 60 Los productos horneados pueden tener una presión de vapor relativa (“actividad de agua”) inferior a aproximadamente 0,7, preferiblemente inferior a aproximadamente 0,6 para una autoestabilidad microbiana exenta de conservantes. Los productos de galletas, brownies y tartas tienen generalmente un contenido de humedad inferior a aproximadamente 20 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 9 % en peso para las galletas, basándose en el peso del producto horneado, exclusivo de inclusiones.
- 65 Por ejemplo, una masa para producir una galleta salada estable de larga duración o galleta, tal como una galleta salada Graham puede incluir de aproximadamente 40 % en peso a aproximadamente 65 % en peso de una harina de trigo integral estabilizada, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 25 % en peso de al menos un azúcar tal como sacarosa, de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 25 % en peso de al menos un aceite o grasa tal como aceite vegetal o manteca, de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 10 % en peso de al menos un azúcar humectante tal como jarabe de maíz con un alto contenido en fructosa y miel, de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 1 % en peso de una fuente de proteínas tal como sólidos lácteos desnatados, de

aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 1 % en peso de un saborizante, tal como sal, de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 1,5 % en peso de agentes de fermentación, tales como bicarbonato de amonio y bicarbonato de sodio, y de aproximadamente 8 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de agua añadida, donde cada porcentaje en peso se basa en el peso de la masa, y los porcentajes en peso suman hasta 100 % en peso.

5 La harina integral estabilizada y los productos horneados que contienen la harina integral estabilizada pueden contener la misma o sustancialmente la misma cantidad de inhibidor de lipasa, tal como ácido láctico, como se usa para producir la harina integral estabilizada.

10 Propiedades de la harina

El uso de un inhibidor de lipasa, tal como ácido láctico, en cantidades de 1 mol a 5 moles por 45,36 kg (100 %) de granos enteros, por ejemplo, al menos aproximadamente 3.000 ppm de ácido láctico, basado en el peso de los granos enteros, durante el tratamiento o hidratación en la producción de harina integral estabilizada, proporciona

- 15 harinas integrales estabilizadas con:
- a) una mayor frescura superior medida por los free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) y/o el hexanal formado en la harina durante el almacenamiento,
  - b) propiedades sensoriales superiores, tales como menor olor a harina cruda formado en la harina durante el almacenamiento, y
  - 20 c) una estabilidad microbiana superior medida mediante recuentos de esporas, cada una en comparación con harinas integrales producidas sin tratamiento de estabilización o utilizando estabilización térmica solo, sin el uso de un inhibidor de lipasa.

25 Las harinas de trigo integrales estabilizadas pueden presentar un contenido de hexanal inesperadamente bajo inferior a aproximadamente 200 ppm, preferiblemente inferior a aproximadamente 100 ppm, con máxima preferencia, inferior a aproximadamente 10 ppm tras un mes de almacenamiento acelerado a 95 °C basándose en el peso de la harina integral estabilizada.

30 También, el olor de harina cruda formado en la harina durante el almacenamiento, por ejemplo durante 58 días de almacenamiento en condiciones aceleradas a 33,3 °C (92 °F), puede reducirse con respecto a un control producido sin tratamiento de estabilización o estabilización térmica solamente, en al menos 3 %, por ejemplo al menos 5 %, preferiblemente al menos 7 %, con máxima preferencia al menos 10 %, con respecto a la evaluación sensorial por un panel experto del gusto utilizando una escala de puntuación de 1 a 100 o donde una puntuación de 1 tiene la intensidad más baja, y una puntuación de 100 tiene la mayor intensidad de aroma de harina,

35 reminiscente de una harina blanca que se ha abierto. El porcentaje o puntuación de reducción puede depender de las condiciones de tratamiento tales como el nivel de hidratación de salvado y el nivel del inhibidor de lipasa. Por ejemplo, las harinas integrales estabilizadas pueden tener una puntuación inferior o igual a 9, en una escala de 1 a 100, dependiendo de las condiciones de tratamiento, tales como el nivel de hidratación del salvado y el nivel del inhibidor de lipasa, tal como ácido láctico, en comparación con una puntuación de control superior a 9,5.

40 Además, el uso del inhibidor de lipasa, tal como un ácido orgánico, en la producción de una harina integral estabilizada permite reducir las esporas resistentes al calor en al menos aproximadamente 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente 75 %, con máxima preferencia al menos aproximadamente 90 % en comparación con las harinas integrales producidas sin tratamiento de estabilización o producidas utilizando estabilización térmica

45 solamente. Por ejemplo, la harina integral estabilizada con inhibidor de lipasa puede dar un Aerobic Plate Count (Recuento aerobio en placa - APC) inferior a aproximadamente 150 UFC/g, preferiblemente inferior a 100 UFC/g, con máxima preferencia inferior a 75 UFC/g, y un conteo de esporas resistentes al calor inferior a aproximadamente 75 UFC/g, preferiblemente inferior a 50 UFC/g, con máxima preferencia inferior a aproximadamente 10 UFC/g.

50 Atributos sensoriales de los productos horneados

Además, los productos horneados, tales como galletas, producidos utilizando la harina integral estabilizada, inhibida con lipasa, envejecida, presentan una mayor retención de sabor y otras propiedades sensoriales, tales como retrogusto y efecto a posteriori en comparación con los de productos horneados o muestras de control que

55 contienen la misma composición pero están hechos con harina integral producida sin tratamiento de estabilización o producida utilizando estabilización térmica solamente, sin el uso de un inhibidor de lipasa.

Por ejemplo, las propiedades sensoriales de los productos horneados, tales como las propiedades sensoriales positivas de sabor dulce, sabor a canela, retrogusto tostado horneado, retrogusto a vainilla, y retrogusto a miel para una galleta salada Graham pueden verse aumentadas, y las propiedades sensoriales negativas de adhesión a los dientes después del efecto y la cantidad de partículas después del efecto pueden verse disminuidas, en comparación con un control producido sin

60 tratamiento de estabilización o utilizando tratamiento de estabilización solamente, en al menos 3 %, por ejemplo, al menos 5 %, preferiblemente al menos 7 %, con máxima preferencia al menos 10 %, conforme a la evaluación sensorial realizada por un panel de expertos del gusto utilizando una escala de 1 a 100, donde una puntuación de 1 tiene la intensidad más baja, y una puntuación de 100 tiene la intensidad más alta de la propiedad tal como sabor dulce, sabor a canela, etc. El

65

porcentaje de aumento o el porcentaje de reducción, o la puntuación pueden depender de las condiciones de tratamiento, tales como el nivel de hidratación del salvado y el nivel del inhibidor de lipasa.

Además, los productos horneados, tales como las galletas, producidos con las harinas integrales estabilizadas pueden tener una puntuación superior a 31 para la propiedad positiva de sabor dulce, en una escala de 1 a 100, dependiendo de las condiciones de tratamiento, tales como el nivel de hidratación del salvado y el nivel del inhibidor de lipasa, tal como ácido láctico, en comparación con una puntuación de control inferior a 30 para una muestra de control preparada con harina integral producida sin tratamiento de estabilización o producida utilizando solamente estabilización térmica, sin el uso de un inhibidor de lipasa. También, en una escala de 1 a 100, el producto horneado puede tener una puntuación para los atributos sensoriales positivos de sabor a canela de más de 10, retrogusto tostado horneado superior a 31,5, retrogusto de vainilla superior a 17,5, y retrogusto de miel superior a 23,6, y una puntuación para las propiedades sensoriales negativas de adhesión a los dientes tras el efecto inferior a 52, y una cantidad de partículas tras el efecto inferior a 36.

Los atributos sensoriales ilustrativos que se pueden evaluar para mostrar mejoras similares incluyen categorías tales como aroma, aspecto, tacto, textura/sensación en boca, sabor, y regusto/secuela. Los ejemplos de atributos sensoriales específicos comprendidos en estas categorías que se pueden evaluar son:

- a) **Aroma:** propiedades dulce, de vainilla, melaza, arce, miel, horneado/tostado, harina, canela, trigo, salvado y de cartón;
- b) **Aspecto:** color marrón, color no uniforme, partículas visibles y propiedades de contraste opuesto;
- c) **Tacto:** propiedades de rugosidad de superficie (parte superior), superficie irregular (parte superior), superficie irregular (inferior), recubrimiento en polvo, difícil de romper, presión, ruptura limpia, migas, cantidad de capas y densidad;
- d) **Textura/Sensación en boca:** propiedades de dureza inicial al mordisco, mordisco inicial crujiente, crocante, desmenuzable, seco, cantidad de partículas, tamaño de partículas, solidificado, velocidad de disolución, se pega a los dientes, recubrimiento en boca y de secado de boca;
- e) **Sabor:** propiedades de horneado/tostado, trigo, salvado, dulce, amargo, sal, vainilla, harina, canela, miel, melaza, arce y de cartón; y
- f) **Regusto/Secuela:** propiedades de horneado/tostado, trigo, salvado, dulce, amargo, vainilla, canela, miel, melaza, se pega a los dientes, cantidad de partículas, secado de boca, recubrimiento bucal, salivación, metálico y perdurable.

La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos no limitativos, donde todas las partes, porcentajes; y relaciones son en peso, todas las temperaturas están en °C, y todas las temperaturas son atmosféricas a menos que se indique lo contrario:

Ejemplo 1

Parte A. Acidificación de trigo integral

El objetivo de este ejemplo es describir cómo las semillas de trigo rojo blando se atemperan con agua que contiene ácido con el fin de producir una harina integral no blanqueada con un pH reducido. La humedad del trigo inicial de 13,05 %, aumenta hasta una humedad de semilla final de 14,0 %, añadiendo agua al trigo a temperatura ambiente y manteniendo el trigo durante 8 minutos. La cantidad de agua añadida se calcula según la tabla 1.

Tabla 1

| Cantidad de trigo (g) | humedad de semilla | Peso seco (g) | Humedad total necesaria a 14 % | Humedad añadida (g) | Humedad final deseada |
|-----------------------|--------------------|---------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------|
| 800                   | 12,00 %            | 704,0         | 114,60                         | 18,60               | 14,00 %               |
| 800                   | 13,05 %            | 695,6         | 113,24                         | 8,84                | 14,00 %               |
| 800                   | 13,50 %            | 692,0         | 112,65                         | 4,65                | 14,00 %               |

Procedimiento

La muestra de trigo limpia (800 g) se pesa en un frasco de plástico hermético al aire mezclada con la correspondiente cantidad de agua de atemperado que contiene una cantidad específica de ácido como se muestra en la Tabla 2. El trigo se atempera durante 8 horas a temperatura ambiente. Por ejemplo, para alcanzar una concentración de ácido láctico de 850 ppm en 800 g de trigo, se añaden 0,80 g de solución de ácido láctico al 85 % a 7,88 g de agua corriente. Una vez añadida agua de atemperado con ácido al trigo, el frasco se selló, se agitó manualmente durante 1 min cada 10 min 6 veces, después se dejó reposar durante la noche.

La Tabla 2 muestra los tres tipos diferentes de ácidos, láctico, fosfórico y clorhídrico, utilizados en este ejemplo. La tabla muestra (1) peso de trigo (2) humedad inicial de trigo (3) peso seco de trigo (4) cantidad de cada solución ácida añadida (5) cantidad de ácido expresada en peso seco (dwb) (6) cantidad de agua de atemperado necesaria (7) agua total (agua de atemperado + agua de la solución ácida) añadida para acondicionar la semilla de trigo (8) cantidad de ácido (dwb) añadida al trigo expresada en partes por millón (ppm) (9) humedad de semilla atemperada. Las muestras de la invención contienen una cantidad del inhibidor durante el tratamiento, que es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por cada 45,36 kg (100 libras) de granos enteros.

Tabla 2: Atemperado del trigo con diferentes cantidades y tipos de ácido

| Dosificación de ácido       | Salvado de trigo (g) | Humedad de semilla | Peso seco (g) | 85 % de ácido láctico (g) | 85 % de ácido fosfórico (g) | 37 % de ácido clorhídrico (g) | Ácido añadido (g) (dwb) | Agua añadida (g) | Agua total (g) | Cantidad de ácido (ácido peso seco / peso semilla inicial) ppm | [Conc ácido] M | Ácido (moles/ 45,4 kg (100 libras) semillas) | Humedad semilla atemperada |
|-----------------------------|----------------------|--------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------|----------------|--|----------------|--|----------------------------|
| Control                     | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 0,00                      | 0,00                        | 0,00                          | 0,00                    | 8,00             | 8,00           | 0,00   | 0,00           | 0,00   | 13,91 %                    |
| 0,8 g de ácido láctico 85 % | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 0,80                      | 0,00                        | 0,00                          | 0,68                    | 7,88             | 8,00           | 850  | 0,94           | 0,4289                                       | 13,91 %                    |
| 4 g ácido láctico 85 %      | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 4,00                      | 0,00                        | 0,00                          | 3,40                    | 7,40             | 8,00           | 4.250  | 4,72           | 2,1446                                       | 13,91 %                    |
| 8 g ácido láctico 85 %      | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 8,00                      | 0,00                        | 0,00                          | 6,80                    | 6,80             | 8,00           | 8.500  | 9,44           | 4,2891                                       | 13,91 %                    |
| 5,65 g ácido láctico 85 %   | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 5,68                      | 0,00                        | 0,00                          | 4,83                    | 7,15             | 8,00           | 6.038  | 6,66           | 3,0465                                       | 13,91 %                    |
| 9,41 g ácido láctico 85 %   | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 9,41                      | 0,00                        | 0,00                          | 8,00                    | 6,59             | 8,00           | 10.000   | 11,10          | 5,0460                                       | 13,91 %                    |
| 0,8 g ácido fosfórico 85 %  | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 0,00                      | 0,80                        | 0,00                          | 0,68                    | 7,88             | 8,00           | 850  | 0,87           | 0,3942                                       | 13,91 %                    |
| 2,32 g ácido fosfórico 85 % | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 0,00                      | 2,32                        | 0,00                          | 1,97                    | 7,65             | 8,00           | 2.463  | 2,52           | 1,1422                                       | 13,91 %                    |
| 6,5 g ácido fosfórico 85 %  | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 0,00                      | 6,50                        | 0,00                          | 5,53                    | 7,03             | 8,00           | 6.913  | 7,05           | 3,2062                                       | 13,91 %                    |
| 0,8 g HCl 37 %              | 800,00               | 13,05 %            | 695,60        | 0,00                      | 0,00                        | 0,80                          | 0,30                    | 7,46             | 7,96           | 375  | 1,03           | 0,3129                                       | 13,91 %                    |
| 4 g HCl 37 %                | 800                  | 13,05 %            | 695,6         | 0                         | 0                           | 4                             | 1,48                    | 5,32             | 7,84           | 1850   | 5,18           | 1,5435                                       | 13,89 %                    |
| 6,5 g HCl 37 %              | 800                  | 13,05 %            | 695,6         | 0                         | 0                           | 6,5                           | 2,41                    | 3,645            | 7,74           | 3006   | 8,54           | 2,5080                                       | 13,88 %                    |

Se añade ácido en agua a un lote de 800 g de semillas de trigo:

5  $[\text{Ácido láctico, peso seco (ppm o } \mu\text{g/g de trigo)}] \times 800 = \text{peso seco total de ácido};$

Peso seco total de ácido/peso molecular ácido láctico = moles ácido;

% agua \* 800 g de trigo = agua total (g)/volumen equivalente (1 ml);

agua (ml)/1.000 = agua total (l);

[conc. ácido] = moles de ácido/litro agua = concentración molar (M);

10  $[\text{ácido añadido (dwb), g por millón g semilla} / \text{peso molecular del ácido, g}] = \text{moles de ácido por g de semilla};$   
 $\text{moles de ácido por g de semilla} / 0,0022 \text{ lb/g} = \text{“Ácido (moles por libra)} * 100 = \text{“Ácido (moles por 100 libras)}$

Parte B. Molienda de trigo

15 El objetivo de este procedimiento fue producir harina integral a partir de semillas de trigo atemperadas como se ha descrito en la parte A.

Procedimiento

20 Las muestras de trigo atemperadas se molieron con un molino de laboratorio Chopin CD1 (Chopin, Francia) que consistía en dos unidades. La primera unidad era un molino de rodillos que consistía en dos rodillos de ruptura y la segunda unidad era un rodillo de molienda suave para reducción. Se obtienen tres fracciones principales a partir de los rodillos de ruptura de la primera unidad: sémola de harina gruesa en la bandeja colectora del lado derecho; harina de ruptura en la bandeja colectora del lado izquierdo y salvado grueso. La sémola se procesa a través del rodillo de reducción de lo cual se obtienen dos fracciones; parte retenida de reducción; y reducción de harina.

30 La Tabla 3 muestra el rendimiento de extracción de la harina. El rendimiento se calculó en base al trigo molido. Se calculó el rendimiento de la harina como  $\text{rendimiento} = 100 \times [(\text{Peso salvado grueso y fino} + \text{peso partes retenidas}) / \text{peso trigo}]$ , en este estudio: Las muestras de la invención contienen una cantidad del inhibidor durante el tratamiento, que es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por cada 45,36 kg (100 libras) de granos enteros.

Tabla 3 Rendimiento de extracción de harina

| Dosificación de ácido       | Cantidad de ácido (ácido peso seco/peso semilla inicial) | Humedad de semilla atemperada | Extracción total de harina de ruptura (%) |
|-----------------------------|--|-------------------------------|---|
| Control                     | 0 ppm  | 13,91 %                       | 67,16                                     |
| 0,8 g de ácido láctico 85 % | 850 ppm  | 13,91 %                       | 67,47                                     |
| 4 g de ácido láctico 85 %   | 4250 ppm   | 13,91 %                       | 68,01                                     |
| 8 g de ácido láctico 85 %   | 8500 ppm   | 13,91 %                       | 63,72                                     |

|                                 |           |         |       |
|---------------------------------|-----------|---------|-------|
| 5,65 g de ácido láctico 85 %    | 6000 ppm  | 13,91 % | 68,39 |
| 9,41 g de ácido láctico 85 %    | 10008 ppm | 13,91 % | 67,11 |
|                                 |           |         |       |
| 0,8 g de ácido fosfórico 85 %   | 850 ppm   | 13,91 % | 67,42 |
| 2,32 g de ácido fosfórico 85 %  | 2466 ppm  | 13,91 % | 67,37 |
| 6,5 g de ácido fosfórico 85 %   | 6906 ppm  | 13,91 % | 67,98 |
|                                 |           |         |       |
| 0,8 g de ácido clorhídrico 37 % | 370 ppm   | 13,91 % | 67,16 |
| 4 g de ácido clorhídrico 37 %   | 1850 ppm  | 13,89 % | 68,13 |
| 6,5 g de ácido clorhídrico 37 % | 3006 ppm  | 13,88 % | 67,99 |

## Resumen

5 Las semillas de trigo se atemperaron con agua que contenía diferentes tipos y cantidades de ácido. La humedad añadida se ajustó de acuerdo con la humedad de la semilla de trigo inicial de manera que la humedad de la semilla final, después del atemperado, fue de 14 %, lo cual se considera un intervalo preferido de humedad para la molienda de trigo. Se ajustó el ácido añadido al agua de atemperado para analizar intervalos de 370 ppm a 10.000 ppm (peso seco de ácido por peso inicial de trigo). Se observó un comportamiento de molienda normal para todos los tipos y cantidades de tratamientos con ácido. El rendimiento de extracción de harina fue, de forma típica, de aproximadamente 67 % a 68 % y todas las fracciones de molienda se recombinaron para formar harina integral con proporciones naturales de salvado, germen y endosperma.

## Ejemplo 2

15 Producción de salvado molido grueso a partir de semillas tratadas con ácido y recombinación a harina integral

El objetivo de este procedimiento era reducir el tamaño de partículas de la fracción gruesa de salvado y partes retenidas de reducción obtenidas a partir de la molienda del trigo tratado con ácido. El salvado grueso del primer rodillo de ruptura y las partes retenidas gruesas del rodillo de reducción se congelaron con nitrógeno líquido en el frasco sellado, después se molieron con un molino de laboratorio Perten 3.100 (Perten, Suecia), velocidad de rotación de martillo configurada a 16.800 rpm, abertura del tamiz de 0,5 mm. Después del triturado, el material triturado grueso se recombinó con fracciones de harina restantes (harina de ruptura + harina de reducción) para formar harina integral. Se determinó la distribución de tamaño de partículas de la harina integral utilizando un Roto Tap. El método es aplicable a una amplia variedad de productos e ingredientes que utilizan una acción mecánica uniforme para asegurar resultados precisos y confiables. El agitador reproduce el movimiento circular y de golpeteo utilizado en el tamizado manual. El método se adaptó a partir del método del agitador RoTap ASTA 10.0 con las siguientes modificaciones y adaptaciones:

## Aparato

El aparato empleado fue:

- 30 1. Un agitador de tamiz de ensayo eléctrico Tyler RoTap (Fisher Scientific), con temporizador automático.
2. Tamices normalizados U.S. n.º 20, n.º 35, n.º 40, n.º 50, n.º 60, n.º 80, n.º 100, bandeja separadora inferior, y cubierta.
3. Ajuste de peso, precisión a 0,1 g.
4. Cepillos para limpiar tamices.
- 35 5. Adyuvante del flujo de polvo de silicio (Syloid n.º 244, W.R. Grace & Co.).

## Procedimiento

El procedimiento empleado fue:

- 40 1. Utilizar tamices tarados limpios, secados vigorosamente.
2. Pesar de forma precisa el tamaño designado de muestra (lo más próximo a 0,1 g) en un vaso de precipitados de 250 ml o 400 ml.
3. Tarar los tamices adecuados y la bandeja inferior individualmente.
4. Apilar los tamices sobre el agitador con la abertura más gruesa en la parte superior y aumentar la finura hasta que la apertura más fina esté en la parte inferior. Colocar la bandeja inferior debajo.
- 45 5. Transferir la muestra cuantitativamente desde el vaso de precipitados al tamiz superior.
6. Colocar la cubierta del tamiz sobre la parte superior, a continuación la placa del agitador, el marco circular y bajar el brazo del grifo.
7. Ajustar el temporizador a 5 minutos.
- 50 8. Tras la finalización de la agitación, retirar los tamices del RoTap y pesar cuidadosamente cada tamiz y la bandeja por separado.

## Cálculos

Los cálculos empleados fueron:

1. Utilizando un tamiz

a)  $\% \text{ sobre} = \frac{\text{peso de tamiz} + \text{material} - \text{peso del tamiz}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$

5 b.  $\% \text{ a trav.} = 100 - \% \text{ sobre}$

2. Utilizando tres tamices o más

Tamiz A ( $S_a$ ), grueso, superior

Tamiz B ( $S_b$ ), medio, intermedio

10 Tamiz C ( $S_c$ ), fino, inferior

etc.

a.  $\% \text{ sobre}_a = \frac{\text{peso de } S_a + \text{material} - \text{peso de } S_a}{\text{peso de la muestra}} \times 100$

15 b.  $\% \text{ sobre}_b = \frac{\text{peso de } S_b + \text{material} - \text{peso de } S_b}{\text{peso de la muestra}} \times 100$

20 c.  $\% \text{ sobre}_c = \frac{\text{peso de } S_c + \text{material} - \text{peso de } S_c}{\text{peso de la muestra}} \times 100$

3. La cantidad de adyuvante de flujo de polvo de silicio añadido a la muestra debe sustraerse del peso en la bandeja antes de hacer el anterior cálculo.

25 4. La suma de los porcentajes de todos los tamices (más la bandeja) debe ser igual o muy aproximada a 100 %

Se midió el pH de la harina integral en una suspensión acuosa al 10 % (una parte de harina a 9 partes de agua) con el uso de un pH-metro Corning 360i equipado con un electrodo de pH de combinación de alto rendimiento A-58905-66. Se determina el nivel de ceniza según el método oficial 923.03 de la AOAC para medir ceniza en harina. La humedad de la harina se determinó según el método AACCC 44-15A.

30 La Tabla 4 muestra las características de harina integral de (1) humedad (2) pH (3) contenido de ceniza y (4) distribución de tamaño de partículas. Las muestras de la invención contienen una cantidad del inhibidor durante el tratamiento que es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por cada 45,36 kg (100 libras) de granos enteros.

35 En el cuadro, los tamaños de malla corresponden a los siguientes tamaños de partículas: la malla 20 es de 850 micrómetros; la malla 35 es de 500 micrómetros; la malla 40 es de 425 micrómetros; la malla 50 es de 300 micrómetros; la malla 60 es de 250 micrómetros; la malla 80 es de 180 micrómetros; la malla 100 es de 150 micrómetros.

Tabla 4. Caracterización de harina integral

| Dosificación de ácido           | Cantidad de ácido peso seco/peso semilla inicial) | pH harina integral | Humedad harina integral | Ceniza (14 % humedad base) | Distribución de tamaño de partículas |                  |                  |                  |                  |                  |                   |                 |       |
|---------------------------------|---|--------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------|-------|
|                                 |   |                    |                         |                            | Malla del n.º 20                     | Malla del n.º 35 | Malla del n.º 40 | Malla del n.º 50 | Malla del n.º 60 | Malla del n.º 80 | Malla del n.º 100 | a través de 100 | Total |
| Control                         | 0 ppm   | 6,65               | 13,95                   | 1,45                       | 0,4                                  | 1                | 1,9              | 5,9              | 8,2              | 13,9             | 17,2              | 51,1            | 99,6  |
| 0,8 g de ácido láctico 85 %     | 850 ppm   | 6,3                | 13,75                   | 1,44                       | 0,2                                  | 1                | 2,1              | 5,6              | 7,6              | 17,9             | 16,7              | 48,8            | 99,9  |
| 4 g de ácido láctico 85 %       | 4250 ppm  | 5,24               | 13,7                    | 1,44                       | 0,1                                  | 1,1              | 1,9              | 5,5              | 6,4              | 16,2             | 16,1              | 51,7            | 99    |
| 8 g de ácido láctico 85 %       | 8500 ppm  | 4,65               | 13,85                   | 1,44                       | 0,3                                  | 0,5              | 1                | 5,1              | 8,9              | 12,8             | 18                | 53              | 99,6  |
| 5,65 g de ácido láctico 85 %    | 6000 ppm  | 4,95               | 13,75                   | 1,45                       | 0,2                                  | 1                | 1,8              | 5,8              | 6,8              | 10,4             | 17,7              | 55,6            | 99,3  |
| 9,41 g de ácido láctico 85 %    | 10000 ppm   | 4,54               | 13,55                   | 1,42                       | 0,3                                  | 1,4              | 2,1              | 5,6              | 7,3              | 13,7             | 16,4              | 53              | 99,8  |
| 0,8 g de ácido fosfórico 85 %   | 850 ppm   | 6,16               | 13,9                    | 1,51                       | 0,2                                  | 0,4              | 0,8              | 4,6              | 9                | 18,6             | 18,4              | 47,9            | 99,9  |
| 2,32 g de ácido fosfórico 85 %  | 2465 ppm  | 5,67               | 13,75                   | 1,6                        | 0,1                                  | 0,5              | 1,6              | 5,5              | 7,9              | 13,6             | 17,2              | 52,3            | 98,7  |
| 6,5 g de ácido fosfórico 85 %   | 6906 ppm  | 4,64               | 13,85                   | 1,92                       | 0,2                                  | 0,6              | 1,2              | 4,8              | 7,7              | 9,9              | 17,1              | 58,2            | 99,7  |
| 0,8 g de ácido clorhídrico 37 % | 370 ppm   | 6,18               | 13,45                   | 1,47                       | 0,1                                  | 1,1              | 1,9              | 5,6              | 7,3              | 15,6             | 16,7              | 51,1            | 99,9  |
| 4 g de ácido clorhídrico 37 %   | 1850 ppm  | 5,07               | 13,85                   | 1,43                       | 0,3                                  | 0,4              | 0,9              | 4,7              | 11,4             | 13,7             | 17,7              | 49,9            | 99    |
| 6,5 g de ácido clorhídrico 37 % | 3006 ppm  | 4,48               | 13,7                    | 1,43                       | 0,1                                  | 0,7              | 1,4              | 5,5              | 7                | 14               | 15,4              | 54,3            | 98,4  |

40

Se determinó la actividad de la lipasa extraíble para cada harina. El método utilizado para determinar la actividad de la lipasa es el siguiente.

A. Aparato

- 5 1. Fluorómetro TD-700 (Diseño de Turner) con filtros de Em 442 y Ex 300 nm
2. Ajuste analítico ( $\pm 0,0001$ )
3. Pipetman, 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l y 5.000  $\mu$ l y puntas para cada una
4. 20 ml viales de vidrio para centelleo con tapones (VWR n.º 66022-060)
- 10 5. Tubos de centrifuga de 50 ml (VWR n.º 20170-170)
6. Centrifuga refrigerada (Beckman Allegro X15R)
7. Matraz volumétrico de 25 y 1000 ml con tapón
8. Vaso de precipitados 1500 ml
9. Varillas de agitación
- 15 10. Mezclador de vórtice
11. Cubetas desechables, 4,5 ml (VWR n.º 58017-875)
12. Tapones para cubetas desechables (VWR n.º 24775-083)
13. Cubeta de hielo aislada (VWR n.º 35751-046)
14. Agitador/vaivén (VWR n.º 14003-580)
- 20 15. Temporizador

B. Reactivos

1. Agua desionizada
- 25 2. Heptanoato de 4-metilumbeliferilo (4-MUH) (Sigma n.º M2514)
3. 2-Metoxietanol (Fluka n.º 64719)
4. Clorhidrato de Trizma (Sigma n.º T-5941)
5. Hidróxido de sodio 1 N (Fisher n.º SS266)
6. Hielo
- 30

C. Soluciones

1. Tampón de ensayo (Tris HCl 0,2 M, pH 7,4)
  - Pesar 31,52 g de clorhidrato de trizma (B-5) en un vaso de precipitados de 1.500 ml (A-8)
  - 35 • Añadir aproximadamente 900 ml de agua desionizada, añadir una barrita agitadora, disolver
  - Ajustar el pH a 7,4 con hidróxido de sodio 1 N
  - Transferir a un matraz aforado de 1.000 ml (A-7) y llevar a volumen con agua desionizada
2. Solución madre de sustrato (4-MUH al 0,5 % en 2- metoxietanol, P/V)
  - Pesar de 0,0720 a 0,0725 g de heptanoato de 4-metilumbeliferilo (B-2) en un vial de 20 ml (A-4)
  - 40 • Añadir 15 ml de 2-metoxietanol (B-3) al vial
  - Someter a vortización para disolver el polvo
  - Almacenar a temperatura ambiente y descartar después de una semana
3. Solución de sustrato de trabajo (0,03 % 4-MUH (P/V) en una solución acuosa de 2-metoxietanol al 6 % (V/V))
  - Retirar una alcuota de 1,5 ml de la solución madre de sustrato (C-2) y pipetear a un matraz aforado de 25 ml (A-7)
  - 45 • Diluir hasta el volumen con agua DI
  - Mezclar vigorosamente.
  - Preparar una solución de sustrato de trabajo reciente a partir de la solución madre de sustrato (C-2) para cada ensayo.
4. Mezclar agua con hielo (Baño de hielo)
- 50 Introducir hielo en una cesta aislada (A-13) y añadir aproximadamente la mitad del volumen de agua fría
5. Soluciones de muestra de harina
  - Enfriar previamente el tampón de ensayo (C-1) en un baño de hielo (C-4)
  - Pesar 0,1 g de muestra (con la mayor aproximación posible a 0,1000 g) en un tubo de centrifuga de 50 ml (A-5)
  - Añadir 20 ml de tampón de ensayo enfriado (C-1)
  - 55 • Someter a vortización para disolver
  - Colocar el tubo horizontalmente en el baño de hielo y agitar lentamente en un agitador (A-14) (configuración n.º 2 de la velocidad, 16 pasadas/min) durante 30 min
  - Muestras de centrifuga a 4750 rpm (A-6), 5 °C durante 10 minutos
  - Utilizar el sobrenadante para el ensayo
  - 60

**D. Calibración del fluorómetro** (Referencia a TD-700 Manual de funcionamiento para calibración, multiopción, procedimiento de fluorescencia en bruto)

- Encender el fluorómetro (espere hasta que aparezca Home Screen)
- 65 • Presionar <ENT> desde la pantalla "HOME" para Setup&Cal
- Seleccionar #2 para Calibration

- Colocar la cubeta que contiene 3000 µl de tampón de ensayo (C-1, temperatura ambiente) en la cámara de muestras
- Presionar <ENT>
- Presionar n.º 1 para OK para ajuste de muestra (Set Sample) = 100 (ajuste por defecto de 100, esperar hasta que quede establecido el factor de sensibilidad (Sensitivity Factor), la lectura debe ser alrededor de 100)
- Presionar <ENT>
- Presionar #9 para No Subtract Blank (volviendo a Home Screen)

#### E. Ensayo de la muestra

- Etiquetar previamente las cubetas (A-11) con la ID de la muestra adecuada
- Añadir 10 µl de solución de sustrato de trabajo (C-3) a la cubeta previamente utilizada para calibrar el instrumento (D-3) como Blanco
- Tapar (A-12) e invertir 5 veces para mezclar
- Colocar la cubeta en el compartimento de muestras en el fluorómetro (A-1)
- Iniciar el temporizador inmediatamente después de cerrar la tapa del fluorómetro y registre
- Lectura de la fluorescence intensity (intensidad de la fluorescencia - FI) a los siguientes intervalos de 0,5, 1, 2, 3, 4, y 5 min. Retirar la cubeta del compartimento de muestras del fluorómetro
- Pipetear 2.950 µl de tampón de ensayo (C-1, temperatura ambiente) a la primera cubeta de muestras etiquetada previamente (E-1)
- Pipetear 50 µl de solución sobrenadante de la primera muestra de harina extraída (C-5)
- Añadir 10 µl de solución de sustrato de trabajo (C-3)
- Repetir la etapa E-3 a E-6 para todas las muestras posteriores inmediatamente

#### F. Cálculos

- Valores FI de la gráfica frente a tiempo de incubación para cada muestra como curva de reacción
- Determinar la pendiente ( $\Delta FI/\text{min}$ ) utilizando la regresión de mínimos cuadrados en la hoja de cálculo Excel en la curva de reacción
- Normalizar  $\Delta FI/\text{min}$  con un peso de la muestra a 0,1000 g como sigue:
- $\Delta FI/\text{min}$  normalizado = Pendiente x (0,1000 g/de peso de muestra en g)
- Indicar la actividad lipasa como  $\Delta FI/\text{min}/0,1$  g

La actividad de la lipasa extraíble para las diversas harinas integrales se muestra en la Figura 3.

#### Resumen y conclusiones

Atemperando las semillas de trigo con ácido que contenía agua, seguido de molienda y recombinación con harina de trigo integral, se obtuvo una harina integral de un pH menor que el del control sin tratar. Todo el trigo mostró un rendimiento de molienda normal. La fracción gruesa se trituró antes de recombinar con harina integral. La distribución de tamaño de partículas de la harina final fue similar entre las variables de prueba, con aproximadamente 15 % del peso de la harina > 250 µm y aproximadamente 50 % a 60 % < 150 µm. El contenido de ceniza es indicativo de la cantidad de material de salvado. El uso de medición de ceniza en molienda de harina se basa en la mayor concentración de ceniza (minerales) en el salvado, aleurona y germen que en el endosperma. El contenido de ceniza es un índice ampliamente utilizado de la pureza de la harina y proporciona un medio para medir la separación mecánica de los componentes de la semilla durante el proceso de molienda. En este caso, la ceniza se usa como un indicador de recombinación completa y reproducible de la fracción molida gruesa con el endosperma de la harina para elaborar harina integral con una proporción natural de salvado, germen y endosperma. El pH de la harina final dependió de la cantidad y tipo de ácido usado para atemperar la semilla entera. La actividad de lipasa extraíble en la harina integral disminuyó en función del pH en el intervalo estudiado (de pH = 6,6 (control no tratado) hasta pH = 4,5).

#### Ejemplo 3

##### Efecto del atemperado con ácido en la estabilidad de la harina integral

El objetivo de este ejemplo fue analizar el efecto de atemperado con ácido en la estabilidad de la harina integral durante el almacenamiento. La cantidad de ácidos grasos libres formados se midió después del almacenamiento de la harina en un frasco de vidrio sellado durante 30 días en condiciones de almacenamiento acelerado de 92 °F.

Se preparó harina integral según el proceso descrito en los ejemplos 1 y 2. Las harinas sometidas a ensayo fueron: (1) harina de trigo rojo blando sin tratar (control); (2) harina de trigo rojo blando tratada con ácido láctico a pH 6,30; (3) harina de trigo rojo blando tratada con ácido láctico a pH 5,24; (4) harina de trigo rojo blando tratada con ácido láctico a pH 4,95; (5) harina de trigo rojo blando tratada con ácido láctico a pH 4,65; (6) harina de trigo rojo blando tratada con ácido láctico a pH 4,54; (7) harina de trigo rojo blando tratada con ácido fosfórico a pH 6,16; (8) harina de trigo rojo blando tratada con ácido fosfórico a pH 5,67; (9) harina de trigo rojo blando tratada con ácido fosfórico a pH 4,64; (10) harina de trigo rojo blando tratada con ácido clorhídrico a pH 6,18; (11) harina de trigo rojo blando tratada

con ácido clorhídrico a pH 5,07; (12) harina de trigo rojo blando tratada con ácido clorhídrico a pH 4,48. Los resultados se compararon con la cantidad de ácidos grasos libres formados en la harina de control sin tratar. Se prepararon harinas integrales con una proporción natural de componente de salvado y endosperma obtenidos a de la molienda de harina. El contenido de ceniza de harina integral se utilizó para confirmar la composición.

5 Se determinó el contenido de ácidos grasos libres de la harina integral (harina fresca y harina envejecida durante 30 días) según el siguiente método:

10 El contenido de ácidos grasos libres de las harinas se adaptó a partir del método expuesto en “Jong, C.: Badings, H. T.; *Journal of High Resolution Chromatography*; 1990; Determination of Free Fatty Acids in Milk and Cheese Procedures for Extraction, Clean up, and Capillary Gas Chromatography Analysis.” Los extractos lipídicos, que contenían ácidos grasos libres, se obtuvieron de los alimentos mediante extracción con disolventes orgánicos acidificados. Los extractos lipídicos anhidros se hacen pasar a través de un cartucho SPE de intercambio aniónico débil para aislar los ácidos grasos libres del material extraído conjuntamente, en particular los glicéridos neutros.

15 El procedimiento es el siguiente:

#### Aparato

- 20 a. Cromatógrafo de gases (GC) ajustado para inyección de columna capilar en columnas de 0,53 mm de diámetro interno con control electrónico de presión (EPC) y detector de ionización de llama (FID), [ejemplo: HP5890 Serie II]
- b. Automuestreador compatible con el CG, [ejemplo: HP7673]
- c. Sistema de *software* capaz de recoger datos de cromatografía, cálculo de estadísticas y tabulación de resultados
- d. Balanza analítica con una resolución de 0,0001 g, una capacidad de 150 g
- 25 e. Centrífuga con capacidad de 3.000 rpm (2050 rcf), con control de temperatura, (opcional)
- f. Polytron capaz de homogeneizar muestras a 25.000 rpm [ejemplo: Brinkmann Instruments, Polytron Kinematica AG modelo PT 1300 D]
- g. Mezclador de vórtice
- h. Dispensadores de disolvente con componentes plásticos inertes [ejemplo: Brinkmann - dos 1-5 ml de capacidad n.º de cat. 2222010-1 y uno 5-25 ml de capacidad n.º de cat. 2222030-6]
- 30 i. Tenaza para viales automuestreadores

#### Suministros

- 35 1. Columna: StabilwaxDA 0,25u, 0,53 mm x 15 m [Restek Corp. n.º 11022]
2. Cartuchos de SPE: Bond Elut NH2, 3 cc, 500 mg, con fritas de acero inoxidable [Parte variante n.º 1212-4038]
3. Tubos de prueba para centrífuga de vidrio con tapones de rosca recubiertos con teflón, tamaño: 16 X 125 mm
4. Tubos de centrífuga de vidrio Corex con tapones de rosca recubiertos con teflón, 45 ml [ejemplo: COREX II n.º 8422-A]
- 40 5. Papel de filtro Whatman n.º 1, 125 mm de diámetro
6. Embudo de filtrado de marca Pyrex, tallo corto
7. Tubos de cultivo desechables, vidrio de borosilicato 16 x 150 mm [ejemplo: VWR n.º de cat. 47729-580]
8. Viales de vidrio con tapones de rosca recubiertos con teflón, 4 ml. [ejemplo: Kimble n.º de cat. 60940A 4]
9. Viales automuestreadores, vidrio de borosilicato, parte superior fruncida con tapones recubiertos con teflón
- 45 10. Frascos de borosilicato ámbar con tapón de rosca recubierto con teflón, 100 ml
11. Frasco de borosilicato transparente con tapón de rosca recubierto con teflón, 250 ml
12. Probetas: 250 ml, 100 ml
13. Matraces volumétricos: 250 ml, 100 ml
14. Pipetas volumétricas de vidrio, clase A 5, 2, 1 ml y graduadas 10, 5 ml
- 50 15. Pipetas Pasteur desechables: 5 3/4 y 9 pulgadas
16. Microespátula, espátula y tubos de transferencia de muestra de polipropileno

#### Reactivos/soluciones

##### 55 Reactivos y patrones

1. Etanol - 200 de prueba, anhidro, 99,5 % +, almacenado en vidrio ámbar [Aldrich n.º 45.983-6 o equivalente]
2. Hexanos, grado GC [B&J n.º 216-4 o equivalente]
3. Iso-propanol, grado GC [B&J n.º 323-4 o equivalente]
- 60 4. Metil-terc-butiléter (MTBE) - grado GC [B&J n.º 242-4 o equivalente]
5. Cloruro de metileno, grado GC [B&J n.º 299-4 o equivalente]
6. Ácido acético - pureza a monitorizar para el nivel de ácido propiónico [Aldrich n.º 32.009-9 o equivalente]
7. Ácido sulfúrico - reactivo ACS, 95,0-98,0 % [reactivo de Fisher ACS n.º A800-500 o equivalente]
8. Agua Tipo 1 [Fisher HPLC n.º W5-4 o equivalente]
- 65 9. Tierra de diatomeas [Leco pieza n.º 502-327 o equivalente]

10. Patrones de > 99,0 % de pureza 3:0; 4:0; 6:0; 8:0; 9:0; 10:0; 11:0; 12:0; 13:0; 14:0; 16:0; 18:0 [ejemplos: 3:0 Aldrich n.º 24.035-4; 4:0 Aldrich n.º B10.350-0; 6:0 Aldrich n.º 15.374-5; 8:0 Aldrich n.º 0-390-7; 9:0 Sigma n.º N-5502; 10:0 Aldrich n.º 15.376-1; 11:0 Sigma n.º U-5503; 12:0 Aldrich n.º 15.378-8; 13:0 Sigma n.º T-0502; 14:0 Aldrich n.º 15-379-6; 16:0 Nu-Check- Prep, Inc.>99 %; 18:0 Nu-Check- Prep, Inc.>99 %]

5

Soluciones a preparar

1. Sulfúrico 2,5 M: Diluir 7 ml de ácido concentrado con agua de tipo 1 a 50 ml volumétricamente.
2. 1:1 (v/v) MTBE: Hexanos
- 10 3. 2:1 (v/v) cloruro de metileno: 2-propanol
4. ácido acético 2 % en MTBE: Diluir 5 ml de ácido concentrado con MBTE a 250 ml volumétricamente.
5. 1:1 (v/v) Hexanos: 2-Propanol, disolvente de aclarado para jeringa entre ciclos
6. Patrones (Preparación de patrones, ver Apéndice 13.1)
  - 15 a. Patrón interno: 11:0; Secundarios: 9:0 y 13:0
  - b. Matriz adicionada (MS) en solución de trabajo estándar en etanol: MS a ~ 50 µg/ml. Este nivel puede ser apropiado para las determinaciones de nivel bajo a medio. Generalmente, los niveles de FFA varían mucho en una matriz determinada. Por consiguiente, puede ser necesaria una solución de adición de cantidades variables por FFA individual por matriz.
  - 20 c. Patrones de calibración en hexanos, establecer intervalo lineal: Intervalo de una columna 1 - 200 µg/g (ppm), patrones de ácidos grasos libres: 3:0, 4:0, 6:0, 8:0, 9:0, patrón secundario, 10:0, 11:0 patrón interno, 12:0, 13:0 patrón secundario, 14:0, 16:0 y 18:0. Comentario: los cálculos de 18:1 y 18:2 se basan en un factor de respuesta 18:0.
  - d. Después, se preparan patrones de calibración en ácido acético 2 % en MTBE, la solución eluyente final: Patrón de calibración n.º 3 a ~ 50 µg/ml preparado en ácido acético 2 %/MTBE actualmente utilizado para crear horquillas de muestra.

25

Muestras de control, blancos, duplicados y adiciones de matriz

Antes de usar un nuevo lote de cartuchos de SPE, debe determinarse la fracción de elución adecuada con un patrón de nivel medio. Se prepara un blanco con cada lote de muestras. Dentro del lote cada estudio contendrá un duplicado. Se realizará una matriz adicionada para todas las matrices nuevas y en casos en que la homogeneidad constituya un problema. Se debe preparar una verificación de calibración inicial (ICV para verificar la correcta preparación de los patrones de calibración. Actualmente, no existen muestras de comprobación apropiadas para este análisis.

Preparación de la muestra y almacenamiento

- 35 a. Almacenamiento inicial de muestra: congelada, refrigerada, o a temperatura ambiente según lo especificado para cada muestra individual.
- b. Las muestras con lipasas activas pueden requerir un manejo especial, tal como la inactivación enzimática.
- c. Muestreo: temperatura ambiente, bien mezclado - homogéneo
- 40 d. Extractos de muestra: soluciones almacenadas en viales recubiertos con teflón tapados herméticamente con tape de rosca, ya sea en una campana bien ventilada o un refrigerador a prueba de explosiones.
- e. Aislados de muestra: el eluyente final es una mezcla de ácido y disolvente orgánico. Estos aislados deben almacenarse en un área de almacenamiento para sustancias inflamables aprobada lejos de toda base.

45 Limpieza de muestra

Procedimiento para la extracción de muestra: Matriz sólida y líquida

Añadir a tubos de ensayo para centrífuga de vidrio de 45 ml en el siguiente orden:

|   |              |                              |
|---|--------------|------------------------------|
| Muestra   | 1,0 - 1,05 g | Registrar el peso ± 0,0001 g |
| Solución estándar de patrón interno de trabajo      | 1,0 ml       | Pipetear                     |
| Etanol  | 1,0 ml       | Pipetear                     |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,5 m                | 0,3 ml       | Pipetear                     |
| Agitar en vórtice para formar una mezcla homogénea. |              |                              |
| Añadir: Tierra de diatomeas <sup>1</sup>            | 4,5 ± 0,1 g  |                              |
| Agitar en vórtice vigorosamente                     |              |                              |
| Equilibrar al menos 10 minutos <sup>2</sup>         |              |                              |
| Añadir 1:1 (v/v) MTBE: Hexanos                      | 15,0 ml      | Dispensador de disolvente    |

50 <sup>1</sup> En los casos de muestras de humedad muy baja (ejemplo - harina) la tierra de diatomeas absorbe demasiada cantidad de los disolventes. Solo en estos casos, se aconseja 3,5 g.

<sup>2</sup> El tiempo mínimo para la interacción de la muestra y la tierra de diatomeas es de 5 minutos. La tierra de diatomeas absorbe agua. La presencia de humedad de la muestra puede dar lugar a resultados no

reproducibles. 3:0 y 4:0 de fácil reparto en la capa de agua. Como valor mínimo se ha establecido diez minutos. Esto proporciona un margen de seguridad para permitir el fin de la interacción.

Proceso de extracción:

5 Polytron: ajuste 24.000 rpm; tiempo: 25 - 45 segundos dependiendo de la solidez de la matriz Precaución: Usar guantes. Aclarar la punta del Polytron con agua caliente, secar con paño, seguido de aclarado con 2-propanol y secar de nuevo la punta con paño. Se pueden utilizar Kimwipes o toallitas de papel desechables. La sonda de Polytron puede requerir aclarados adicionales. Algunos problemas potenciales de los remanentes incluyen alto contenido en grasa, alto contenido de FFA y lipasas activas. El enjuague final antes de las muestras debe ser con 2-propanol. Ver notas 11.4. Después, centrifugar la muestra en vórtice, filtrar el contenido completo del tubo de centrífuga a través de un papel Whatman del n.º1. Recoger el filtrado en tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca de 16 x 125 mm. Opción alternativa: Para maximizar el volumen de sobrenadante, centrifugar a 3.000 rpm durante 30 minutos. Si se elige esta opción, deben tenerse en cuenta las precauciones con respecto a la volatilidad del disolvente. Transferir el sobrenadante a tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca de 16 x 125 mm.

Aislamiento de ácido graso libre

20 Acondicionar el cartucho de SPE con 3 ml de hexanos. En este caso, es apropiado un dispensador de disolvente. En esta etapa se puede añadir disolvente adicional sin ningún efecto negativo, especialmente si los extractos de muestra no están listos para su transferencia en este momento. Los hexanos adicionales evitarán que el cartucho se seque. Llenar el barril del cartucho de SPE con el extracto de muestra. Bastará utilizar una pipeta Pasteur en esta transferencia. El volumen de extracto cargado en el SPE es de aproximadamente 3 ml. Permitir el drenado completo sin secado. Lavar dos veces con 25 2 ml de cloruro de metileno: Solución de 2-propanol para eliminar los glicéridos neutros. Se recomienda un dispensador de disolvente. Dejar drenar por completo. Pipeta 2,5 ml ácido acético 2 % - MTBE. Desechar el eluato. Transferir el cartucho de SPE a viales de recolección de muestras. Pipetear una segunda cantidad de 2,5 ml de ácido acético 2 % - MTBE. Recoger el eluato que contiene FFA en un vial de 4 ml directamente. Mezclar vigorosamente.

30 Los volúmenes de elución para ácidos grasos libres deben verificarse para cada nuevo lote de cartuchos de SPE. Aplicar un ml de un patrón de trabajo de nivel medio, Cal n.º 3, en hexanos a un cartucho acondicionado, eluir a continuación del siguiente modo:

|            |        |                                 |          |
|------------|--------|---------------------------------|----------|
| Fracción 1 | 2X2 ml | Cloruro de metileno: 2-propanol | Desechar |
| Fracción 2 | 1,5 ml | Acético 2 % en MTBE             | Desechar |
| Fracción 3 | 1,0 ml | Acético 2 % en MTBE             | Recoger  |
| Fracción 4 | 1,5 ml | Acético 2 % en MTBE             | Recoger  |
| Fracción 5 | 1,0 ml | Acético 2 % en MTBE             | Recoger  |
| Fracción 6 | 1,0 ml | Acético 2 % en MTBE             | Recoger  |

35 Analizar las fracciones 3 a 6 para determinar el volumen óptimo de solución necesaria para eluir todos los ácidos grasos libres.

40 Una vez determinada la fracción apropiada, se puede usar un proceso de tamizado para validar el siguiente nuevo lote de cartuchos de SPE. Un extracto del blanco puede dividirse entre cartuchos de lote viejos y nuevos. Si los análisis por CG de los productos aislados guardan correlación, no se requiere ninguna otra acción. De cualquier otra manera, la fracción correcta se debe optimizar siguiendo las etapas antes mencionadas.

Configuración de instrumentos

45 Instrumento: GC capaz de inyección en columna, columna de 0,53 mm, EPC, automuestreador  
 Columna: StabilwaxDA: 0,25 micrómetros, 0,53 mm x 15 m  
 Gas portador: Flujo constante de hidrógeno a 10,0 ml/min o fijar EPC a 2,0 psi a 60 °C. Programa de temperatura: 60 °C, tiempo de retención 0,5 min, a 50%/min hasta 100 °C, a 10%/min hasta 250 °C, tiempo de retención 1 min  
 Temp. de inyección: Pista de horno de modo diferencial 3 °C  
 Volumen de inyección: 1 µl  
 50 Detector: Detector de ionización por llama a 260 °C, intervalo 0

Análisis

55 Análisis inicial:

Primero, un análisis de blanco del instrumento, ácido acético 2 % en MTBE, debe demostrar un sistema libre de contaminante. En segundo lugar, una solución estándar, 1 ppm, debe mostrar una detección aceptable para cada compuesto. En tercer lugar, se debe preparar una calibración de cinco puntos, de 5 a 200 ppm, para establecer el intervalo de funcionamiento aceptable para la cuantificación.

El cálculo se puede basar en el factor de respuesta promedio o regresión lineal. Si se elige el cálculo del factor de respuesta, entonces la desviación estándar relativa (RSD) debe estar dentro del 20 % del promedio para cada compuesto. Alternativamente, con el método del coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ), se requiere un valor de 0,999 para cada compuesto de interés. Esta calibración debe verificarse con un ICV preparado a partir de una fuente secundaria de patrones. Todos los compuestos del ICV deben estar comprendidos en un intervalo de  $\pm 5$  % de la calibración actual.

Análisis continuo:

En cada inicio, se analiza un blanco del instrumento y un patrón de nivel medio antes de las muestras. El blanco debe demostrar que no hay presencia de contaminante. El patrón de nivel medio no debe diferir más de 10 % de los valores esperados con respecto a la calibración actual. Cada quince muestras debe crearse una horquilla con un patrón de nivel medio. Si un patrón de nivel medio supera el límite de 10 %, debe adoptarse una acción correctiva y deben volver a analizarse todas las muestras previas a ese patrón. Puede utilizarse una forma de pico 18:0 para monitorizar el estado de la entrada. La degradación - alargamiento de la forma de pico del ácido esteárico indica que tiene lugar acumulación en el extremo delantero de la columna. La pérdida real de ácido esteárico es indicativa de escape o contaminación del puerto de inyección. Las medidas correctoras se describen en el anexo 13.2.

Evaluación, cálculo y expresión de resultados

#### Evaluación y cálculo

Se evalúan todos los cromatogramas en cuanto a la forma de pico. Una forma pico deficiente representa un problema con la configuración de funcionamiento. Este problema debe solucionarse antes del análisis adicional. Ver las directrices de entrada y columna de GC en el anexo 13.2. Los patrones se evalúan adicionalmente en cuanto a tiempos de retención. La ventana de tiempo de retención aceptable para los FFA individuales es de  $\pm 0,02$  minutos de los patrones de calibración actuales. Además, los niveles de FFA de muestra deben estar dentro de los límites de calibración establecidos. Si cualquier componente supera la cantidad de calibración superior, esa muestra debe diluirse adecuadamente y analizarse nuevamente.

Este método se basa en la cuantificación del patrón interno. La curva de calibración de cinco puntos va de 5 a 200 ppm. Se promedian los cinco factores de respuesta. A continuación, se usa el factor de respuesta promedio para calcular los FFAS desconocidos. Cada compuesto tiene su propio factor de respuesta.

Cálculo del factor de respuesta:

$$\text{Factor de respuesta (RF): } RF_x = (A_x C_{pi}) / (A_{pi} C_x)$$

$$\text{Factor de respuesta promedio (RF}_{prom}): RF_{Xprom} = (RF_{X1} + RF_{X2} + RF_{X3} + RF_{X4} + RF_{X5})/5$$

Donde:  $RF_x$  = Factor de respuesta del compuesto X;  $A_x$  = Área máxima del compuesto X;  $C_{is}$  = Total ( $\mu\text{g}$ ) de patrón interno añadido;  $A_{is}$  = Área máxima del patrón interno;  $C_x$  = Total ( $\mu\text{g}$ ) de compuesto X; y  $RF_{Xprom}$  = factor de respuesta promedio para el compuesto X obtenido a partir de una calibración de cinco puntos

Cálculo de la concentración desconocida:

$$\text{Concentración de muestra desconocida } (\mu\text{g/g}) = (A_x * C_{pi}) / (A_{pi} * RF_{Xprom} * W)$$

Donde: W = Peso de la muestra en (g)

Expresión de resultados

Los resultados se indican en ppm,  $\mu\text{g/g}$  o  $\text{mg/kg}$ , redondeados al número entero más cercano. Antes de la generación de datos de la muestra, el laboratorio debe establecer los límites de cuantificación prácticos y de detección. Los resultados por debajo del punto de calibración más bajo se indican como valores inferiores a ese valor,  $< 5$  ppm.

Los FFA retenidos en una fase de amina se eluyen con ácido acético al 2 % en metil-terc-butiléter (MTBE). El extracto se sometió a cromatografía en una columna capilar, Stabilwax. Los compuestos se detectan mediante ionización de llama (FID). Las cantidades de ácidos grasos pares, de 4:0 a 18:0, incluido 3:0, se determinan mediante cuantificación de patrones internos, 11:0. Los cálculos de 18:1 y 18:2 se basan en el patrón de 18:0. La cantidad de tetradecanoico (14:0), hexadecanoico (16:0), octadecanoico (18:0), octadecenoico (18:1) y octadecadienoico (18:2) hallada en las harinas se sumaron para obtener el contenido total de ácidos grasos libres de la harina mostrado en la Tabla 1.

La Tabla 5 contiene los resultados de los ácidos grasos libres totales formados en harina integral después del almacenamiento durante 30 días a  $33,3$  °C ( $92$  °F). Se muestran: (1) tipo de ácido (2) cantidad de ácido (3) concentración molar de ácido en el agua de atemperado (4) moles de ácido por 100 semillas de peso (5) pH

inicial (6) pH final (7) concentración de ácidos grasos libres (8) % de reducción en la cantidad de ácidos grasos libres en comparación con la harina de control. Las muestras de la invención contienen una cantidad del inhibidor durante el tratamiento que es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por cada 45,36 kg (100 libras) de granos enteros.

5 Tabla 5. pH y contenido de FFA de harina integral envejecida

| Dosificación de ácido           | Cantidad de ácido (peso seco de ácido/peso inicial semilla) ppm | [Conc. ácido] (M) | Ácido (moles/45,4 kg (100 libras) semillas) | pH Inicial | pH al cabo de 56 días, 33,3 °C (92 °F) | Caída del pH | Concentración de FFA 30 días (ppm) | % Inhibición |
|---------------------------------|---|-------------------|---|------------|--|--------------|------------------------------------|--------------|
| Control                         | 0   | 0                 | 0   | 6,65       | 5,99                                   | 0,66         | 3757                               | --           |
| 0,8 g de ácido láctico 85 %     | 850   | 0,94              | 0,4289                                      | 6,3        | 5,91                                   | 0,39         | 3385                               | 9,9          |
| 4 g de ácido láctico 85 %       | 4250  | 4,72              | 2,1446                                      | 5,24       | 5,16                                   | 0,08         | 2406                               | 35,96        |
| 8 g de ácido láctico 85 %       | 8500  | 9,44              | 4,2891                                      | 4,65       | 4,59                                   | 0,06         | 1655                               | 55,95        |
| 5,65 g de ácido láctico 85 %    | 6000  | 6,7               | 3,0276                                      | 4,95       | 4,87                                   | 0,08         | 2112                               | 43,78        |
| 9,41 g de ácido láctico 85 %    | 10000   | 11,1              | 5,0460                                      | 4,54       | 4,45                                   | 0,09         | 1382                               | 63,22        |
| 0,8 g de ácido fosfórico 85 %   | 850   | 0,87              | 0,3942                                      | 6,16       | 5,82                                   | 0,34         | 3062                               | 18,5         |
| 2,32 g de ácido fosfórico 85 %  | 2465  | 2,52              | 1,1433                                      | 5,67       | 5,39                                   | 0,28         | 2386                               | 36,49        |
| 6,5 g de ácido fosfórico 85 %   | 6906  | 7,05              | 3,2032                                      | 4,64       | 4,66                                   | -0,02        | 1592                               | 57,63        |
| 0,8 g de ácido clorhídrico 37 % | 370   | 1,03              | 0,3087                                      | 6,18       | 5,77                                   | 0,41         | 2593                               | 30,98        |
| 4 g de ácido clorhídrico 37 %   | 1850  | 5,18              | 1,5435                                      | 5,07       | 4,93                                   | 0,14         | 1147                               | 69,47        |
| 6,5 g de ácido clorhídrico 37 % | 3006  | 8,54              | 2,5080                                      | 4,48       | 4,42                                   | 0,06         | 746                                | 80,14        |

10 La Figura 4 muestra una representación de los ácidos grasos libres totales formados al cabo de 30 días a 33,3 °C (92 °F de uso) como una función del pH inicial de la harina. Además del pH, en la Figura 5 se muestra el efecto de la concentración del ácido en la supresión de los ácidos grasos libres formados en la harina.

### Resumen

15 La estabilización por acidificación reduce la cantidad de ácidos grasos libres formados en la harina integral. El nivel de ácidos grasos libres después de 30 días fue de 3.757 ppm en el control sin tratar. La formación de ácido graso de la harina a aproximadamente pH = 4,5 se redujo a 1.382 ppm en el caso del tratamiento con ácido láctico, 1.592 ppm en el caso del tratamiento con ácido fosfórico y 746 ppm en el caso del tratamiento con ácido clorhídrico. La concentración de ácido también se relaciona con la reducción de los ácidos grasos libres formados en la harina.

20 Se observó una desviación ligeramente descendente en el pH de la harina en un período de almacenamiento de 56 días. El cambio se vio reforzado en la harina de control sin tratar debido probablemente a cantidades superiores de ácidos grasos formados en la harina. La reducción global en los ácidos grasos libres formados oscilaba desde una reducción del 10 % hasta una reducción del 80 %, dependiendo del pH. Se cree que esta reducción en los ácidos grasos libres, un sustrato crítico de la enzima lipoxigenasa, reduce sustancialmente la cantidad de grasa oxidada en la harina por debajo del umbral de aroma/sabor de aproximadamente 3.000 ppm (o 10 % del contenido lipídico total) y, por lo tanto, prolonga sustancialmente el período de validez.

### Ejemplo 4

30 Función de horneado de la harina integral estabilizada con ácido láctico

35 En este ejemplo, se comparó la función de horneado de la harina integral estabilizada con ácido según la presente invención con la función de horneado de la harina integral no tratada. En la Tabla 6 se indican harinas de trigo integral con proporción natural de salvado y germen y endosperma junto con las fórmulas de prueba utilizadas en el horneado. Las distribuciones de tamaño de partículas de las harinas integrales se midieron utilizando el método Ro-Tap descrito en el ejemplo 2. La humedad de la harina, la ceniza, la capacidad de retención de agua, la capacidad de retención de carbonato en agua y la actividad de lipasa también se midieron según los métodos descritos en los ejemplos anteriores. El método de horneado de la prueba de galletas utilizado para evaluar la funcionalidad de horneado de las harinas integrales fue la prueba de horneado de galletas 10-53 de la AACC

40 La capacidad de retención del disolvente (SRC) sirve como ensayo práctico para vigilar la función de los componentes de harina específicos, tales como la cantidad de almidón dañado. El método de ensayo SRC utilizado se adaptó y modificó a partir del método 56-10 de la AACC según el siguiente procedimiento:

Materiales:

- Tubos de centrifuga de 50 ml + tapones
- Disolvente de carbonato de sodio a 5 % en peso
- 5 - Centrifuga (IEC, Centra GP8, rotor 269, 2.130 rpm)

Procedimiento:

1. Pesar los tubos de centrifuga de 50 ml + tapones (para los tubos especiales, pesar sellos de junta tórica)
- 10 2. Pesar y añadir 5,00 g de una mezcla de salvado/germen a cada tubo (determinar el contenido de humedad de la mezcla)
3. Añadir 25g de disolvente (alícuotas de disolvente previamente pesadas) a cada tubo
4. Permitir que se hidrate durante 20 min, agitando cada 5 min (5, 10, 15, 20)
- 15 5. Centrifugar durante 15 min a 1000xg
6. Decantar el sobrenadante y drenar 5 min a un ángulo de 45° y 5 min a un ángulo de 90°.
7. Colocar el tapón de nuevo y pesar el aglomerado
8. Calcular:

$$\text{SRC\%} = \left[ \left[ \frac{\text{tubo, retenedor, peso del gel} - \text{tubo, retenedor}}{\text{Peso de la harina}} - 1 \right] \right] \left[ \frac{86}{100 - \text{humedad de la harina}} \right] \times 100$$

20

Método:

El método de horneado de la prueba de galletas 10-53 de la AACC se diseñó en Nabisco Biscuit Company para la evaluación de la funcionalidad de los ingredientes y la correlación predictiva entre el análisis sensorial y el análisis de la textura mecánica (análisis de la textura mecánica mediante el analizador de texturas TAXT2 para la prueba de flexión de tres puntos o la prueba de punción). El ensayo es una mejora sobre el método de horneado de la prueba de galletas azucaradas 10-52 de la AACC como se confirmó por el Soft Wheat Quality Lab de la USDA (Wooster Ohio). La prueba 10-53 de la AACC se adoptó como el método oficial de la American Association of Cereal Chemists tras el ensayo en colaboración con el Soft Wheat Quality Committee en 1992. El equipo, la composición de la masa de galletas, el procedimiento de mezclado, el procedimiento de horneado, el procedimiento de medición, etc., utilizados en la prueba son:

Equipo

El equipo empleado es:

- 35 Analizador de humedad, cestas de muestras desechables para la determinación de la humedad de la harina.
- Termómetro digital (Omega modelo 872A) con termopar.
- Mezclador C-100 Hobart con un tazón mezclador de 3 cuartos y paletas.
- Horno de cocción para la prueba nacional.
- 40 Bandeja de cocción de aluminio para galletas con una anchura de 26 cm x una longitud de 30 cm con barritas de calibre 2 de 12 mm de anchura x 30 cm de longitud x 7 mm de altura.
- Cortadora de galletas (60 mm de diámetro interno).
- Rodillo amasador con manga (se trazaron líneas con la manga a lo largo de la longitud del pasador).
- Espátulas, papel absorbente de color marrón, hoja de aluminio, vasos de precipitados de plástico
- 45 Analizador de texturas TA-XT2 \*\*Prueba opcional de reología de masa\*\* - dimensiones especiales de cubeta anchura 10 cm, longitud 10,5 cm, altura 3,2 cm

El lote único AACC 10-53 de formulación normalizada para preparar 4 galletas de prueba es:

50 Etapa-1

|  |        |
|--|--------|
| Leche en polvo desnatada                 | 2,25g  |
| Sal                                      | 2,81g  |
| Bicarbonato de sodio                     | 2,25g  |
| Manteca vegetal (Sans Trans 39, Cargill) | 90,00g |

Etapa-2

|  |        |
|--|--------|
| Bicarbonato amónico  | 1,13g  |
| Jarabe de maíz con alto contenido de fructosa; 42 % de fructosa, 71 % de sólidos | 3,38g  |
| Agua*  | 49,50g |

Etapa-3

## ES 2 761 849 T3

Harina (a una humedad de 13 %)

225,00g

Mida el contenido de humedad de la harina en cada día de horneado; ajuste los niveles de la harina y el agua para compensar desviaciones del contenido de humedad de 13 %

- 5
- Registre el contenido de humedad de la harina e inserte como FM en la ecuación para calcular el peso real de la harina por lote
  - $\text{Peso real de la harina (g)} = \frac{87}{(100-FM)} * 225 \text{ g}$

- 10
- Registrar el peso real de la harina por lote e introducirlo como AFW en la ecuación para calcular el peso real del agua añadida por lote
  - $\text{Agua real añadida (g)} = 49,5\text{g} + 225 - \text{AFW} * 225 \text{ g}$

Procedimiento general de mezclado

- 15
- El procedimiento general de mezclado utilizado es:  
Etapa-1: mezcle los ingredientes secos (leche en polvo desnatada, sal, bicarbonato, azúcar)  
Añada la grasa
- 20
- Mezcle en un mezclador Hobart 3 minutos a baja velocidad; rascar la paleta y las paredes del recipiente tras cada minuto de mezclado  
Etapa-2: disuelva el bicarbonato amónico en agua; añadir el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa  
Añada la solución total a la etapa-1;  
Mezcle 1 min a baja velocidad, rasque el tazón y la paleta tras cada 30 s.  
Mezcle 2 min a velocidad media, rasque el tazón y la paleta tras cada 30 s.
- 25
- Etapa-3: Añadir la harina, combinar en la mezcla líquida 3 veces; Mezcle 2 minutos a baja velocidad y rasque la paleta y el tazón tras cada 30 segundos.

Determinación del tiempo de horneado

- 30
- La determinación de horneado utilizada es:  
El tiempo de horneado se define como el tiempo requerido para producir una pérdida de peso de 13,85 % durante el horneado de la formulación a 202 °C (400 °F).  
Para medir el tiempo de horneado:  
Hornear la formulación a 202 °C (400 °F) durante 10, 11, 12, 13 min y para algunas harinas integrales hasta 16 minutos, pesando la bandeja del horno + las galletas después de cada intervalo de minutos.
- 35
- Representar gráficamente el % de pérdida de peso durante el horneado frente al tiempo de horneado en minutos  
Interpolar el tiempo de horneado requerido para conseguir 13,58 % de pérdida de peso

Especificaciones del horneado:

- 40
- Las especificaciones de horneado utilizadas son:  
Precalentar el horno a 202 °C (400 °F)  
Registrar el peso de la bandeja de galletas frías  
Coloque la bandeja de galletas en el horno para un tiempo de horneado estándar; registrar el peso de la bandeja caliente
- 45

Procedimiento para la preparación de 4 blancos de masa para el horneado de la prueba de galletas:

- 50
- Partir cuatro piezas de 60g de masa con mínima deformación y colocarlas sobre la bandeja de galletas. Coloque el rodillo amasador a través de las barras de calibre de la bandeja de galletas permitiendo que el peso del pasador comprima las piezas de masa sin fuerza compresiva adicional. Recoja el rodillo amasador y colóquelo sobre las barras de calibre al extremo de la bandeja de galletas, y hágalo rodar solo una vez lejos de usted. Corte las galletas con una cuchilla de 60 mm, y levante con cuidado la masa de chatarra con una espátula pequeña. Levante la cuchilla hacia arriba para evitar la distorsión horizontal.
- 55
- Registre el peso de los blancos de masa y de la bandeja de galletas.
- Colocar los blancos de masa y la bandeja de galletas en el horno en la dirección de la bandeja. Hornear las galletas a 202 °C (400 °F) durante un tiempo de horneado predeterminado.
- 60
- Pesar la bandeja de galletas con las galletas inmediatamente después de la retirada del horno. Retirar con cuidado las galletas de la bandeja con una espátula plana y coloque la parte plana sobre un papel marrón en la misma dirección en la que fueron envueltas y horneadas.

Mediciones de geometría (tomadas cuando se enfrían las galletas, al menos 30 minutos)

65

Anchura-diámetro perpendicular a la dirección de la bandeja. Colocar 4 galletas en una fila trazando líneas con la manga del rodillo amasador paralelas a la longitud del metro. Registre las mediciones en cm.

5 Diámetro mayor paralelo a la bandeja. Girar las galletas 90° de tal manera que las líneas de la manga del rodillo amasador sean perpendiculares a la longitud del metro. Registrar las mediciones en cm

Altura de pila - apilar las 4 galletas y colocar la pila en el lado situado entre las guías planas. Registrar la altura.

10 En la Tabla 6 se muestran los resultados de SRC y de horneado para el control y la harina tratada con ácido láctico (duplicados); en la tabla están incluidas (1) las condiciones de tratamiento con ácido (2) ceniza (3) capacidad de retención de disolvente de la harina para el agua, sacarosa, disolventes de carbonato de sodio y ácido láctico (6) pH de la harina (7) anchura de galleta, longitud de galleta y altura de pila.

15 Tabla 6: Resultados del horneado de galletas para SRC y prueba 10-53 de la AACCC

| Tipo de inhibidor de lipasa | Cantidad de ácido (peso seco/peso inicial de la semilla) | FFA (ppm) 3 semanas a 28C | pH harina | Horneado de galletas |                                  |                |                 |                        | SRC de la harina |          |                    |               |
|-----------------------------|--|---------------------------|-----------|----------------------|----------------------------------|----------------|-----------------|------------------------|------------------|----------|--------------------|---------------|
|                             |  |                           |           | pH masa de galletas  | % en peso de pérdida de horneado | Anchura (cm) 4 | Longitud (cm) 4 | Altura de la pila (cm) | Agua             | sacarosa | Carbonato de sodio | Ácido láctico |
| Control                     | 0 ppm  | 4576                      | 6,56      | 8,00                 | 13,45                            | 30,30          | 30,10           | 4,37                   | 65,91            | 99,38    | 82,80              | 71,47         |
| Ácido láctico               | 3000 ppm   | 2628                      | 5,54      | 7,65                 | 13,84                            | 31,20          | 31,30           | 4,10                   | 59,53            | 95,77    | 76,58              | 69,11         |
| Ácido láctico               | 3000 ppm   | 2364                      | 5,56      | 7,52                 | 13,63                            | 31,00          | 30,70           | 4,15                   | 60,35            | 94,23    | 78,67              | 69,40         |
| Extracto de té verde        | 7000 ppm   | 3718                      | 6,54      | 7,89                 | 13,95                            | 31,40          | 31,00           | 4,15                   | 62,45            | 90,29    | 78,85              | 70,02         |

Las galletas, cuando fueron degustadas por un panel entrenado se describieron como más horneadas/tostadas, más dulces y caramelizadas en comparación con el control. La textura de galleta era más dura.

20 Resúmen

La harina integral estabilizada con ácido láctico demuestra propiedades de horneado similares a las de la harina integral no tratada. Se observaron algunas ventajas en el sabor, más caramelizado, dulce y tostado.

25 Ejemplo 5

Parte A. Acidificación de trigo integral

30 El objetivo de este ejemplo es comprender la relación de las variables de nivel de agua, concentración del ácido y tiempo de atemperado en la humedad de semilla de trigo rojo blando y la capacidad de molienda. La Tabla 7 muestra el agua añadida, la concentración de ácido, el tiempo de atemperado y los moles de ácido por peso 100 de trigo. Las muestras de la invención contienen una cantidad del inhibidor durante el tratamiento, que es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por cada 45,36 kg (100 libras) de granos enteros.

35 Tabla 7: Efecto del nivel de agua, concentración del ácido y tiempo de atemperado

| Análisis | Tipo G         | Cantidad de ácido láctico (residuo peso seco/peso semilla inicial) ppm | Tiempo de atemperado (min) | Nivel de agua de atemperado (%) | [conc. ácido] (M) | Agua (g) | Láctico 88,50 % (g) | Ácido añadido (g, dwb) | Ácido (moles/45.4 kg (100 ppm) de semillas) |
|----------|----------------|--|----------------------------|---------------------------------|-------------------|----------|---------------------|------------------------|---|
| 1        |                | 0  | 480                        | 1                               | 0                 | 8        | 0                   | 0,00                   | 0,0000                                      |
| 2        | Centro         | 6000   | 240                        | 3                               | 2,22              | 23,38    | 5,42                | 4,80                   | 3,0276                                      |
| 3        | Desconocido    | 3000   | 20                         | 5                               | 0,67              | 39,69    | 2,71                | 2,40                   | 1,5138                                      |
| 4        | Axial          | 3000   | 240                        | 3                               | 1,11              | 23,69    | 2,71                | 2,40                   | 1,5138                                      |
| 5        | Multifactorial | 3000   | 480                        | 1                               | 3,33              | 7,69     | 2,71                | 2,40                   | 1,5138                                      |
| 6        | Axial          | 6000   | 20                         | 3                               | 2,22              | 23,38    | 5,42                | 4,80                   | 3,0276                                      |
| 7        | Multifactorial | 9000   | 480                        | 1                               | 9,99              | 7,06     | 8,14                | 7,20                   | 4,5414                                      |
| 8        | Centro         | 6000   | 240                        | 3                               | 2,22              | 23,38    | 5,42                | 4,80                   | 3,0276                                      |
| 9        | Multifactorial | 9000   | 480                        | 5                               | 2                 | 39,06    | 8,14                | 7,20                   | 4,5414                                      |
| 10       | Axial          | 6000   | 240                        | 1                               | 6,66              | 7,38     | 5,42                | 4,80                   | 3,0276                                      |
| 11       | Desconocido    | 9000   | 20                         | 1                               | 9,99              | 7,06     | 8,14                | 7,20                   | 4,5414                                      |
| 12       | Axial          | 6000   | 240                        | 5                               | 1,33              | 39,38    | 5,42                | 4,80                   | 3,0276                                      |
| 13       | Multifactorial | 3000   | 480                        | 5                               | 0,67              | 39,69    | 2,71                | 2,40                   | 1,5138                                      |

## ES 2 761 849 T3

|    |             |      |     |   |      |       |      |      |        |
|----|-------------|------|-----|---|------|-------|------|------|--------|
| 14 | Centro      | 6000 | 240 | 3 | 2,22 | 23,38 | 5,42 | 4,80 | 3,0276 |
| 15 | Axial       | 6000 | 480 | 3 | 2,22 | 23,38 | 5,42 | 4,80 | 3,0276 |
| 16 | Desconocido | 3000 | 20  | 1 | 3,33 | 7,69  | 2,71 | 2,40 | 1,5138 |
| 17 | Desconocido | 9000 | 20  | 5 | 2    | 39,06 | 8,14 | 7,20 | 4,5414 |
| 18 | Axial       | 9000 | 240 | 3 | 3,33 | 23,06 | 8,14 | 7,20 | 4,5414 |
| 19 | Centro      | 6000 | 240 | 3 | 2,22 | 23,38 | 5,42 | 4,80 | 3,0276 |
| 20 |             | 0    | 480 | 1 | 0    | 8     | 0    | 0,00 | 0,0000 |

### Procedimiento

5 La muestra de trigo limpia (800 g) se pesa en un frasco de plástico hermético al aire mezclada con la correspondiente cantidad de agua de atemperado que contiene una cantidad específica de ácido, como se muestra en la Tabla 7. El trigo se atempera durante intervalos de 20 min, 4 horas, o de 8 horas a temperatura ambiente. Por ejemplo, para conseguir una concentración de adición de láctico de 3.000 ppm en 800 g de trigo, se añaden 2,71 g de solución de ácido láctico 88,5 % a 7,69 g de agua corriente para un aumento de la humedad del 1 %. Una vez añadida agua de atemperado con ácido al trigo, el frasco se selló, se agitó manualmente durante 1 min cada 10 min 6 veces, después se dejó reposar durante la noche.

15 La Tabla 8 muestra el (1) peso del trigo (2) humedad inicial de trigo (3) cantidad de ácido (dwb) añadida al trigo expresada en partes por millón (ppm) (4) tiempo de atemperado (5) % agua de atemperado (peso/peso) (7) agua total (agua de atemperado + agua de la solución ácida) añadida para humectar la semilla de trigo (8) cantidad de 88,5 % de solución de ácido láctico añadida (9) agua añadida (10) humedad de semilla atemperada.

Tabla 8. Atemperado de trigo con diferentes cantidades y concentración de ácido

| Salvado de trigo (g) | Humedad de semilla (%) | Cantidad de ácido láctico (peso seco de ácido/peso inicial de semilla) ppm) | Tiempo de atemperado (min) | Temperatura Nivel de Agua (%) | [conc. ácido] (M) | Agua añadida (g) | Ácido láctico 88,5 % (g) | Agua total (g) | Humedad de semilla atemperada (%) |
|----------------------|------------------------|---|----------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|----------------|-----------------------------------|
| 800                  | 11,48                  | 0   | 480                        | 1                             | 0,00              | 8,00             | 0,00                     | 8              | 12,893                            |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 240                        | 3                             | 2,22              | 23,38            | 5,42                     | 24             | 14,506                            |
| 800                  | 11,48                  | 3000  | 20                         | 5                             | 0,67              | 39,69            | 2,71                     | 40             | 15,452                            |
| 800                  | 11,48                  | 3000  | 240                        | 3                             | 1,11              | 23,69            | 2,71                     | 24             | 14,748                            |
| 800                  | 11,48                  | 3000  | 480                        | 1                             | 3,33              | 7,69             | 2,71                     | 8              | 13,236                            |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 20                         | 3                             | 2,22              | 23,38            | 5,42                     | 24             | 14,052                            |
| 800                  | 11,48                  | 9000  | 480                        | 1                             | 9,99              | 7,06             | 8,14                     | 8              | 13,22                             |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 240                        | 3                             | 2,22              | 23,38            | 5,42                     | 24             | 14,125                            |
| 800                  | 11,48                  | 9000  | 480                        | 5                             | 2,00              | 39,06            | 8,14                     | 40             | 15,721                            |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 240                        | 1                             | 6,66              | 7,38             | 5,42                     | 8              | 13,184                            |
| 800                  | 11,48                  | 9000  | 20                         | 1                             | 9,99              | 7,06             | 8,14                     | 8              | 13,844                            |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 240                        | 5                             | 1,33              | 39,38            | 5,42                     | 40             | 15,563                            |
| 800                  | 11,48                  | 3000  | 480                        | 5                             | 0,67              | 39,69            | 2,71                     | 40             | 15,258                            |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 240                        | 3                             | 2,22              | 23,38            | 5,42                     | 24             | 14,227                            |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 480                        | 3                             | 2,22              | 23,38            | 5,42                     | 24             | 14,814                            |
| 800                  | 11,48                  | 3000  | 20                         | 1                             | 3,33              | 7,69             | 2,71                     | 8              | 13,282                            |
| 800                  | 11,48                  | 9000  | 20                         | 5                             | 2,00              | 39,06            | 8,14                     | 40             | 15,157                            |
| 800                  | 11,48                  | 9000  | 240                        | 3                             | 3,33              | 23,06            | 8,14                     | 24             | 14,691                            |
| 800                  | 11,48                  | 6000  | 240                        | 3                             | 2,22              | 23,38            | 5,42                     | 24             | 14,603                            |
| 800                  | 11,48                  | 0   | 480                        | 1                             | 0,00              | 8,00             | 0,00                     | 8              | 12,955                            |

### 20 Parte B. Molienda de trigo

El objetivo de este procedimiento fue producir harina integral a partir de semillas de trigo atemperadas como se ha descrito en la parte A.

### 25 Procedimiento

30 Las muestras de trigo atemperado se molieron con un molino de laboratorio Chopin CD1 (Chopin, Francia) como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. La Tabla 9 muestra el rendimiento de extracción de harina. El rendimiento se calculó en base al trigo molido. Se calculó el rendimiento de la harina como rendimiento = 100 x [(Peso salvado grueso y fino + peso partes retenidas)/peso trigo], en este estudio.

Tabla 9 Rendimiento de extracción de harina

| Cantidad de ácido láctico (peso seco de ácido/peso inicial de semilla) ppm | Humedad de semilla atemperada (%) | Rendimiento de extracción (%) |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|
| 0  | 12,893                            |                               |
| 6000   | 14,506                            | 69,85                         |
| 3000   | 15,452                            | 65,30                         |
| 3000   | 14,748                            | 69,00                         |
| 3000   | 13,236                            |                               |
| 6000   | 14,052                            | 66,96                         |
| 9000   | 13,22                             |                               |
| 6000   | 14,125                            | 68,53                         |
| 9000   | 15,721                            |                               |
| 6000   | 13,184                            | 66,04                         |
| 9000   | 13,844                            | 65,56                         |
| 6000   | 15,563                            | 67,14                         |
| 3000   | 15,258                            |                               |
| 6000   | 14,227                            | 68,12                         |
| 6000   | 14,814                            |                               |
| 3000   | 13,282                            |                               |
| 9000   | 15,157                            | 67,39                         |
| 9000   | 14,691                            | 66,93                         |
| 6000   | 14,603                            | 67,31                         |
| 0  | 12,955                            |                               |

5 Resumen

Las semillas de trigo se atemperaron con agua que contenía diferentes cantidades de ácido. La humedad añadida se ajustó según la humedad inicial de la semilla de trigo de manera que la humedad final de la semilla, después del atemperado, se aumentó a 1, 3 y 5 %. Se ajustó la cantidad de ácido añadido al agua de atemperado de modo que se analizaron intervalos de 0 ppm a 9.000 ppm (peso seco de ácido por peso inicial de trigo). Se observó un comportamiento de molienda normal para todos los tipos y cantidades de tratamientos con ácido. El rendimiento de extracción de harina fue de forma típica de aproximadamente 65 % a 70 % y todas las fracciones de molienda se recombinaron para formar harina integral con proporciones naturales de salvado, germen y endosperma.

15 Ejemplo 6

Producción de salvado molido grueso a partir de semillas tratadas con ácido y recombinación a harina integral

El objetivo de este procedimiento era reducir el tamaño de partículas de la fracción gruesa de salvado y partes retenidas de reducción obtenidas a partir de la molienda del trigo tratado con ácido. El salvado grueso del primer rodillo de ruptura y las partes retenidas gruesas del rodillo de reducción se congelaron, se tritararon, y se recombinaron con harina integral como se describe en el ejemplo 2. Se determinó la distribución de tamaño de partículas de la harina integral mediante el método Roto Tap descrito anteriormente.

El pH de la harina integral se midió en una suspensión acuosa al 10 % (una parte de harina a 9 partes de agua) con el uso de un pH-metro Corning 360i equipado con un electrodo de pH de combinación de alto rendimiento modelo n.º A-58905-66. Se determina el nivel de ceniza según el método oficial 923.03 de la AOAC para medir ceniza en harina. La humedad de la harina se determinó según el método AACC 44-15A.

La Tabla 10 muestra las características de la harina integral de (1) cantidad de ácido (2) pH (3) humedad de la harina (4) contenido de ceniza y (5) distribución de tamaño de partículas.

Tabla 10. Caracterización de harina integral

| Cantidad de ácido láctico (peso seco de ácido/peso inicial de semilla) ppm | pH  | Humedad | MBCeniza | Rotap + 35 | Rotap + 50 | Rotap + 60 | Rotap + 80 | Rotap + 100 | Rotap a través de 100 | Rotap + 70 | Total |
|--|-----|---------|----------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----------------------|------------|-------|
| 0  | 6,5 | 12,893  | 1,40     | 0,80       | 7,40       | 4,60       | 4,40       | 20,20       | 61,80                 | 1,60       | 100,8 |

## ES 2 761 849 T3

|      |      |        |      |      |      |      |      |       |       |      |       |
|------|------|--------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|-------|
| 6000 | 4,87 | 14,506 | 1,41 | 0,80 | 8,00 | 3,20 | 4,60 | 6,80  | 75,00 | 2,20 | 100,6 |
| 3000 | 5,52 | 15,452 | 1,45 | 0,80 | 7,40 | 5,00 | 4,20 | 19,60 | 60,60 | 2,20 | 99,8  |
| 3000 | 5,52 | 14,748 | 1,42 | 0,20 | 5,40 | 3,20 | 4,60 | 21,00 | 62,80 | 2,60 | 99,8  |
| 3000 | 5,47 | 13,236 | 1,39 | 0,80 | 7,20 | 3,80 | 4,00 | 14,60 | 67,60 | 2,00 | 100   |
| 6000 | 4,91 | 14,052 | 1,43 | 0,60 | 7,20 | 3,80 | 4,00 | 13,60 | 68,20 | 2,20 | 99,6  |
| 9000 | 4,49 | 13,22  | 1,41 | 6,00 | 7,40 | 3,00 | 4,20 | 7,00  | 74,60 | 2,60 | 104,8 |
| 6000 | 4,9  | 14,125 | 1,41 | 1,20 | 8,40 | 3,60 | 4,40 | 15,60 | 64,20 | 2,40 | 99,8  |
| 9000 | 4,53 | 15,721 | 1,42 | 0,40 | 6,80 | 3,20 | 4,60 | 7,40  | 75,00 | 2,60 | 100   |
| 6000 | 4,85 | 13,184 | 1,41 | 0,20 | 4,80 | 4,80 | 6,00 | 25,20 | 55,80 | 3,20 | 100   |
| 9000 | 4,52 | 13,844 | 1,43 | 0,40 | 5,00 | 3,40 | 3,40 | 12,20 | 72,80 | 2,80 | 100   |
| 6000 | 4,92 | 15,563 | 1,44 | 1,00 | 8,20 | 4,20 | 4,40 | 15,00 | 64,60 | 2,60 | 100   |
| 3000 | 5,51 | 15,258 | 1,46 | 0,20 | 5,60 | 4,40 | 4,60 | 17,40 | 64,40 | 3,40 | 100   |
| 6000 | 4,93 | 14,227 | 1,43 | 0,20 | 4,80 | 3,80 | 5,80 | 18,80 | 63,20 | 3,20 | 99,8  |
| 6000 | 4,93 | 14,814 | 1,45 | 0,20 | 4,40 | 3,60 | 5,80 | 20,00 | 61,40 | 3,80 | 99,2  |
| 3000 | 5,51 | 13,282 | 1,39 | 0,20 | 6,80 | 3,60 | 5,00 | 12,60 | 68,00 | 3,20 | 99,4  |
| 9000 | 4,59 | 15,157 | 1,43 | 1,20 | 8,00 | 4,40 | 5,20 | 10,20 | 67,40 | 3,60 | 100   |
| 9000 | 4,53 | 14,691 | 1,41 | 0,40 | 6,20 | 4,40 | 6,00 | 14,60 | 64,20 | 4,20 | 100   |
| 6000 | 4,88 | 14,603 | 1,43 | 0,40 | 7,80 | 3,80 | 6,00 | 13,20 | 64,00 | 3,80 | 99    |
| 0    | 6,61 | 12,955 | 1,41 | 0,20 | 6,40 | 4,00 | 6,20 | 12,60 | 66,00 | 4,20 | 99,6  |

Se determinó la actividad de la lipasa extraíble para cada harina. El método utilizado para determinar la actividad de lipasa es como se describe en el ejemplo 2.

5 La actividad de lipasa extraíble para las diversas harinas integrales se muestra en la Tabla 11:

Tabla 11 - Actividad de la lipasa extraíble en función del pH de la harina

| pH   | Actividad de lipasa (unidades/g) |
|------|----------------------------------|
| 6,5  | 337,2                            |
| 4,87 | 296,92                           |
| 5,52 | 318,39                           |
| 5,52 | 352,87                           |
| 5,47 | 325,72                           |
| 4,91 | 294,43                           |
| 4,49 | 284,27                           |
| 4,9  | 283,72                           |
| 4,53 | 269,12                           |
| 4,85 | 292,14                           |
| 4,52 | 330,65                           |
| 4,92 | 294                              |
| 5,51 | 349,35                           |
| 4,93 | 327,11                           |
| 4,93 | 306                              |
| 5,51 | 350,02                           |
| 4,59 | 270,84                           |
| 4,53 | 265,78                           |
| 4,88 | 284,69                           |
| 6,61 | 351,31                           |

10 Resumen y conclusiones

15 La distribución del tamaño de partícula de la harina final fue similar entre las variables de prueba de humedad final, tiempo de atemperado y pH, siendo aproximadamente de 10 % a 15 % del peso de la harina > 250  $\mu$ m y de aproximadamente 60 % a 75 % < 150  $\mu$ m. El uso de medición de ceniza en molienda de harina se basa en la mayor concentración de ceniza (minerales) en el salvado, aleurona y germen que en el endosperma. El contenido de ceniza es un índice ampliamente utilizado de la pureza de la harina y proporciona un medio para medir la separación mecánica de los componentes de la semilla durante el proceso de molienda. En este caso, la ceniza se usa como un indicador de recombinación completa y

reproducibile de la fracción molida gruesa con el endosperma de la harina para elaborar harina integral con una proporción natural de salvado, germen y endosperma. El pH de la harina final dependía de la cantidad de ácido utilizada para atemperar la semilla entera. La actividad de lipasa extraíble en la harina integral disminuyó ligeramente a un pH inferior.

5 Ejemplo 7

Efecto del atemperado de ácido en la estabilidad y función de la harina integral

10 El objetivo de este ejemplo fue medir la cantidad de ácidos grasos libres formados en la harina integral elaborada en los ejemplos 5 y 6, almacenada en un frasco de vidrio sellado durante 28 días a 92 °F. La función de la harina integral fue evaluada mediante la prueba de capacidad de retención de disolvente descrita en el ejemplo 4.

15 A. Efecto de la variable del ácido añadido, el agua de atemperado añadida, y el tiempo de atemperado en la formación de ácidos grasos libres en la harina integral

El contenido de ácidos grasos libres de la harina integral (harina fresca y harina envejecida 28 días) preparada en los ejemplos 5 y 6 se determinó según el método descrito en el ejemplo 4.

20 La Tabla 12 muestra (1) peso de ácido láctico añadido (2) % de agua total añadida al trigo (peso/peso), todas las fuentes excepto la natural de la semilla de trigo (3) tiempo de atemperado (4) concentración de ácido (5) pH de la harina (6) contenido inicial de ácidos grasos libres (7) contenido de ácidos grasos libres de harina almacenada durante 28 días a 92F (8) % de reducción en los ácidos grasos libres en comparación con el control sin tratar

25 La concentración de ácido se calcula para un lote de 800g de semillas de trigo:  
 [Ácido láctico, peso seco (ppm o (µg/g de trigo))\* 800 = peso seco total de ácido  
 Peso seco total de ácido/peso molecular ácido láctico = **moles de ácido**  
 % agua \* 800 g de trigo = agua total (g)/volumen equivalente (1 ml); agua (ml)/1000 = **agua total (l)**  
 [conc. ácido] = moles de ácido/litro agua = concentración molar (M)  
 Los resultados se muestran en la Tabla 12:

30 Tabla 12. contenido de pH y FFA de harina integral envejecida

| Cantidad de ácido láctico (peso seco de ácido/peso inicial de semilla, ppm) | % Nivel de agua total (peso/peso) | Tiempo de atemperado (min) | [conc. ácido] (M) | pH   | Concentración de FFA, día 0 (ppm) | Concentración de FFA 28 días (ppm) | % Inhibición |
|---|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------|
| 0   | 1                                 | 480                        | 0,00              | 6,5  | 510                               | 2826                               | 5,93         |
| 6000  | 3                                 | 240                        | 2,22              | 4,87 | 466                               | 1762                               | 41,34        |
| 3000  | 5                                 | 20                         | 0,67              | 5,52 | 485                               | 2973                               | 1,03         |
| 3000  | 3                                 | 240                        | 1,11              | 5,52 | 505                               | 2524                               | 15,98        |
| 3000  | 1                                 | 480                        | 3,33              | 5,47 | 508                               | 2183                               | 27,33        |
| 6000  | 3                                 | 20                         | 2,22              | 4,91 | 501                               | 1626                               | 45,87        |
| 9000  | 1                                 | 480                        | 9,99              | 4,49 | 474                               | 1425                               | 52,56        |
| 6000  | 3                                 | 240                        | 2,22              | 4,9  | 468                               | 1383                               | 53,96        |
| 9000  | 5                                 | 480                        | 2,00              | 4,53 | 475                               | 2222                               | 26,03        |
| 6000  | 1                                 | 240                        | 6,66              | 4,85 | 468                               | 1809                               | 39,78        |
| 9000  | 1                                 | 20                         | 9,99              | 4,52 | 441                               | 1524                               | 49,27        |
| 6000  | 5                                 | 240                        | 1,33              | 4,92 | 469                               | 3.248                              | -8,12        |
| 3000  | 5                                 | 480                        | 0,67              | 5,51 | 487                               | 3241                               | -7,89        |
| 6000  | 3                                 | 240                        | 2,22              | 4,93 | 477                               | 1893                               | 36,98        |
| 6000  | 3                                 | 480                        | 2,22              | 4,93 | 467                               | 2043                               | 31,99        |
| 3000  | 1                                 | 20                         | 3,33              | 5,51 | 493                               | 2298                               | 23,50        |
| 9000  | 5                                 | 20                         | 2,00              | 4,59 | 451                               | 1881                               | 37,38        |
| 9000  | 3                                 | 240                        | 3,33              | 4,53 | 461                               | 1533                               | 48,97        |
| 6000  | 3                                 | 240                        | 2,22              | 4,88 | 467                               | 1716                               | 42,88        |
| 0   | 1                                 | 480                        | 0,00              | 6,61 | 500                               | 3182                               | -5,93        |

35 El análisis estadístico mediante el uso de software Design Expert© (Stat-Ease, Inc.) confirmó un efecto significativo de la cantidad de ácido láctico añadido y la cantidad de agua añadida utilizada para atemperar el grano a partir del cual se obtuvo la harina.

La Figura 6 muestra una representación de análisis bivariable para los ácidos grasos libres totales formados al cabo de 28 días a 33,3 °C (92 °F). El efecto del ácido láctico y el agua de atemperado en el contenido de ácidos

grasos libres de la harina integral al cabo de 28 días a 33,3 °C (92 °F) se muestra en la Figura 6. La variable A es la concentración de ácido láctico añadida a la harina y la variable C es el nivel de agua de atemperado de la semilla de trigo. La condición óptima de atemperado se representa en la esquina inferior derecha de la representación; una mayor cantidad de ácido láctico añadido y una menor cantidad de agua añadida produjo la harina integral con la menor formación de ácidos grasos libres durante el período de validez.

B. Efecto del atemperado con ácido en la función de la harina integral medida mediante SRC

Utilizando el método SRC descrito en el ejemplo 4 se midieron los cambios en las características funcionales de la harina integral

La Tabla 13 muestra las variables de proceso de la harina (1) ácido láctico añadido (2) agua de atemperado añadida (3) concentración de ácido en agua (4) tiempo de atemperado y los (5) valores de la capacidad de retención de disolvente para los cuatro disolventes; agua, sacarosa, carbonato de sodio, ácido láctico y (6) SRC del ácido láctico dividido por la SRC del agua.

Tabla 13: Resultados de SRC

| Cantidad de ácido láctico (peso seco de ácido/peso inicial de semilla) ppm | % Nivel de agua total (peso/peso) | Tiempo de atemperado (min) | [conc. ácido] (M) | SRC del agua en % | SRC de la sacarosa en % | SRC del Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en % | SRC del ácido láctico en % | SRC del ácido láctico/SRC del agua |
|--|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|--|----------------------------|------------------------------------|
| 0  | 1                                 | 480                        | 0,00              | 63,98             | 70,67                   | 79,53  | 69,12                      | 1,08                               |
| 6000   | 3                                 | 240                        | 2,22              | 61,67             | 72,18                   | 77,81  | 67,53                      | 1,09                               |
| 3000   | 5                                 | 20                         | 0,67              | 59,14             | 71,59                   |  | 66,87                      | 1,13                               |
| 3000   | 3                                 | 240                        | 1,11              | 57,78             | 69,10                   | 76,06  | 66,29                      | 1,15                               |
| 3000   | 5                                 | 480                        | 3,33              | 59,97             | 70,35                   | 77,76  | 68,09                      | 1,14                               |
| 6000   | 3                                 | 20                         | 2,22              | 60,52             | 73,54                   | 77,96  | 68,34                      | 1,13                               |
| 9000   | 1                                 | 480                        | 9,99              | 62,27             | 70,39                   | 77,53  | 67,21                      | 1,08                               |
| 6000   | 3                                 | 240                        | 2,22              | 61,72             | 70,11                   | 77,82  | 68,06                      | 1,10                               |
| 9000   | 5                                 | 480                        | 2,00              | 60,89             | 69,95                   | 76,60  | 66,81                      | 1,10                               |
| 6000   | 1                                 | 240                        | 6,66              | 62,28             | 70,06                   | 76,47  | 67,67                      | 1,09                               |
| 9000   | 1                                 | 20                         | 9,99              | 62,79             | 71,46                   | 77,34  | 68,79                      | 1,10                               |
| 6000   | 5                                 | 240                        | 1,33              | 61,78             | 70,65                   | 77,93  | 67,28                      | 1,09                               |
| 3000   | 5                                 | 480                        | 0,67              | 59,13             | 67,38                   | 78,23  | 67,14                      | 1,14                               |
| 6000   | 3                                 | 240                        | 2,22              | 60,91             | 68,98                   | 76,75  | 66,33                      | 1,09                               |
| 6000   | 3                                 | 480                        | 2,22              | 60,01             | 69,17                   | 76,64  | 66,94                      | 1,12                               |
| 3000   | 1                                 | 20                         | 3,33              | 60,40             | 67,18                   | 76,35  | 68,13                      | 1,13                               |
| 9000   | 5                                 | 20                         | 2,00              | 64,12             | 76,73                   | 81,35  | 71,81                      | 1,12                               |
| 9000   | 3                                 | 240                        | 3,33              | 61,55             | 72,14                   | 75,84  | 69,68                      | 1,13                               |
| 6000   | 3                                 | 240                        | 2,22              | 62,18             | 71,92                   | 78,04  | 71,44                      | 1,15                               |
| 0  | 1                                 | 480                        | 0,00              | 66,92             | 71,33                   | 82,80  | 67,13                      | 1,00                               |

Un análisis estadístico utilizando el *software* Design Expert® mostró que el tiempo de atemperado y la cantidad de ácido láctico añadida no redujo la resistencia de la harina según lo medido mediante el valor de SRC del ácido láctico como se muestra en la Figura 7 que es una representación de SRC (68, 69, 70) de la harina integral en función del tiempo de atemperado y la cantidad de ácido láctico (ppm). Además, la absorción de la harina general, medida mediante el valor de SRC del agua, deseablemente baja para una harina de trigo blando, no mostró cambios en función del tratamiento ácido y la relación de SRC del ácido láctico dividida por la SRC del agua en función del tratamiento (p. ej., la alta relación muestra una harina más fuerte y una menor adsorción).

La molienda de los productos de trigo atemperados produce cuatro fracciones de la semilla de trigo que se combinan para elaborar la harina integral. Las fracciones son, desde las capas externas de la semilla de trigo a la capa interna; salvado grueso, salvado fino, harina de reducción y harina de ruptura. La Tabla 14 muestra la medición de la humedad y el pH de cada una de estas fracciones molidas antes de recombinar toda la harina.

En la Tabla 14 se muestra: (1) la distribución de la humedad y el pH en la harina de ruptura (2) la distribución de la humedad y el pH en el salvado grueso (3) la distribución de la humedad y el pH en la harina de reducción (4) la distribución de la humedad y el pH en el salvado fino (5) los pesos respectivos de cada fracción.

Tabla 14: resultados de pH y humedad para las fracciones de harina

| Ácido láctico (ppm) | % Nivel de agua total (peso/peso) | Tiempo de atemperado (min) | [ácido conc. en agua total] (M) | pH harina final | FFA día 28 (ppm) | Humedad harina de ruptura | pH harina de ruptura | peso harina de ruptura (g) | humedad salvado grueso | pH salvado grueso | peso salvado grueso (g) | humedad salvado fino | pH salvado fino | peso salvado fino (g) | reducción de humedad | Reducción de pH | Reducción peso (g) |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|------------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
| 0                   | 1                                 | 480                        | 0,00                            | 6,5             | 2826             | 13,90                     | 5,78                 | 397,06                     | 13,59                  | 5,67              | 181,97                  | 13,38                | 6,41            | 76,08                 | 13,55                | 6,52            | 151,84             |
| 6000                | 3                                 | 240                        | 2,22                            | 4,87            | 1762             | 15,03                     | 5,26                 | 445,26                     | 14,58                  | 4,79              | 179,87                  | 14,27                | 4,72            | 82,39                 | 15,62                | 4,43            | 119,15             |
| 3000                | 5                                 | 20                         | 0,67                            | 5,52            | 2973             | 15,88                     | 5,22                 | 403,66                     | 15,80                  | 4,84              | 112,78                  | 15,96                | 5,33            | 136,96                | 17,51                | 5,48            | 159,54             |
| 3000                | 3                                 | 240                        | 1,11                            | 5,52            | 2524             | 15,03                     | 5,57                 | 434,76                     | 14,62                  | 5,37              | 184,88                  | 14,48                | 5,37            | 69,58                 | 15,58                | 4,86            | 120,26             |
| 3000                | 1                                 | 480                        | 3,33                            | 5,47            | 2183             | 13,74                     | 5,49                 | 392,96                     | 13,70                  | 5,45              | 182,09                  | 12,92                | 5,26            | 71,26                 | 13,43                | 4,84            | 153,44             |
| 6000                | 3                                 | 20                         | 2,22                            | 4,91            | 1626             | 14,45                     | 5,00                 | 378,38                     | 14,49                  | 4,46              | 164,14                  | 14,50                | 4,63            | 98,27                 | 16,07                | 4,61            | 176,64             |
| 9000                | 1                                 | 480                        | 9,99                            | 4,49            | 1425             | 13,81                     | 4,95                 | 389,89                     | 13,71                  | 4,58              | 182,19                  | 13,18                | 4,17            | 96,72                 | 13,37                | 4,05            | 135,04             |
| 6000                | 3                                 | 240                        | 2,22                            | 4,9             | 1383             | 14,85                     | 5,30                 | 434,16                     | 14,49                  | 5,00              | 182,06                  | 14,23                | 4,74            | 75,54                 | 15,28                | 4,41            | 121,44             |
| 9000                | 5                                 | 480                        | 2,00                            | 4,53            | 2222             | 16,35                     | 4,73                 | 446,06                     | 15,85                  | 4,22              | 176,52                  | 16,57                | 4,32            | 89,67                 | 17,21                | 4,21            | 104,96             |
| 6000                | 1                                 | 240                        | 6,66                            | 4,85            | 1809             | 13,89                     | 5,23                 | 445,26                     | 13,45                  | 5,03              | 179,87                  | 12,42                | 4,52            | 82,39                 | 13,50                | 4,28            | 162,24             |
| 9000                | 1                                 | 20                         | 9,99                            | 4,52            | 1524             | 13,55                     | 4,73                 | 360,56                     | 13,24                  | 4,44              | 173,73                  | 12,72                | 4,17            | 84,66                 | 13,41                | 4,20            | 187,74             |
| 6000                | 5                                 | 240                        | 1,33                            | 4,92            | 3.248            | 15,93                     | 5,28                 | 441,86                     | 15,59                  | 4,73              | 180,20                  | 15,77                | 4,75            | 80,71                 | 17,37                | 4,50            | 113,81             |
| 3000                | 5                                 | 480                        | 0,67                            | 5,51            | 3241             | 16,45                     | 5,29                 | 462,56                     | 15,91                  | 5,04              | 189,38                  | 16,33                | 5,25            | 79,48                 | 17,25                | 4,90            | 93,54              |
| 6000                | 3                                 | 240                        | 2,22                            | 4,93            | 1893             | 14,76                     | 5,22                 | 432,36                     | 14,49                  | 4,89              | 185,49                  | 14,05                | 4,64            | 71,90                 | 15,56                | 4,45            | 136,02             |
| 6000                | 3                                 | 480                        | 2,22                            | 4,93            | 2043             | 15,20                     | 5,13                 | 432,46                     | 14,97                  | 4,82              | 188,01                  | 14,84                | 4,65            | 87,52                 | 15,34                | 4,40            | 110,01             |
| 3000                | 1                                 | 20                         | 3,33                            | 5,51            | 2298             | 13,54                     | 5,38                 | 375,15                     | 13,47                  | 5,23              | 175,79                  | 12,72                | 5,18            | 68,81                 | 13,39                | 4,76            | 172,34             |
| 9000                | 5                                 | 20                         | 2,00                            | 4,59            | 1881             | 15,88                     | 4,28                 | 401,66                     | 15,80                  | 3,94              | 100,29                  | 16,03                | 4,38            | 147,28                | 16,81                | 4,65            | 168,44             |
| 9000                | 3                                 | 240                        | 3,33                            | 4,53            | 1533             | 14,94                     | 4,88                 | 422,36                     | 14,81                  | 4,46              | 180,05                  | 14,79                | 4,22            | 86,53                 | 15,58                | 4,26            | 129,56             |
| 6000                | 3                                 | 240                        | 2,22                            | 4,88            | 1716             | 14,88                     | 5,20                 | 429,66                     | 14,77                  | 4,76              | 182,27                  | 14,90                | 4,68            | 96,20                 | 15,45                | 4,46            | 105,95             |
| 0                   | 1                                 | 480                        | 0,00                            | 6,61            | 3182             | 13,80                     | 5,66                 | 394,83                     | 13,71                  | 5,57              | 185,36                  | 13,37                | 6,27            | 72,30                 | 13,41                | 6,40            | 156,84             |

El FFA formado en la harina integral durante el almacenamiento se correlaciona con la cantidad y la concentración de ácido aplicado como se muestra en la Figura 8. La Figura 8 muestra la formación de free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) en la harina final en función de la concentración del ácido y la cantidad aplicada al trigo. La mayor reducción se observa a más de 0,67 M y el aumento de la cantidad de ácido añadido también reduce la formación de ácidos grasos libres.

La Figura 9 muestra el pH en función de la concentración de ácido para el salvado fino y la harina de reducción. Como se muestra en la Figura 9, la fracción de salvado fino, donde reside la mayor parte de la actividad de lipasa y las fracciones de harina de reducción (parte de harina más próxima al salvado) demuestran una caída significativa en el pH a medida que aumenta la concentración de ácido aplicada al trigo.

Como se muestra en la Figura 10, el nivel de free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) formados en la harina disminuye a medida que disminuye el pH, y la concentración del ácido aplicada al trigo también influye en la formación de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres formados en la harina integral final se reducen a medida que el pH de la harina integral disminuye, como se muestra en la Figura 10. La concentración de ácido aplicada al trigo debe ser superior a un nivel mínimo para observar un efecto preferido en la reducción de la formación de ácidos grasos libres.

La Figura 11 y la Figura 12 muestran el efecto de la concentración de ácido láctico en el agua de atemperado en la relación SRC del ácido láctico/SRC del agua de la harina integral al cabo de 28 días a 33,3 °C (92 °F). El efecto de la concentración de ácido en la absorción de la harina y la resistencia del gluten se muestra en la Figura 11 expresado como la relación de SRC del ácido láctico dividida por la SRC del agua y la SRC del ácido láctico dividida por la SRC del carbonato de sodio en la Figura 12. En todos los casos, las relaciones permanecen al menos tan altas como la harina de control sin tratar, lo que indica que no se produce ningún efecto negativo en la función de la harina.

### Resumen

La estabilización por acidificación reduce la cantidad de ácidos grasos libres formados en la harina integral. El nivel de ácidos grasos libres al cabo de 28 días era de 3.004 ppm en el control sin tratar. La formación de ácido graso de harina a una concentración de ácido láctico de aproximadamente 9.000 ppm y un pH de 4,5 se redujo a 1.425 ppm.

El tiempo de atemperado (de 20 min a 8 horas) tuvo un ligero efecto en el período de validez de la harina integral (WG) medido mediante la formación de ácido graso. En general, la formación libre de ácidos grasos libres disminuye al aumentar la cantidad de ácido añadido y aumentar la concentración de ácido.

La reducción total de ácidos grasos libres formados fue de 16 % de reducción a 54 % de reducción. Se observó una menor reducción con la condición de agua atemperada al 5 % que redujo la concentración de ácido y no fue tan eficaz. Se cree que esta reducción en los ácidos grasos libres, que son un sustrato crítico de la enzima lipoxigenasa, reduce sustancialmente la cantidad de grasa oxidada en la harina por debajo del umbral de aroma/sabor de aproximadamente 3.000 ppm (o 10 % del contenido lipídico total) y, por lo tanto, prolonga sustancialmente el período de validez.

La harina integral estabilizada de ácido láctico demuestra una SRC similar a la harina integral sin tratar. No se observó ninguna tendencia con ninguno de los otros disolventes y la relación de SRC del ácido láctico dividida por la SRC del carbonato de sodio no difirió del control de harina, indicando la baja absorción de harina y el gluten suficientemente resistente que se esperan de una harina de galleta de buena calidad.

#### Ejemplo 8

Efecto del ácido en la inhibición de la actividad de lipasa

El objetivo de este ejemplo fue estudiar el efecto del tipo ácido y la concentración en la actividad de lipasa después de la incubación previa de la enzima durante 40 minutos en solución ácida. Se estudiaron los siguientes ácidos y niveles; (1) 5 ml de ácido láctico (8 g/1.000 ml pH 2,57), añadir 20 µl de lipasa y 980 µl de agua inhibición 40 min; (2) 5 ml de ácido láctico (2 g/1.000 ml pH 2,85), añadir 20 µl de lipasa y 980 µl de agua inhibición 40 min; (3) 5 ml de ácido láctico (16 g/1.000 ml pH 2,48), añadir 20 µl de lipasa y 980 µl de agua inhibición 40 min; (4) 5 ml de ácido acético (1 g/1.000 ml pH 2,80), añadir 20 µl de lipasa y 980 µl de agua inhibición 40 min; (5) 5 ml HCl (4 g/1.000 ml, pH 1,5), añadir 20 µl de lipasa y 980 µl de agua inhibición 40 min; (6) 5 ml de extracto de té verde (8 g/1.000 ml), añadir 20 µl de lipasa y 980 µl de agua inhibición 40 min.

Los resultados se compararon con la actividad enzimática de la lipasa en el control (20 µl de 20u/µl de lipasa Novozyme de *Aespergillus oryzae*, control pH 4,14, añadir 0,29 ml de KOH 0,1 N para ajustar el pH a 7,84, después 20 µl de lipasa y 980 µl de agua, iniciar el temporizador y la valoración volumétrica).

La actividad de lipasa (3.1.1.3) se adaptó a partir del método expuesto en "Worthington, Von.; The Worthington Manual; 1993 de Worthington Biochemical Corporation, 730 Vassar Avenue, Lakewood, New Jersey 08701".

El procedimiento es el siguiente:

Lipasa I.U.B.: 3.1.1.3 Triacilglicerol acilhidrolasa

La pancreatic lipase (lipasa pancreática - PL), una de las enzimas exocrinas del jugo pancreático, cataliza la hidrólisis de ésteres emulsionados de glicerol y ácidos grasos de cadena larga. El sustrato no es una sola molécula, sino una fase acuosa de lípidos agregados (Brockhoff y Jensen 1974). La característica del sustrato funcional son agregados de moléculas de éster, micelas o película monomolecular, interconectados con un medio acuoso. La actividad enzimática se relaciona directamente con la concentración de moléculas de sustrato en la interfase (Esposito y col. 1973; Lagocki y col. 1973). La PL ataca los grupos éster primarios más fácilmente. Los monoglicéridos son sustratos deficientes (los monoglicéridos absorbidos a través de la pared intestinal y reformados como cliomicrones linfáticos son los 2-monoglicéridos). Las lipasas pancreáticas han sido estudiadas en profundidad por Brockhoff y Jensen (1974) y Desnuell (1972). Liberman y Ollis (1975) han descrito la lipasa inmovilizada sobre acero inoxidable y perlas de poliacrilamida. Usando un reactor de reciclado de lecho fluidizado se indica que no se altera la afinidad enzima-sustrato.

Características de lipasa de páncreas porcino:

Hay presentes dos lipasas. La lipasa A es más ácida que la lipasa B; por lo demás, las dos isoenzimas son casi iguales (Verger y col. 1969). Normalmente, un cofactor está unido a las enzimas (Maylie y col. 1971). Dos lipasas adecuadas fueron purificadas por Erlanson y col. (1973). Eran cadenas polipeptídicas bastante similares con un peso molecular de 11.000. Véase también Borgstrom y col. (1974). Borgstrom y Earlanson (1973) indicaron que la co-lipasa se podía clasificar como una co-enzima para la lipasa dado que interactúan en una relación estequiométrica.

Reacción enzimática

Peso molecular: 45.000-50.000 (Verger y col. 1969)

**Composición:** La composición de aminoácidos, que es casi idéntica, excepto por la isoleucina, se muestra en Brockhoff y Jensen (1974)-(Tabla IV-3, pág. 43). Ambas contienen un resto carbohidrato (Gamer y Smith 1972). La histidina está involucrada en el sitio activo (Semeriva y col. 1971). Véase Hultin (1992). La modificación del grupo carboxilo libre mediante formación de amida desactiva la enzima (Semeriva y col. 1972). Según Desnuelle (1972) el carboxilo de la lipasa estabiliza la enzima activa, es decir, la conformación de enzima resultante de la adsorción en una interfase hidrófoba. Aunque la PL contiene dos grupos disulfuro, no participan en la actividad enzimática (Verger y col. 1971). El diisopropilfosforato (DFP) se une a un residuo de tirosina, pero no es inhibitorio (Maylie y col. 1969). Ver también Rovey y col. (1973)

**Coefficiente de extinción:**  $E_{280}^{196}=13,3$  (Desnuelle 1972)

**Punto isoeléctrico:** Lipasa A=4,9 (Brockhoff y Jensen 1974) y lipasa B=5,0

5 **Actividad:** Ver Desnuelle (1972) en «Catalytic Properties» (página 586). Momsen y Brockman (1976a y b) informan de los efectos del taurodesoxicolato y la co-lipasa. A concentraciones bajas, hasta 0,3 mM, la sal de bilis aumenta la estabilidad de la lipasa 5 veces. A niveles más altos (0,3-0,8 mM), pero por debajo de la concentración micelar crítica, interfiere con la adsorción de enzimas en la interfase del sustrato, inhibiendo así la lipólisis. La co-lipasa contrarresta este efecto inhibitorio al proporcionar sitios de unión de alta afinidad en la superficie del complejo de sal de lipasa-bilis. Ver también Borgstrom y Elanson (1973), Bergstrom y col. (1974) y Kaimal y Saroja (1989). La co-lipasa sin sales biliares solo estimula ligeramente la actividad. Brockman y col. (1973) describen la actividad de PL frente a los triglicéridos solubles, tales como la tripropionina. Es estimulada en presencia de superficies hidrófobas. Sangram y Beagle (1971) indican que la proteína quinasa,  $Mg^{2+}$ , ATP y la cAMP estimulan la actividad de PL.

15 **Especificidad:** La PL tiene un amplio espectro de especificidad de cadena lateral (Lagociki y col. 1973). Ver también Savary (1972) y Brockhoff (1969a)

**Activadores:** Para la actividad se requiere  $Ca^{2+}$  [ $Sr^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  son activadores menos eficaces (Sarda y col 1957)].

20 **Inhibidores:** Versene,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , yodo, PCMB (Willis 1960). El DFP no inhibe.

**Estabilizantes:** El DFP se puede usar para estabilizar preparaciones impuras que contienen proteinasas en soluciones.

25 **Estabilidad:** Las preparaciones homogéneas, altamente purificadas, de lipasa de páncreas porcino son extremadamente lábiles.

Ensayo enzimático de LIPASA (EC 3.1.1.3)

Principio:



**Condiciones:** T = 25 °C, pH = 8,0

35 **Método:** Por valoración

**Reactivos:**

- 40 A. Sustrato de aceite de oliva (aceite de oliva) (usar sustrato de lipasa Sigma, materia prima Sigma n.º 800-1)  
 B. Solución de cloruro de sodio 3.000 mM (NaCl) (preparar 100 ml en agua desionizada utilizando cloruro de sodio, prod. Sigma n.º S-9625.)  
 C. 0,5 % Albúmina. Preparar cada día para que sea reciente.  
 D. Se coloca una solución de cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) 75 mM (preparar 25 ml en agua desionizada utilizando cloruro de calcio dihidratado, prod. Sigma n.º C-3881.)  
 45 E. Solución estándar de hidróxido de sodio (NaOH) 10 mM estandarizada (preparar 50 ml en agua desionizada fría utilizando hidróxido de sodio, anhidro, solución madre Sigma n.º 505-8. Estandarizar según el procedimiento de reactivo ACS).  
 F. Solución de cloruro de calcio 5 mM (preparar 25 ml en agua desionizada utilizando cloruro de calcio dihidratado, prod. Sigma n.º C-3881).  
 G. Solución de enzima lipasa (inmediatamente antes del uso, preparar una suspensión que contiene 20.000 -  
 50 30.000 unidades/ml de lipasa en el reactivo frío F).  
 H. Emulsión de aceite de oliva/goma arábiga: Preparar disolviendo 16,5 gramos de goma arábiga en 130 ml de agua grado reactivo. Una vez que el material está en solución, diluir hasta un volumen final de 165 ml con agua de grado reactivo. Añadir 20 ml de aceite de oliva de grado reactivo y 15 gramos de hielo picado. Mezclar la mezcla en un mezclador Waring a baja velocidad durante 3 minutos y filtrar la emulsión a través de lana de vidrio.  
 55 Preparar cada día para que sea reciente.

Enzima:

60 Disolver la enzima a una concentración de 1 mg/ml en agua de grado reactivo. Se prepara una dilución adicional en cloruro de calcio 5 mM.

Procedimiento:

## ES 2 761 849 T3

La valoración volumétrica se puede medir con un pH-metro de laboratorio (un pH-metro Corning 360i equipado con un electrodo de pH de combinación de alto rendimiento A-58905-66).

| Reactivos                          | Volumen (ml) |
|------------------------------------|--------------|
| Agua desionizada                   | 5,00         |
| Reactivo H (aceite de oliva)       | 5,00         |
| Reactivo B (NaCl)                  | 2,00         |
| Reactivo de C (albúmina)           | 2,00         |
| Reactivo de D (CaCl <sub>2</sub> ) | 1,00         |

- 5 Determinación de velocidad del blanco: ajustar el pH de la mezcla de reacción a 8,0 y registrar el volumen de solución de valoración para mantener el pH a 8,0 durante 3-4 minutos después de conseguir una velocidad constante. Determinar la «velocidad del blanco» como el volumen de solución de valoración añadido por minuto a partir de la parte lineal final de la curva.
- 10 Determinación de la muestra: a tiempo cero, añadir la enzima diluida adecuadamente y ajustar el pH a 8,0 si fuera necesario. Registrar el volumen de solución de valoración requerido para mantener el pH a 8,0 durante 5-6 minutos. Determinar la «velocidad de muestra» como el volumen de solución de valoración añadida por minuto a partir de la parte lineal de la curva.
- 15 Cálculos:

$$\text{Unidades/}\mu\text{l de enzima} = \frac{(\text{blanco de la muestra}) \times \text{normalidad de la base} \times 1.000}{\mu\text{l de enzima en la mezcla de reacción}}$$

- 20 **REFERENCIA:** (1993) *Reagent Chemicals ACS Specifications*, 8ª ed. **95** Worthington, C.C (1988) en *Worthington Enzyme Manual* (Worthington, C.C. ed.) 212-214, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ

Notas:

- 25 1 La estandarización de la solución de NaOH se describe en (1993) *Reagent Chemicals ACS Specifications*.  
 2 Este ensayo se basa en las referencias citadas.  
 3 Cuando se especifican los números de producto Sigma o de materia prima, pueden sustituirse los reactivos equivalentes.
- 30 Tabla 15. Actividad de lipasa medida

| Pretratamiento de ácido | Pretratamiento de ácido (g/15 ml) | Pretratamiento de ácido (M) | pH de pretratamiento de ácido | Actividad de lipasa (unidades/ $\mu$ l) |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---|
| Ninguno (agua)          | 0                                 | 0                           | 7                             | 6,69                                    |
| Ácido láctico           | 0,08                              | 0,059                       | 2,48                          | 4,15                                    |
| Ácido láctico           | 0,04                              | 0,030                       | 2,57                          | 5,8                                     |
| Ácido acético           | 0,005                             | 0,006                       | 2,8                           | 5,33                                    |
| Ácido láctico           | 0,02                              | 0,015                       | 2,85                          | 6,45                                    |
| Ácido clorhídrico       | 0,02                              | 0,036                       | 1,5                           | 0                                       |
| <b>Antioxidante</b>     |                                   |                             |                               |   |
| Extracto de té verde    | 0,04                              | --                          | 6,36                          | 5,77                                    |

Se calcula la concentración de ácido:

- 35 **Peso seco total de ácido/peso molecular ácido = moles de ácido**  
**Total de agua (15 ml)/1.000 = agua total (l)**  
 [conc. ácido] = moles de ácido/litro agua = concentración molar (M)

Resumen

- 40 Cada tipo de ácido, y concentración probada, disminuyó la actividad enzimática tras un pretratamiento de 40 minutos en comparación con el control (sin ácido utilizado en el pretratamiento). Se observó que la actividad enzimática era menor después del tratamiento a una concentración más alta de ácido y a un pH más bajo. Los valores de pH extremadamente bajos, tales como pH 1,5, dieron lugar a una pérdida completa de actividad para la enzima. Los extractos de té verde también inhibieron la actividad de lipasa.
- 45

Ejemplo 9

## Efecto del atemperado antioxidante en la estabilidad de la harina integral

El objetivo de este ejemplo fue analizar el efecto del atemperado de antioxidante en la estabilidad de la harina integral durante el almacenamiento. La cantidad de ácidos grasos libres formados se midió después del almacenamiento de la harina en un frasco de vidrio sellado durante 30 días en condiciones de almacenamiento acelerado de 82 °F. La harina integral se preparó según el proceso descrito en los ejemplos 1 y 2. Los antioxidantes sometidos a ensayo fueron: (1) harina de trigo rojo blando sin tratar (control); (2) harina de trigo rojo blando tratada con celulosa; (3) harina de trigo rojo blando tratada con NaCl; (4) harina de trigo rojo blando tratada con TBHQ; (5) harina de trigo rojo blando tratada con extracto de romero; (6) harina de trigo rojo blando tratada con extracto de té verde; (7) harina de trigo rojo blando tratada con ácido láctico a pH 6,16; (8) harina de trigo rojo blando tratada con ácido fosfórico a pH 5,67; (9) harina de trigo rojo blando tratada con ácido fosfórico a pH 4,64; (10) harina de trigo rojo blando tratada con ácido clorhídrico a pH 5,55; (11) harina de trigo rojo blando tratada con BHT en la forma descrita en el ejemplo 1. El trigo atemperado se trituro a harina del modo descrito en el ejemplo 2. Las cantidades de los ácidos grasos libres formados en la harina integral después del almacenamiento se compararon con la cantidad de ácidos grasos libres formados en la harina de control sin tratar. Se prepararon harinas integrales con una proporción natural de componente de salvado y endosperma obtenidos de la molienda de harina. El contenido de ceniza de harina integral se utilizó para confirmar la composición.

El contenido de ácidos grasos libres de la harina integral (harina fresca y harina envejecida) se determinó según el método descrito en el ejemplo 3.

La Tabla 16 contiene los resultados de los ácidos grasos libres totales formados en la harina integral tras un almacenamiento de hasta 6 semanas a 82 °F. Se muestran: (1) tipo de tratamiento (2) cantidad de tratamiento (3) actividad de lipasa (4) pH (5) hexanal (6) concentración de ácidos grasos libres

Tabla 16. Efecto del tratamiento antioxidante del trigo en el nivel de FFA de la harina integral después del envejecimiento

|                      | Cantidad de inhibidor de lipasa (peso seco de ácido/peso inicial de semilla) ppm) | [conc. inhibidor de lipasa] (m) | Actividad de lipasa (unidad/g) | pH harina | Actividad de lipasa (unidad/g) | FFA semana 0 (ppm) | FFA semana 6 (ppm) |
|----------------------|---|---------------------------------|--------------------------------|-----------|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| Control              | 0   | 0,00                            | 379,2                          | 6,6       | 154,6                          | 828                | 4576               |
| Celulosa             | 7000  | --                              | 389,1                          | --        | 225,8                          | --                 | --                 |
| NaCl                 | 3000  | 5,13                            | 371,1                          | --        | 209,5                          | --                 | --                 |
| TBHQ                 | 200   | 0,12                            | 171,5                          | --        | 137,6                          | 739                | 3867               |
| Extracto de romero   | 7000  | --                              | 290,1                          | --        | 104,1                          | 1522,5             | 4216               |
| Extracto de té verde | 7000  | --                              | 216,9                          | 6,5       | 117,6                          | 709,5              | 3718               |
| Ácido láctico        | 3000  | 3,33                            | 305,0                          | 5,6       | 120,9                          | 563                | 2496               |
| BHT                  | 200   | 0,09                            | 360,1                          | --        | 164,3                          | --                 | --                 |

## Resumends

El contenido de ácido graso en la harina integral después del almacenamiento a 27,8 °C (82 °F) se redujo en comparación con el control cuando el trigo se trató con extracto de té verde o ácido láctico. Se observó poca reducción en el contenido de ácidos grasos libres para otros tratamientos analizados.

## Ejemplo 10

## Tratamiento con ácido de salvado aparte

El objetivo de este ejemplo es analizar la eficacia de estabilización del tratamiento ácido de salvado separado. Se añade agua con ácido láctico al salvado y germen que se separa del endosperma, ya sea como partículas de salvado grueso o después de moler el salvado obteniendo partículas más finas. Tras añadir ácido láctico, algunas de las muestras se estabilizan adicionalmente aplicando calor durante 10 min a 90 °C. Se recombinan el salvado y el germen a la proporción natural de salvado, germen y endosperma para elaborar harina integral. Las proporciones naturales se lograron recombinando el salvado al 32 %, y el endosperma hasta el 68 %, del peso de la harina final. La harina integral se coloca en un recipiente sellado y se almacena a 37,8 °C (100 °F) durante 30 días. La actividad de lipasa y los ácidos grasos libres formados en la harina se miden al comienzo y al final del almacenamiento para evaluar la frescura y estabilidad de la harina a lo largo del tiempo. El cambio en la calidad de la harina se mide mediante la capacidad de retención del solvente.

## Material:

- (1) Germen/salvado grueso separado de trigo blanco blando
- (2) Salvado/germen triturado grueso
- (3) Agua o ácido láctico en agua
- (4) Endosperma

La lipasa se mide según el método descrito en el ejemplo 2, los ácidos grasos de la harina se miden según el método descrito en el ejemplo 3 y la calidad de la harina se mide según la prueba de capacidad de retención de disolvente descrita en el ejemplo 4.

5 La Tabla 17 muestra las harinas generadas separando el salvado y el germen del endosperma, y añadiendo ácido láctico disuelto en agua a salvado grueso finamente triturado. La cantidad de ácido láctico añadida al salvado se indica en la tabla. En los casos donde se muestra, el salvado también se trata con calor durante 10 minutos a 90 °C después de añadir el ácido.

10 Tabla 17: Harinas producidas

| Harina integral  | % Salv. y ger. extraído durante la molienda | Cantidad de ácido láctico (ácido, dwb/peso harina final) ppm | Agua añadida total (g/100g salv. y ger.) | Concentración de ácido en agua (M) | Humedad integr. | Calor 90 °C 10 min | Ácido (moles/45,4 kg (100 libras) harina final) |
|--|---|--|--|------------------------------------|-----------------|--------------------|---|
| Harina integral, salvado grueso  | 32  | 0  | 6,25                                     | 0                                  | 14,126          | no                 | 0,0000  |
| Harina integral, salvado fino con 6,25 g de agua/100g salv. y ger.     | 32  | 0  | 6,25                                     | 0                                  | 13,488          | no                 | 0,0000  |
| Harina integral, salvado grueso, 6.000                                 | 32  | 6000   | 6,25                                     | 3,33                               | 13,638          | no                 | 3,0276  |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 con 6,25g agua/100g salv. y ger.  | 32  | 6000   | 6,25                                     | 3,33                               | 13,588          | no                 | 3,0276  |
| Harina integral, salvado fino  | 32  | 0  | 3,75                                     | 0                                  | 12,735          | no                 | 0,0000  |
| Harina integral, salvado fino, calor                                   | 32  | 0  | 3,75                                     | 0                                  | 12,954          | sí                 | 0,0000  |
| Harina integral, salvado fino, 3.000                                   | 32  | 3000   | 3,75                                     | 2,77                               | 12,991          | no                 | 1,5138  |
| Harina integral, salvado fino, 3.000 + calor                           | 32  | 3000   | 3,75                                     | 2,77                               | 12,849          | sí                 | 1,5138  |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 con 3,75 g agua/100g salv. y ger. | 32  | 6000   | 3,75                                     | 5,55                               | 12,742          | no                 | 3,0276  |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 + calor                           | 32  | 6000   | 3,75                                     | 5,55                               | 12,959          | sí                 | 3,0276  |
| Harina integral, salvado fino, 10.000                                  | 32  | 10.000   | 3,75                                     | 9,25                               | 12,298          | no                 | 5,0460  |
| Harina integral, salvado fino, 10.000 + calor                          | 32  | 10.000   | 3,75                                     | 9,25                               | 12,112          | sí                 | 5,0460  |

15 La Tabla 18 contiene los resultados de los ácidos grasos libres totales formados en la harina integral después de un almacenamiento de hasta 30 días a 37,8 °C (100 °F). Se muestran: (1) Harina (2) ácido (peso seco/peso salvado) (3) calor (4) % de endosperma para obtener harina integral (5) pH salvado (6) tamaño de partículas (9) actividad de lipasa (10) concentración de ácidos grasos libres, inicial y 21 días (11) % inhibición de formación de FFA en la harina almacenada

20 Tabla 18. Estabilidad de la harina integral elaborada con salvado y germen tratados con ácido o con ácido + calor-humedad.

|  | Agua añadida total (g/100g salv. y ger.) | Cantidad de ácido láctico (ácido, dwb/peso harina final) ppm | Calor 90 °C 10 min | % peso de endosperma de harina | pH integr. | Ro-tap a través de 100 | Actividad de lipasa (unidades/g) | FFA inicial (ppm) | % inhibición de lipasa | FFA ppm 30 d 100 % | % FFA inhibición |
|--|--|--|--------------------|--------------------------------|------------|------------------------|----------------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| Harina integral, salvado grueso                                    | 6,25                                     | 0  | no                 | 68                             | 5,86       | 41,66                  | 215                              | 1107              | 0                      | 2551               | 0,00             |
| Harina integral, salvado fino con 6,25 g de agua/100g salv. y ger. | 6,25                                     | 0  | no                 | 68                             | 6,14       | 61,64                  | 382                              | 1309              | 0                      | 5374               | 0,00             |
| Harina integral, salvado grueso, 6000                              | 6,25                                     | 6000   | no                 | 68                             | 4,23       | 42,12                  | 174                              | 1144              | 19,1                   | 2077               | 18,58            |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 con 6,25g agua/100g           | 6,25                                     | 6000   | no                 | 68                             | 4,47       | 63,64                  | 280                              | 1218              | 26,7                   | 3412               | 36,51            |

ES 2 761 849 T3

|   |      |        |    |    |      |       |     |      |       |      |       |  |
|---|------|--------|----|----|------|-------|-----|------|-------|------|-------|--|
| salv. y ger.  |      |        |    |    |      |       |     |      |       |      |       |  |
| Harina integral, salvado fino   | 3,75 | 0      | no | 68 | 6,12 | 66,01 | 423 | 1319 | 0     | 5523 | 0,00  |  |
| Harina integral, salvado fino, calor                                      | 3,75 | 0      | sí | 68 | 6,15 | 64,70 | 249 | 1299 | 41,13 | 5511 | 0,22  |  |
| Harina integral, salvado fino, 3.000                                      | 3,75 | 3000   | no | 68 | 5,04 | 63,86 | 325 | 1274 | 23,17 | 3847 | 30,35 |  |
| Harina integral, salvado fino, 3.000 + calor                              | 3,75 | 3000   | sí | 68 | 5,07 | 62,68 | 222 | 1229 | 47,52 | 3689 | 33,21 |  |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 con 3,75 g de agua/100g salv. y ger. | 3,75 | 6000   | no | 68 | 4,45 | 64,68 | 296 | 1227 | 30,02 | 3367 | 39,04 |  |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 + calor                              | 3,75 | 6000   | sí | 68 | 4,50 | 63,34 | 121 | 1167 | 71,39 | 2541 | 53,99 |  |
| Harina integral, salvado fino, 10.000                                     | 3,75 | 10.000 | no | 68 | 3,97 | 63,84 | 232 | 1146 | 45,15 | 2788 | 49,52 |  |
| Harina integral, salvado fino, 10.000 + calor                             | 3,75 | 10.000 | sí | 68 | 3,99 | 64,72 | 73  | 1140 | 82,74 | 1731 | 68,66 |  |

La capacidad de retención de disolvente de cada harina durante el almacenamiento se usa para evaluar la calidad de la harina después de cada tratamiento respectivo. Es especialmente importante la resistencia del gluten de la harina medida mediante el mantenimiento de la retención de disolvente del ácido láctico que indica que el gluten de la harina sigue siendo funcional. La absorción general de la harina debe permanecer baja e inalterada con respecto a los valores de control. La Tabla 3 muestra el perfil de SRC de cada harina.

5

Tabla 19 Prueba de capacidad de retención de disolvente

|  | agua  | Sacarosa | Carbonato de sodio | Ácido láctico | Ceniza (base 14 %) |
|--|-------|----------|--------------------|---------------|--------------------|
| Harina integral, salvado grueso  | 60,36 | 65,66    | 68,89              | 64,12         | 1,33               |
| Harina integral, salvado fino con 6,25 g de agua/100g salv. y ger.     | 64,97 | 73,36    | 76,21              | 70,89         | 1,48               |
| Harina integral, salvado grueso, 6.000                                 | 57,94 | 66,13    | 67,94              | 63,20         | 1,18               |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 con 6,25g agua/100g salv. y ger.  | 60,05 | 68,81    | 75,45              | 67,81         | 1,38               |
| Harina integral, salvado fino  | 65,88 | 74,10    | 77,93              | 67,46         | 1,44               |
| Harina integral, salvado fino, calor                                   | 64,71 | 73,63    | 79,97              | 67,33         | 1,42               |
| Harina integral, salvado fino, 3.000                                   | 61,96 | 70,15    | 75,82              | 66,59         | 1,39               |
| Harina integral, salvado fino, 3.000 + calor                           | 61,38 | 70,50    | 77,12              | 65,12         | 1,42               |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 con 3,75 g agua/100g salv. y ger. | 61,82 | 71,12    | 74,53              | 66,11         | 1,35               |
| Harina integral, salvado fino, 6.000 + calor                           | 60,85 | 70,14    | 76,36              | 65,68         | 1,46               |
| Harina integral, salvado fino, 10.000                                  | 62,59 | 70,68    | 76,72              | 66,23         | 1,45               |
| Harina integral, salvado fino, 10.000 + calor                          | 63,71 | 69,44    | 75,96              | 65,60         | 1,39               |

10

Sumario

El tratamiento ácido de salvado y germen mejoró los métodos convencionales de estabilización, como el tratamiento térmico. La actividad de lipasa, 141 unidades/g y los ácidos grasos libres formados de 1.127 ppm en harina, preparados a partir de salvado tratado tanto con ácido como con calor, son menores que el control no tratado, 282 unidades/g y 3.941 ppm e inesperadamente inferiores que para el salvado estabilizado con tratamiento térmico solamente (201 unidades/g y 3.014 ppm). La ventaja de la estabilización mejorada de tratamiento ácido combinado con un tratamiento térmico permite una disminución de la actividad de lipasa y una disminución del nivel de ácidos grasos libres formados

15

durante el almacenamiento, que no se puede conseguir mediante tratamiento ácido o tratamiento térmico solos. Hay un efecto sinérgico significativo del ácido más la estabilización térmica que reduce el nivel de ácidos grasos libres formados en un 71,40 % frente a solamente un 23,5 % del nivel de reducción de ácidos grasos libres con tratamiento térmico solamente o tan solo un 37,66 % de reducción con tratamiento con ácido solamente.

5

Ejemplo 11

Efecto sinérgico de estabilización sin calor y estabilización térmica

10 El objetivo de este ejemplo fue identificar el efecto sinérgico entre la estabilización sin calor y la estabilización por calor en el período de validez de la harina integral.

Material:

15 (1) Ensayo de molienda de cereal integral:

- Las semillas de trigo se atemperaron con/sin ácido láctico (6.000 ppm), durante las 4 horas típicas 2 % de agua de atemperado.
- Control de harina de trigo integral SWW atemperada: se usaron 160 kg de agua por 8.000 kg de trigo integral
- 20 • Harina integral SWW atemperada con ácido láctico: Se usaron 76,72 kg de agua y 27,28 kg de ácido láctico por 4.000 kg de trigo integral.
- Después de 4 días de atemperado, el trigo fue molido en un molino de harina. Se recolectó salvado y germen con/sin ácido láctico; también se recolectó endosperma con/sin ácido láctico.

25 (2) Estabilización de salvado y germen por calor/humedad en el laboratorio.

Se envasaron 30 g de salv. y ger. sin ácido láctico en una bolsa de papel metálico (17,8 cm x 16,5 cm (7 pulgadas x 6,5 pulgadas) con 9 orificios; a continuación se calentó la bolsa a 140 °C durante 10 min.

30 Se envasaron 30 g de salv. y ger. con ácido láctico en una bolsa de papel metálico (17,8 cm x 16,5 cm (7 pulgadas x 6,5 pulgadas 7) con 9 orificios; a continuación se calentó la bolsa a 140 °C durante 10 min.

La reconstitución de harina integral se muestra en la Tabla 20:

35 Tabla 20. Reconstitución de harina integral (WG)

| Harina integral   | 24 % de salvado y germen                   | 76 % de endosperma                     |
|---|--|--|
| Control preparado sin tratamiento de salv. y ger.                     | Salvado y ger. sin ácido láctico sin calor | Endosperma sin ácido láctico sin calor |
| Harina integral elaborada con salv. y ger. tratados térmicamente      | Salvado y ger. sin ácido láctico con calor | Endosperma sin ácido láctico sin calor |
| Harina integral elaborada con salv. y ger. tratados con ácido         | Salvado y ger. con ácido láctico sin calor | Endosperma con ácido láctico sin calor |
| Harina integral fabricada con salv. y ger. tratados con ácido + calor | Salvado y ger. con ácido láctico con calor | Endosperma con ácido láctico sin calor |

Se analizaron el contenido de free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) y la actividad de lipasa de las harinas integrales (harina fresca y harina envejecida 33 días) que se prepararon según el método descrito en el ejemplo 4, y los resultados se muestran en la Tabla 21. La distribución de tamaño de partículas de las harinas se muestra en la Tabla 22: Las muestras de la invención contienen una cantidad del inhibidor durante el tratamiento, que es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por cada 45,36 kg (100 libras) de granos enteros.

40

Tabla 21. Estabilización: ácido + calor

45

50

| Cantidad de ácido láctico (peso seco de ácido/ peso inicial) | Tiempo de atemperado (min) | Nivel de agua de atemperado (%) | [conc. ácido] (M) | Agua añadida (g) por 1.000 g de trigo | Cantidad 88,5 % láctico (g) por 1.000g de trigo | Ácido (moles/ 45,4 kg (100 libras) harina final) | % salv. y ger. extraído durante la molienda | Salv. y ger. % humedad | Tratamiento térmico (temp/ tiempo) | Peso de endosperma de harina | Salv. y ger. peso de harina | Actividad de lipasa (unidades/g) | FFA inicial (ppm) | FFA; 33 día a 100 °F (ppm) | % Inhibición | pH integr. |
|--|----------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------------|---|--|---|------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------|------------|
|--|----------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------------|---|--|---|------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------|------------|

|   | semilla)<br>ppm |         |   |      |       |      |      |       |      |              |       |       |     |     |      |       |      |
|---|-----------------|---------|---|------|-------|------|------|-------|------|--------------|-------|-------|-----|-----|------|-------|------|
| Control preparado sin tratamiento de salv. y ger.                     | 0               | 240 min | 2 | 0    | 20    | 0    | 0    | 23    | 5,75 | 0            | 82,76 | 38,55 | 282 | 628 | 3941 | 0     | 6,27 |
| Harina integral elaborada con salv. y ger. tratados térmicamente      | 0               | 240 min | 2 | 0    | 20    | 0    | 0    | 22,82 | 5,07 | 140C, 10 min | 82,76 | 38,27 | 201 | 610 | 3014 | 23,52 | 6,25 |
| Harina integral elaborada con salv. y ger. tratados con ácido         | 6000            | 240 min | 2 | 3,49 | 19,18 | 6,82 | 3,04 | 23    | 4,65 | 0            | 82,76 | 38,10 | 241 | 579 | 2457 | 37,66 | 4,85 |
| Harina integral fabricada con salv. y ger. tratados con ácido + calor | 6000            | 240 min | 2 | 3,49 | 19,18 | 6,82 | 3,04 | 22,92 | 4,32 | 140C, 10 min | 82,76 | 37,97 | 141 | 655 | 1127 | 71,4  | 4,89 |

Tabla 22. Tamaño de partículas de harina

|   | MB Ceniza<br>harina integral | Rotap + 40 | Rotap + 50 | Rotap + 60 | Rotap + 70 | Rotap + 80 | Rotap + 100 | Rotap a través<br>de 100 | Total  |
|---|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------------------------|--------|
| Control preparado sin tratamiento de salv. y ger.                     | 1,88                         | 0,18       | 2,22       | 2,3        | 1,4        | 2,22       | 2,46        | 88,78                    | 99,56  |
| Harina integral elaborada con salv. y ger. tratados térmicamente      | 1,87                         | 0,16       | 2,44       | 2,48       | 1,62       | 2,54       | 3,84        | 87,3                     | 100,38 |
| Harina integral elaborada con salv. y ger. tratados con ácido         | 1,84                         | 0,04       | 2          | 2,22       | 1,62       | 2,26       | 2,64        | 88,24                    | 99,02  |
| Harina integral fabricada con salv. y ger. tratados con ácido + calor | 1,84                         | 0,08       | 2,52       | 2,52       | 1,72       | 2,48       | 3,06        | 86,52                    | 98,9   |

5 Resumen

Como se muestra en las Tablas 20-22:

- La harina integral tratada con Lactic Acid (Ácido Láctico - LA) con estabilización térmica redujo la actividad de lipasa de 241 a 141 unidades/g en comparación con harina integral tratada con LA sin estabilización térmica.
- La harina integral tratada con LA con estabilización térmica redujo el nivel de free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) de 2.457 a 1.127 ppm en comparación con la harina integral tratada con LA sin estabilización térmica.
- Existe un efecto sinérgico significativo (inhibición del 71,40 %) entre el caso con estabilización térmica y sin estabilización térmica (inhibición de combinación 23,5 % + 37,66 %).

15 Ejemplo 12

En este ejemplo, las propiedades sensoriales de un control de harina de trigo integral estabilizada térmicamente, harinas de trigo integral estabilizadas utilizando tanto estabilización térmica como ácido láctico como inhibidor de lipasa según la presente invención, y galletas de bajo contenido en grasa o galletas saladas Graham, elaboradas con las harinas estabilizadas fueron evaluadas por un panel de expertos. Las harinas de trigo integral estabilizadas que se usaron habían sido envejecidas durante 58 días cuando se fabricaron las galletas, y las galletas fueron envejecidas durante seis semanas antes de evaluar sus propiedades sensoriales. Se determinó el nivel de free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) de la harina a 38,9 °C (102 °F) el día 0, y los días 30, 45 y 60.

25 Cada una de las muestras de harina de trigo integral estabilizadas térmicamente o tandas evaluadas tenía aproximadamente la misma distribución de tamaño de partículas. La estabilización térmica para cada muestra se llevó a cabo de forma similar utilizando una temperatura de estabilización térmica de 86,7 °C (188 °F) para la muestra de control y también para las muestras producidas utilizando tanto estabilización térmica como ácido láctico. Los niveles de hidratación del salvado usados en la estabilización fueron de 4,5 % en peso y 7,5 % en peso. La cantidad de ácido láctico utilizada en la estabilización fue de 0 para la muestra de control y 3.000 ppm y 6.000 ppm, en base al peso de la harina integral para las muestras de la presente invención. Las harinas de trigo integral estabilizadas evaluadas se muestran en la Tabla 23:

Tabla 23: Muestras evaluadas de harina de trigo integral estabilizada

| Muestra (tanda) | Harina envejecida (días) | Nivel de hidratación del salvado (% en peso) | Ácido láctico (ppm) | Temperatura de estabilización (°F) | Tipo de estabilización |
|-----------------|--------------------------|--|---------------------|------------------------------------|------------------------|
|-----------------|--------------------------|--|---------------------|------------------------------------|------------------------|

|             |    |     |       |     |                   |
|-------------|----|-----|-------|-----|-------------------|
| 1 (Control) | 58 | 7,5 | 0     | 188 | Calor solo        |
| 2           | 58 | 7,5 | 6.000 | 188 | Calor + sin calor |
| 3           | 58 | 7,5 | 3.000 | 188 | Calor + sin calor |
| 4           | 58 | 4,5 | 6.000 | 188 | Calor + sin calor |
| 5           | 58 | 4,5 | 3.000 | 188 | Calor + sin calor |

Cada masa empleada para producir las galletas contenía la misma cantidad de harina de trigo integral estabilizada que era de aproximadamente 57 % en peso con respecto al peso de la masa y las mismas cantidades de sacarosa, aceite, sólidos de leche en polvo sin grasa, jarabe de maíz de alto contenido en fructosa, bicarbonato de amonio, bicarbonato de sodio y agua. Las masas se produjeron mezclando los ingredientes en un recipiente de mezclado con palas de tipo farinograph con camisa, se aplicaron las masas en capas, se laminaron y cortaron en trozos y se hornearon para obtener galletas con un contenido de humedad de 3,5 % en peso.

Metodología de evaluación de las propiedades sensoriales

Un panel descriptivo (n=12) evaluó los productos. Los panelistas se seleccionaron atendiendo a su agudeza sensorial y su capacidad descriptiva. Desarrollaron un vocabulario para describir las características de las muestras a lo largo de todas las modalidades mediante sesiones de discusión moderadas.

Los panelistas evaluaron las muestras, individualmente, utilizando el vocabulario que habían creado. Las muestras se presentaron enmascaradas y en un diseño equilibrado para minimizar el sesgo debido al orden de presentación. Cada panelista evaluó todos las propiedades de cada uno de los productos tres veces.

Los datos se recogieron mediante el uso de un sistema de recogida de datos en la red (Compusense at Hand, Canadá). La escala de línea no estructurada utilizada para la evaluación se convirtió electrónicamente en una escala de 100 puntos para el análisis.

Atributos y definiciones utilizados para evaluar el conjunto de muestras

En la Tabla 24 se muestran las propiedades sensoriales, las definiciones de propiedades, y el criterio o las instrucciones de los panelistas para realizar las evaluaciones de las propiedades sensoriales:

Tabla 24: Atributos sensoriales, definiciones de atributos e instrucciones para los criterios

|   |   |
|---|---|
| <b>Aroma</b> - Instrucciones de toma de decisión: Coloque la muestra en la nariz y evalúe los siguientes atributos del aroma:   |   |
| PROPIEDAD   | DEFINICIÓN  |
| Harina<br>(Débil-fuerte)  | La intensidad de un aroma de harina, que recuerda a una bolsa de harina blanca que se ha abierto.   |
| <b>Sabor</b> - Instrucciones de toma de decisión: Tome 1 bocado, aproximadamente 1/3 de un rectángulo, de uno en uno, masticar y evaluar las siguientes propiedades de sabor:   |   |
| Dulce<br>(Débil - fuerte)   | La intensidad de un sabor dulce en la boca, reminescente de azúcar de confitería.   |
| Canela (Débil-Fuerte)   | La intensidad de un sabor de canela, reminescente de canela molida o de canela Teddy Grahams.   |
| <b>Retrogusto/efecto a posteriori</b> - Instrucciones de toma de decisión: Tomar un bocado de la galleta salada, masticar y tragar. Espere 15 segundos tras tragar para evaluar los siguientes atributos del regusto/secuela. |   |
| Horneado/tostado (Débil-Fuerte)   | La intensidad de un retrogusto horneado/tostado. Un retrogusto tostado/horneado es reminescente de la corteza ligeramente horneada del pan italiano. Un retrogusto horneado/tostado fuerte es reminescente del pan muy tostado. |
| Vainilla<br>(Débil-fuerte)  | La intensidad de un retrogusto de vainilla, reminescente de la nota en la mezcla para preparar tartas de color amarillo.  |
| Miel<br>(Débil-fuerte)  | La intensidad de un retrogusto de miel, reminescente del retrogusto de miel en miel Teddy Grahams.  |
| Adherencia a los dientes (Ligera-Alta)  | La medida de la cantidad de galleta salada aún pegada a los dientes y/o la boca.  |
| Cantidad de material en forma de partículas (un poco-mucho)   | La medida de la cantidad de partículas, o migas, percibidas que perduran en la boca.  |

Los promedios de las propiedades sensoriales correspondientes a las características de aroma, sabor y retrogusto/efecto a posteriori de las muestras de galleta durante su período de validez se muestran en la Tabla 25:

Tabla 25: Promedios de propiedades sensoriales correspondientes a las características de aroma, sabor, y retrogusto/efecto a posteriori de las galletas durante el periodo de validez

| ID y atributos de la muestra | Muestra 1 (ciclo) (control) | Muestra (ciclo) 2 | Muestra (ciclo) 3 | Muestra (ciclo) 4 | Muestra (ciclo) 5 |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|

## ES 2 761 849 T3

|   |       |       |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Harina envejecida (días)                        | 58    | 58    | 58    | 58    | 58    |
| Nivel de hidratación del salvado (% en peso)    | 7,5   | 7,5   | 7,5   | 4,5   | 4,5   |
| Nivel de ácido láctico (ppm)                    | 0     | 6.000 | 3.000 | 6.000 | 3.000 |
| Producto envejecido (semanas)                   | 6     | 6     | 6     | 6     | 6     |
| Aroma de harina                                 | 9,62  | 8,94  | 8,64  | 8,49  | 8,52  |
| Sabor dulce                                     | 29,91 | 32,30 | 33,41 | 33,14 | 32,08 |
| Aromatizante de canela                          | 9,47  | 12,68 | 11,21 | 11,45 | 11,43 |
| Retrogusto tostado horneado                     | 30,42 | 32,15 | 34,02 | 33,39 | 38,69 |
| Retrogusto vainilla                             | 16,95 | 19,38 | 16,51 | 18,90 | 15,52 |
| Retrogusto miel                                 | 22,96 | 23,59 | 23,16 | 25,77 | 20,77 |
| Efecto a posteriori de adherencia a los dientes | 53,82 | 51,81 | 51,46 | 50,90 | 51,57 |
| Efecto a posteriori de cantidad de partículas   | 36,98 | 31,04 | 35,99 | 35,38 | 34,47 |
| FFA en el día 0                                 | 895   | 939   | 849   | 960   | 854   |
| FFA en el día 30                                | 2391  | 2023  | 1779  | 1640  | 1766  |
| FFA en el día 45                                | 2862  | 2346  | 2127  | 1986  | 2190  |
| FFA en el día 60                                | 3384  | 2571  | 2791  | 2237  | 2386  |

### Discusión de los resultados

- 5 Como se muestra en la Tabla 25, la harina integral que se había estabilizado utilizando tanto tratamiento con ácido láctico como de calor ligero (86,7 °C (188 °F)) dio lugar a artículos horneados con una mayor retención del sabor dulce de al menos 32,08 unidades de escala (tandas 2, 3, 4, y 5) en comparación con una puntuación de 29,91 de unidades de escala (tanda 1) para el control en el que se utilizó harina integral, estabilizada solamente con estabilización mediante calor ligero (86,7 °C (188 °F)) y sin tratamiento con ácido láctico, para un aumento de la puntuación de sabor dulce de al menos 7,2 %.
- 10 También, como se muestra en la Tabla 25, la harina integral que se había estabilizado utilizando tanto tratamiento con ácido láctico como de calor ligero (86,7 °C (188 °F)) dio lugar a artículos horneados con una mayor retención del sabor a canela de al menos 11,21 unidades de escala (tandas 2, 3, 4, y 5) en comparación con una puntuación de 9,47 de unidades de escala (tanda 1) para el control en el que se utilizaba harina integral, estabilizada solamente con estabilización mediante calor ligero (86,7 °C (188 °F)) y sin tratamiento con ácido láctico, para un aumento de la puntuación de sabor a canela de al menos 18,3 %.
- 15 La propiedad negativa de aroma de harina cruda, como se muestra en la Tabla 25 permaneció por debajo de un máximo de 9 unidades de escala de 8,94 (tandas 2, 3, 4 y 5) en comparación con el control que dio una puntuación de 9,62 unidades de escala (tanda 1) para una disminución en la puntuación de aroma de harina de al menos 7 %.
- 20 En comparación con el número de tanda 1 (sin ácido láctico; sirvió de control), todas las muestras con ácido láctico (tandas 2, 3, 4 y 5) tienen un aroma de harina cruda bajo, más sabor dulce, más sabor a canela, un mayor retrogusto tostado horneado, menos adhesión a los dientes y una menor cantidad de efectos a posteriori de partículas.
- 25 En comparación con el número de tanda 1 (sin ácido láctico; sirvió de control): a) las muestras producidas utilizando 6.000 ppm de ácido láctico (tandas 2 y 4), pero no 3.000 ppm de ácido láctico (tandas 3 y 5) tienen un mayor retrogusto de vainilla y b) todas las muestras (tandas 2, 3, 4) con ácido láctico tienen un mayor retrogusto de miel excepto la muestra (tanda 5) producida utilizando 3.000 ppm de ácido láctico y 4,5 % de hidratación de salvado.
- 30 El uso tanto del tratamiento con ácido láctico como del tratamiento de calor ligero para estabilizar la harina de trigo integral aumenta el frescor de la harina integral y de los productos que la contienen, medido por los free fatty acid (ácidos grasos libres - FFA) formados en la harina durante el almacenamiento, y la retención de sabor en el producto fabricado con harina envejecida en comparación con el frescor de la harina integral de control estabilizada sin tratamiento con ácido láctico, y la retención de sabor de los productos que contienen la harina de control, como queda demostrado en la Tabla 25.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir harina estabilizada que comprende:
  - 5 atemperar granos enteros que tienen salvado, germen, y endosperma para obtener un contenido final de humedad en los granos enteros de 10 % en peso a 14 % en peso, con respecto al peso de los granos enteros;
  - tratar los granos enteros con una solución acuosa de un inhibidor de lipasa durante el atemperado para inhibir la lipasa en el salvado y el germen para formar granos enteros tratados; y
  - 10 moler los granos enteros tratados para obtener una harina integral estabilizada que tiene un contenido de ácidos grasos libres inferior a 3.000 ppm cuando se almacena a 38 °C (100 °C) durante 30 días,
  - en donde la concentración del inhibidor de lipasa durante el tratamiento es de 2 molar a 7 molar, y la cantidad del inhibidor durante el tratamiento es de 1 mol a 5 moles de inhibidor por 45,36 kg (100 libras) de granos enteros.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde el tratamiento con inhibidor de lipasa se realiza a una temperatura inferior a 50 °C.
- 20 3. Un método según la reivindicación 1, en donde el tratamiento con inhibidor de lipasa reduce el pH de la harina a menos de 6.
4. Un método según la reivindicación 1, en donde la harina estabilizada tiene una solvent retention capacity (capacidad de retención de disolvente - SRC) de ácido láctico superior o igual a 65, y una relación de SRC del ácido láctico a SRC del agua superior a 1.
- 25 5. Un método según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de lipasa comprende un componente ácido que comprende al menos un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos.
- 30 6. Un método según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de lipasa comprende un ácido orgánico.
7. Un método según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de lipasa es ácido láctico y la cantidad del inhibidor de lipasa es de al menos 3.000 ppm de ácido láctico, con respecto al peso de los granos enteros.
- 35 8. Un método según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de lipasa comprende un ácido inorgánico.
9. Un método según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de lipasa comprende al menos un ácido inorgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico y ácido fosfórico, y la cantidad del inhibidor de lipasa es de al menos 300 ppm de inhibidor, con respecto al peso de los granos enteros.
- 40 10. Un método según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de lipasa comprende extracto de té verde o té verde.
11. Un método según la reivindicación 1, en donde el tratamiento con inhibidor de lipasa se realiza a una temperatura inferior a 38 °C.
- 45 12. Un método según la reivindicación 1, en donde el tratamiento con el inhibidor de lipasa es para reducir el pH de la harina a un pH de 4,4 a 5,8.
- 50 13. Un método según la reivindicación 1, en donde la harina integral estabilizada tiene un grado de gelatinización del almidón inferior a 25 %, medido mediante differential scanning calorimetry (calorimetría diferencial de barrido - DSC), una capacidad de retención de disolvente del ácido láctico (SRC del ácido láctico) superior o igual a 65 % y una relación de SRC del ácido láctico a capacidad de retención de disolvente carbonato de sodio-agua (SRC del carbonato de sodio) superior a 1.
- 55 14. Un método según la reivindicación 1, en donde al menos una parte de la lipasa se inhibe reversiblemente.
15. Un método según la reivindicación 1, en donde una parte de la lipasa se inhibe irreversiblemente.

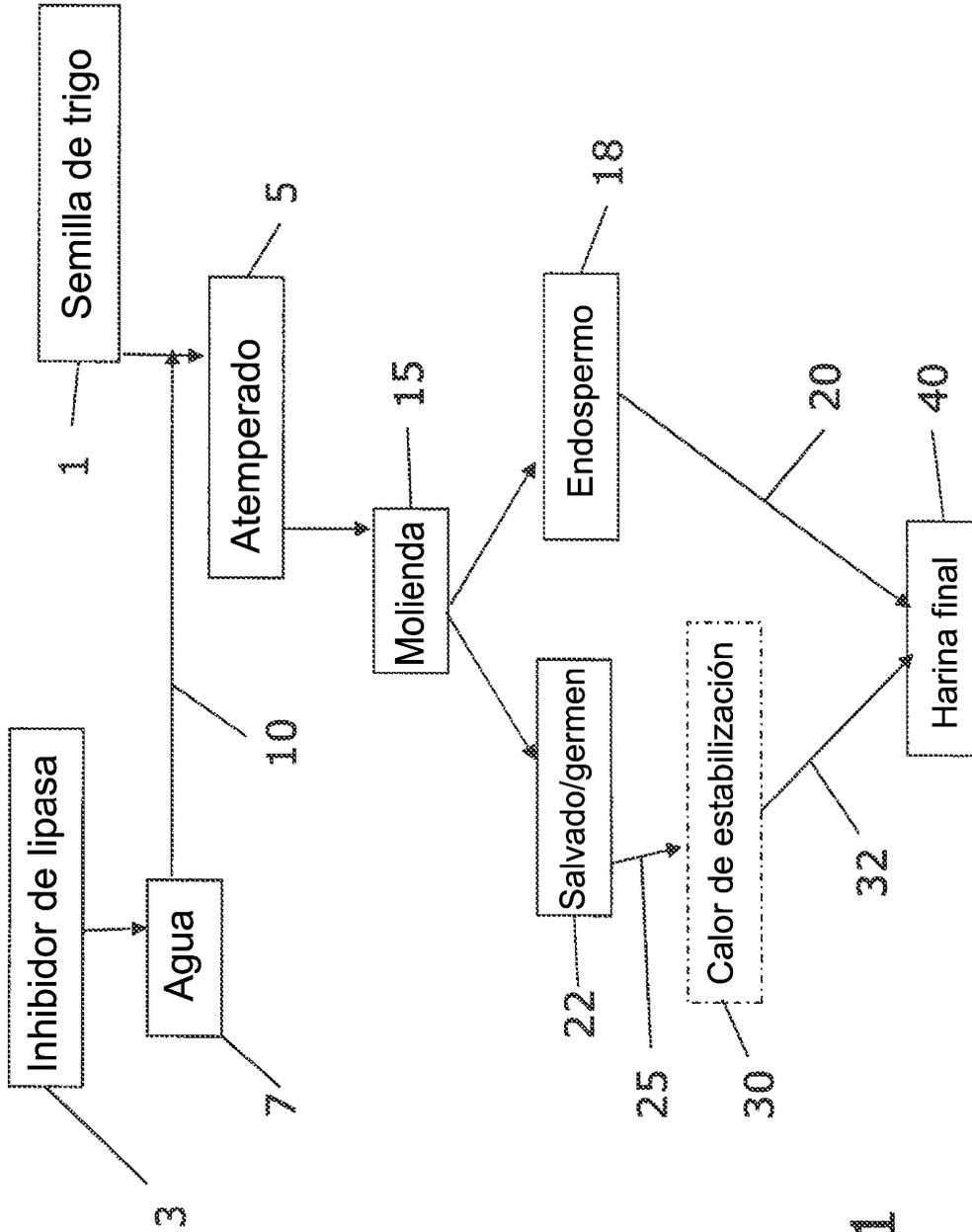


FIG. 1

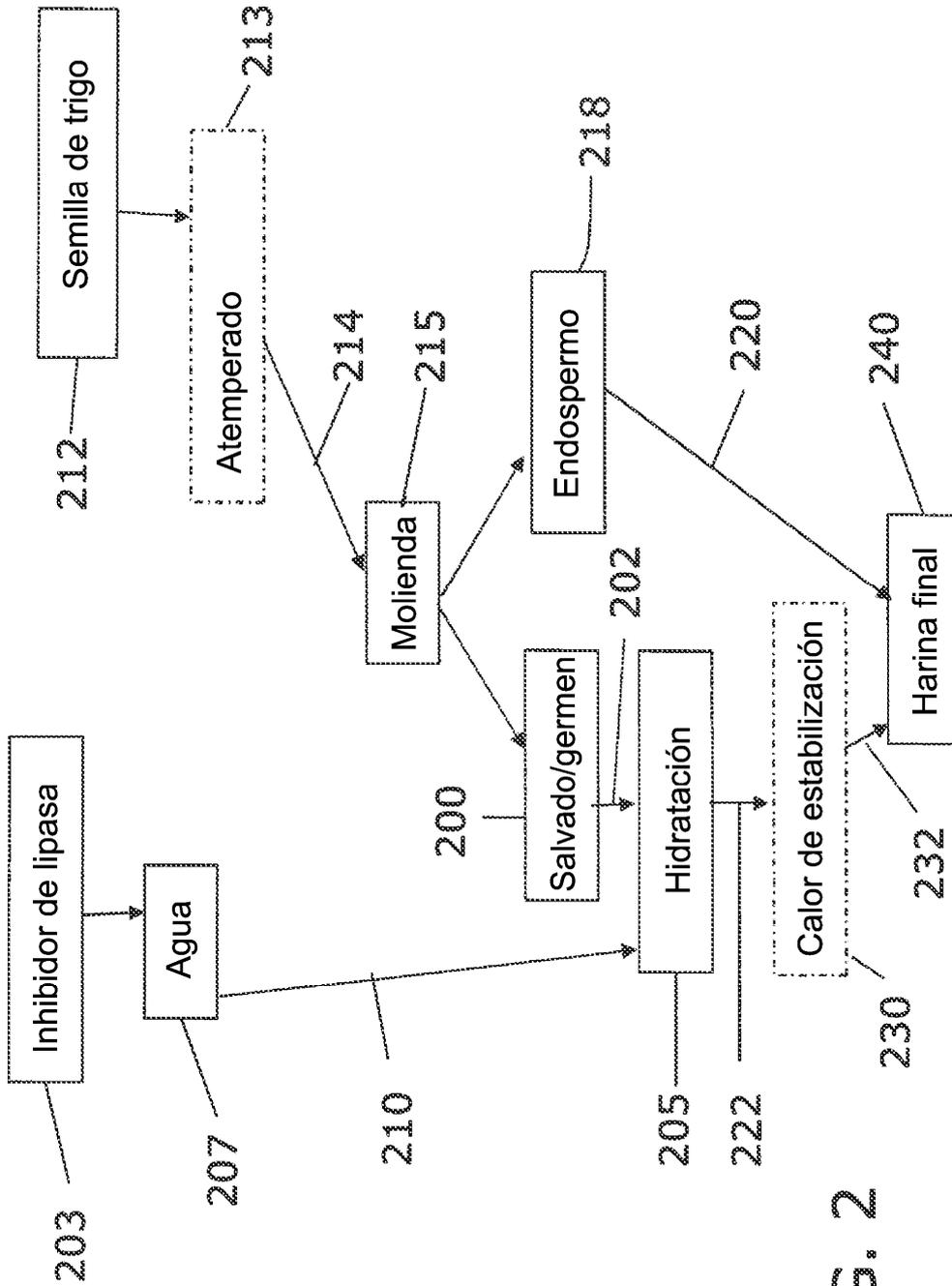


FIG. 2

FIG. 3

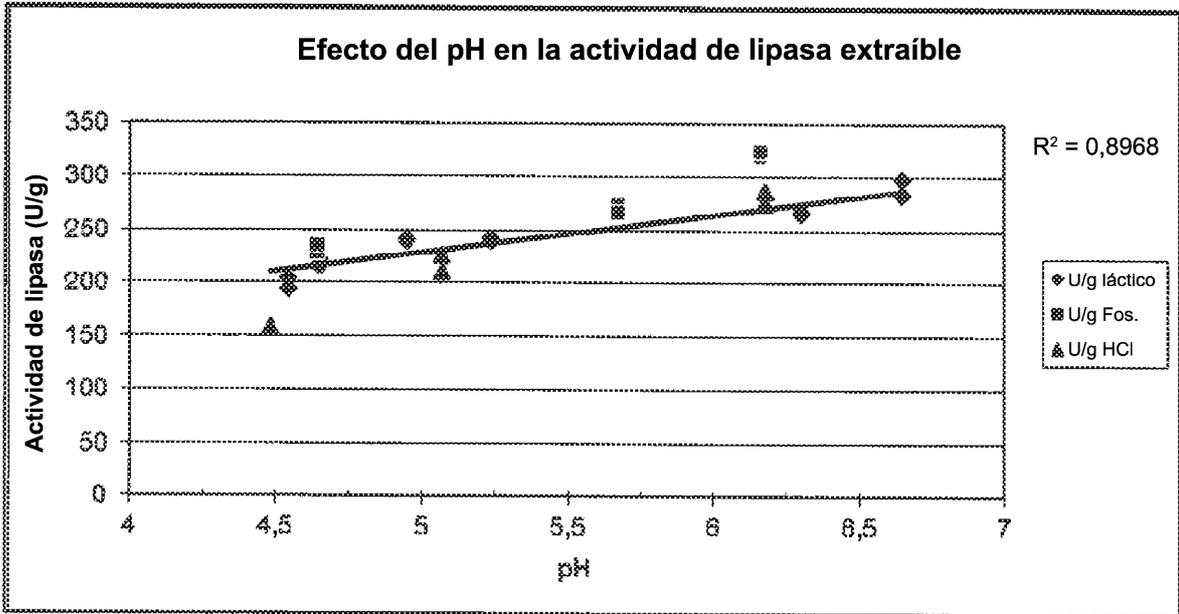


FIG. 4

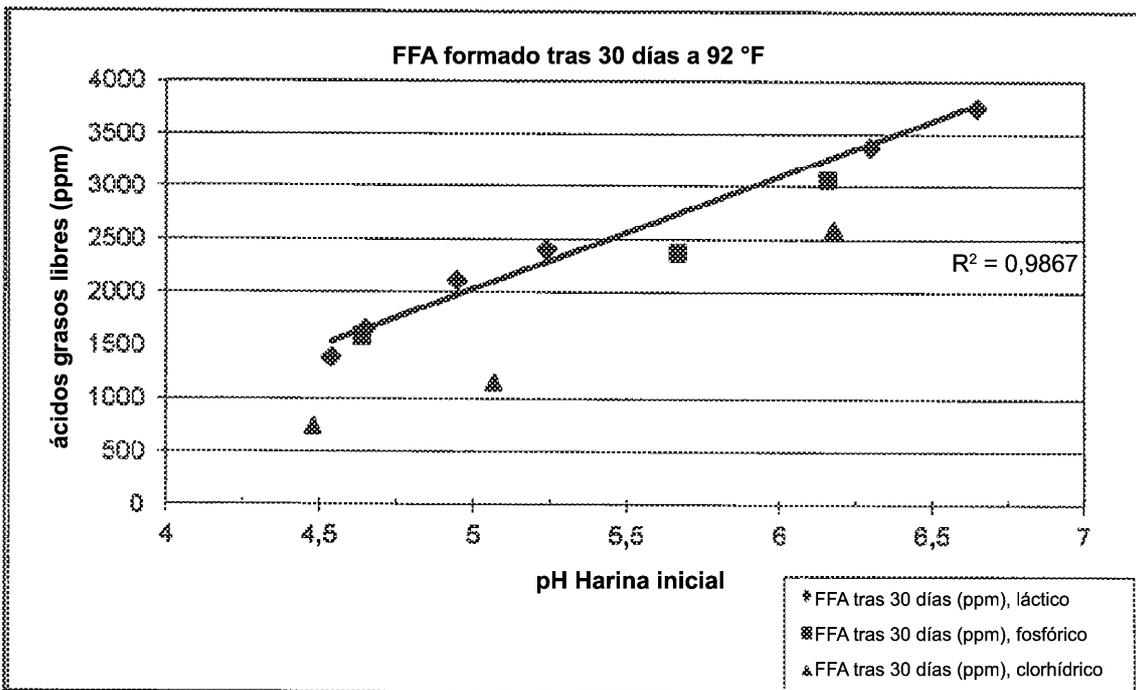


FIG. 5

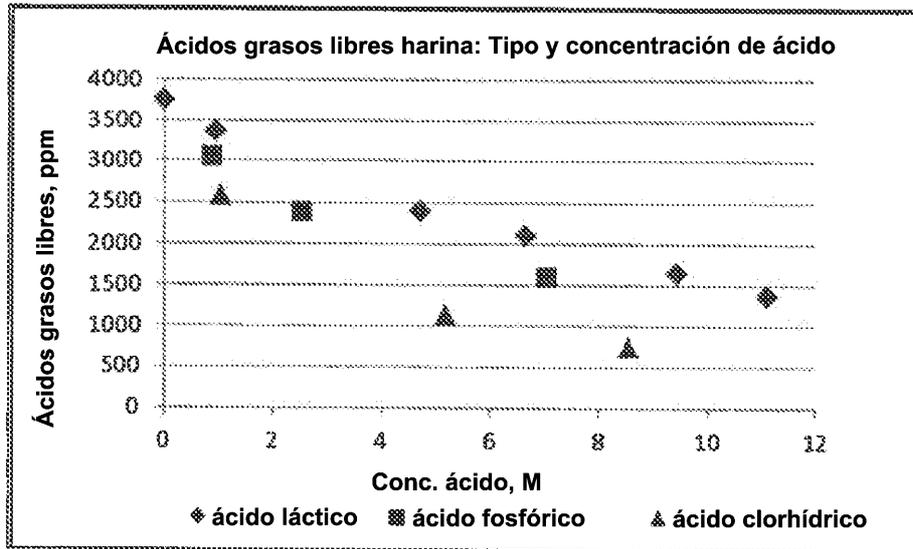


FIG. 6

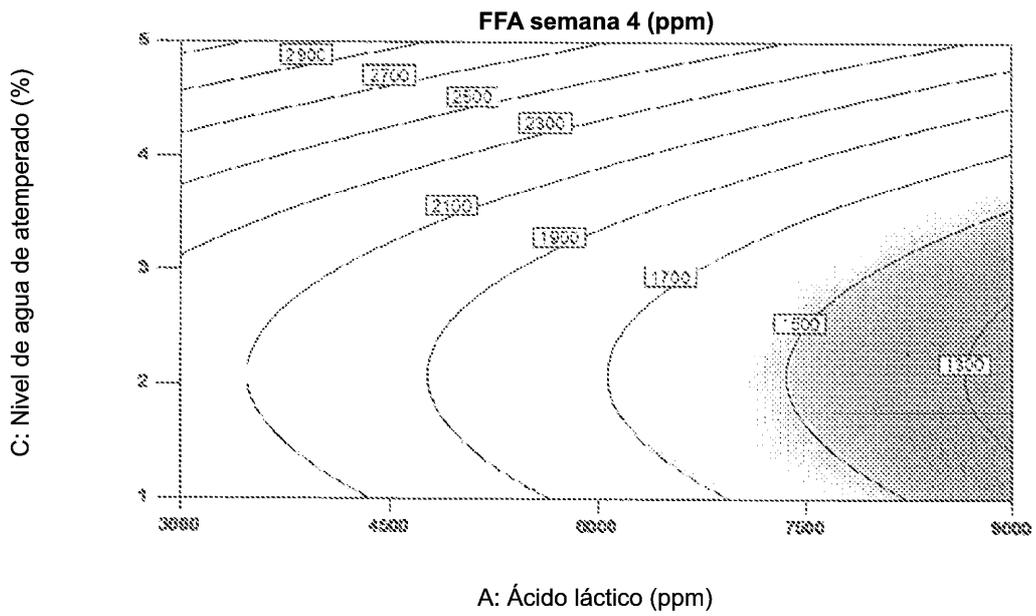


FIG. 7

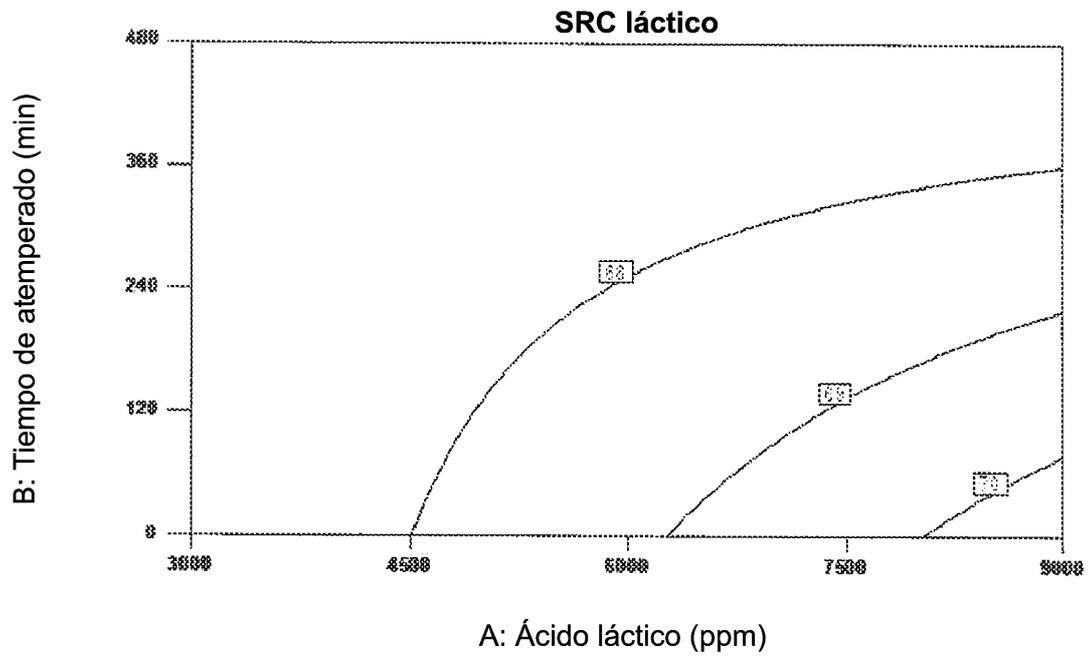


FIG. 8

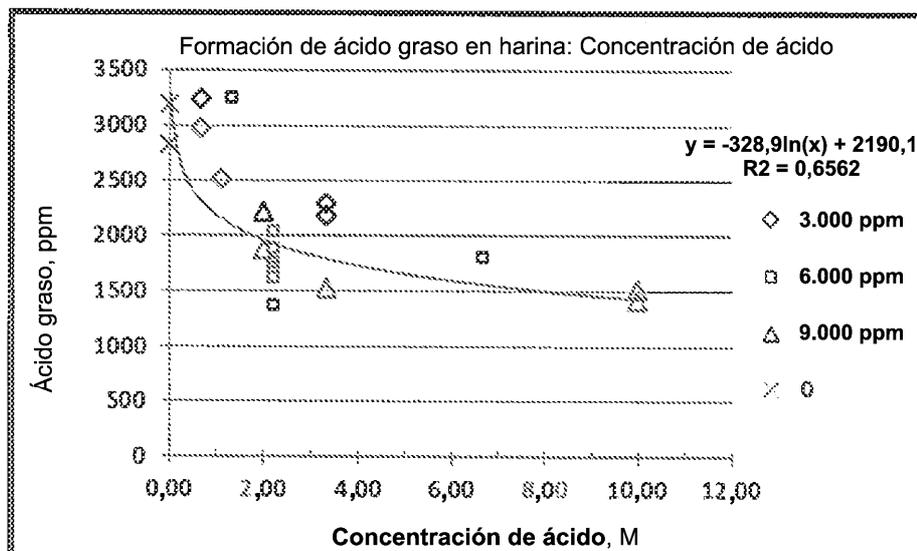


FIG. 9

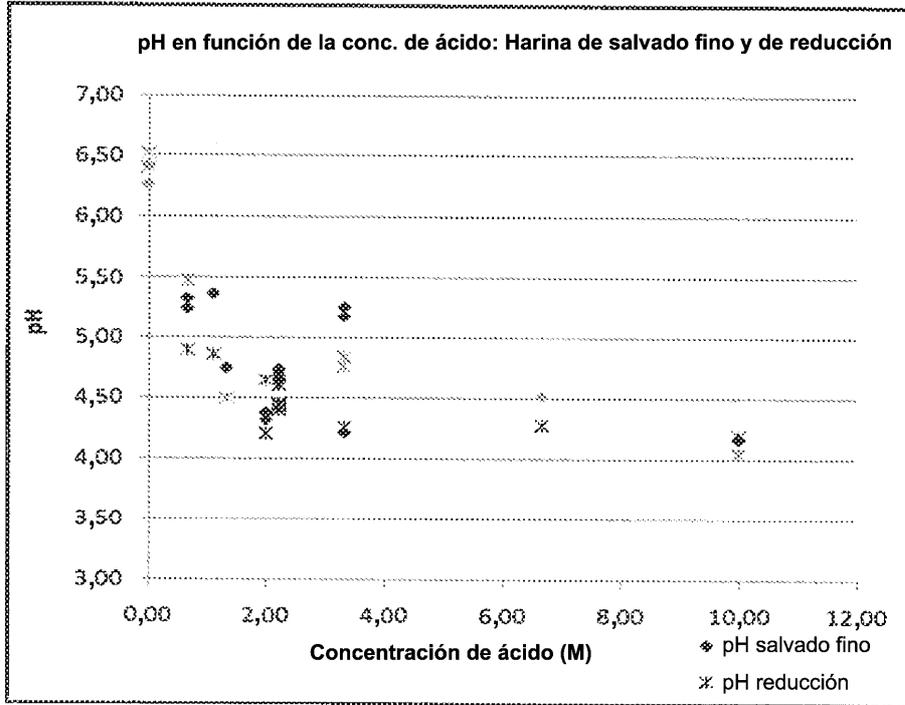


FIG. 10

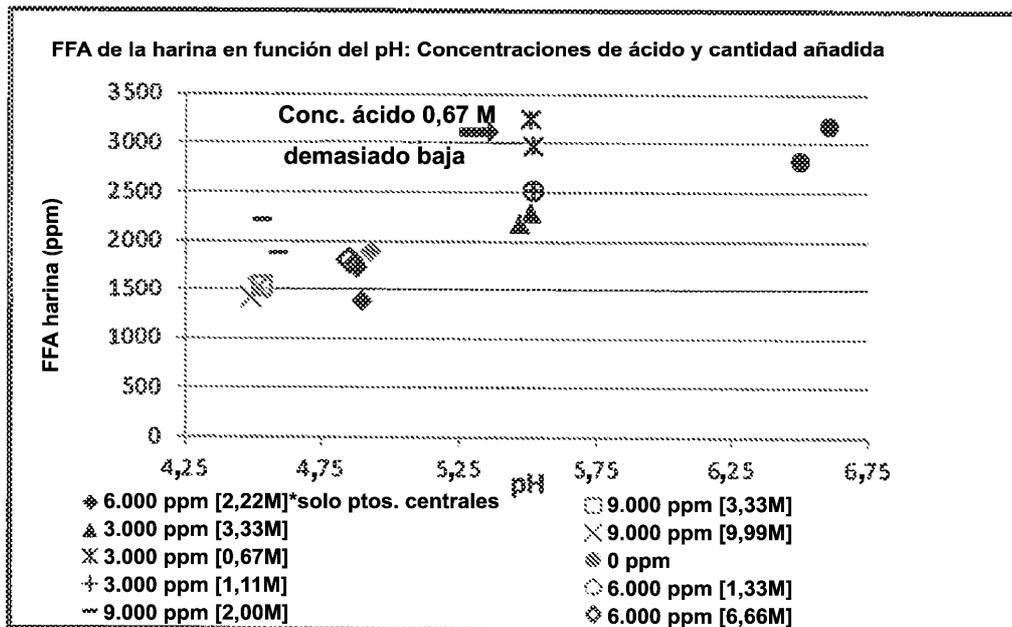


FIG. 11

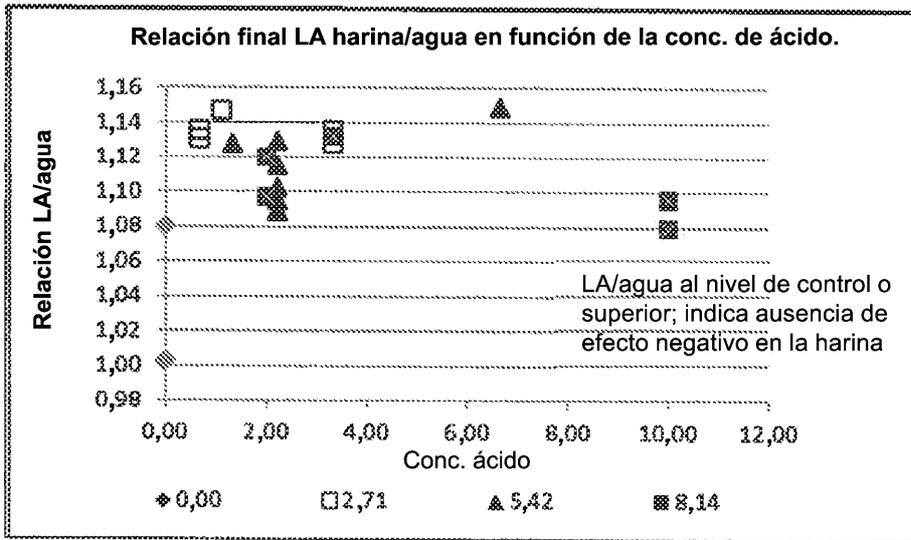


FIG. 12

