



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 500**

51 Int. Cl.:
A23L 1/015 (2006.01)
A23L 1/164 (2006.01)
A23L 1/217 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04755166 .8**
96 Fecha de presentación : **14.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1641353**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Método para reducir la acrilamida en alimentos que comprende reducir el nivel de azúcares reductores.**

30 Prioridad: **25.06.2003 US 603978**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2010

73 Titular/es: **THE PROCTER & GAMBLE COMPANY**
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, Ohio 45202, US

72 Inventor/es: **Howie, John, Keeney;**
Lin, Peter, Yau, Tak;
Zyzak, David, Vincent y
Schafermeyer, Richard, Gerald

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 335 500 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para reducir la acrilamida en alimentos que comprende reducir el nivel de azúcares reductores.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la reducción de acrilamida en productos alimenticios. La invención puede usarse en la fabricación de un artículo de comercio.

10 **Antecedentes de la invención**

Desde los albores de la civilización, los alimentos con contenido en hidratos de carbono han sido un eslabón en la dieta del hombre. En la actualidad, se consumen popularmente alimentos con contenido en hidratos de carbono como por ejemplo diferentes tipos de pan, cereales para el desayuno, panecillos, aperitivos salados tipo cracker, galletas, patatas fritas a la francesa, verduras feculosas cocinadas, tortillas para tacos y aperitivos. Aunque dichos alimentos han sido parte de la dieta humana desde tiempos inmemoriales, los investigadores han descubierto sólo recientemente que muchos de dichos alimentos contienen acrilamida.

En abril de 2002, la Swedish National Food Administration (Agencia Nacional para la Alimentación de Suecia) e investigadores de la universidad de Estocolmo anunciaron su descubrimiento de que en muchos tipos de alimentos cocinados se forma acrilamida, un compuesto químico potencialmente cancerígeno. La acrilamida tiene una potencia carcinogénica en ratas que es similar a la de otros carcinógenos en los alimentos pero, para los humanos, la potencia relativa en los alimentos es desconocida. Sólo se encuentran disponibles datos limitados de población humana para la acrilamida y no ofrecen ninguna evidencia del riesgo de cáncer por exposición ocupacional. (*FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food: Summary Report*; Ginebra, Suiza, 25-27 de junio de 2002).

Aunque es necesario llevar a cabo más investigaciones para evaluar los efectos en la salud, si los hay, que pueden derivarse del consumo humano de acrilamida a los niveles que se encuentran habitualmente en dichos alimentos, muchos consumidores han expresado su preocupación. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para reducir el nivel de acrilamida en los alimentos. También es un objeto de la presente invención proporcionar productos alimenticios con niveles reducidos de acrilamida. De forma adicional, es un objeto de la presente invención proporcionar un artículo de comercio que comunique al consumidor que un producto alimenticio tiene niveles bajos o reducidos de acrilamida.

35 **Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de acrilamida en un producto alimenticio tal y como queda definido por las reivindicaciones. En una realización, el método comprende añadir un enzima alterador de azúcar reductor al producto alimenticio antes de calentarlo, en el que dicho enzima alterador de azúcar reductor comprende aldosa reductasa.

La mención de cualquier documento no debe ser considerada como una aceptación de que forma parte del estado de la técnica con respecto a la presente invención.

45 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. La figura 1 expone el mecanismo de reacción propuesto por el cual se forma acrilamida a partir de asparagina y de una fuente de carbonilo (como por ejemplo glucosa). R_1 y R_2 puede ser = H, CH_3 , CH_2OH , CH_2 (CH_2) $_n$ CH_3 , o cualquier otro componente que dé lugar a un azúcar reductor; n puede ser cualquier número entero inferior a 10.

Descripción detallada de la invención

Los solicitantes han descubierto que alimentos que contienen azúcares reductores y asparagina, un aminoácido que se encuentra presente de forma natural en prácticamente todos los sistemas s, pueden formar acrilamida cuando se calientan. Por ello, los alimentos más ricos en azúcares reductores, cuando se calientan, tienden a contener niveles superiores de acrilamida; éste es especialmente el caso cuando alimentos que contienen azúcares reductores se calientan en presencia de alimentos que contienen altos niveles de asparagina. Se ha descubierto también que la formación de acrilamida es superior cuando los alimentos se cocinan para obtener un contenido inferior de mezcla final.

Sin querer imponer ninguna teoría, se piensa que la acrilamida se forma en productos alimenticios a través del mecanismo de reacción mostrado en la figura 1. Se piensa que el grupo alfa-amino de la asparagina libre reacciona con una fuente de carbonilo, formando una base de Schiff. Con la aplicación de calor, el aducto de la base de Schiff se decarboxila formando un producto que puede: (1) hidrolizarse para formar amida de beta-alanina (que puede, bajo la acción del calor, degradarse asimismo para formar acrilamida) o (2) descomponerse para formar acrilamida y la imina correspondiente. (Los solicitantes han descubierto que los átomos precursores rodeados con un círculo comprenden los carbonos y nitrógenos de la acrilamida).

Por tanto, los solicitantes han descubierto además que la formación de acrilamida en alimentos calentados puede reducirse convirtiendo el azúcar reductor del alimento en otra sustancia antes de la cocción. Cuando se calientan dichos alimentos que contienen niveles reducidos de azúcar reductor, se reduce la cantidad de acrilamida formada.

5 Además, los solicitantes han descubierto que la reducción del nivel de acrilamida en el producto alimenticio acabado puede conseguirse añadiendo un enzima que altere el azúcar reductor (“enzima alterador de azúcar reductor”). Según la presente invención, el enzima alterador de azúcar reductor cataliza la reducción del azúcar reductor antes del calentamiento (p. ej., cocinado) del alimento, comprendiendo dicho enzima aldosa reductasa. El mecanismo por el cual los azúcares reductores se oxidan o se reducen mediante enzimas son muy conocidos.

10 Las ventajas de usar enzimas en el procesado de alimentos son numerosas. Estas ventajas incluyen: (a) son sustancias naturales, no tóxicas; (b) generalmente catalizan una reacción dada sin causar reacciones secundarias no deseadas; (c) son sustancias activas en condiciones de temperatura y pH muy benignas; (d) son sustancias activas a concentraciones bajas; (e) la velocidad de reacción puede controlarse ajustando la temperatura, el pH y la cantidad de enzima utilizada; y (f) pueden inactivarse después de que la reacción se haya desarrollado en la medida deseada. (*Food Chemistry*, 4th Ed., Owen R. Fennema, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1985, págs. 427, 433.).

A. Método para la reducción de acrilamida en productos alimenticios

20 En un aspecto, la presente invención proporciona un método tal y como se describe en las reivindicaciones para la reducción de acrilamida en un producto alimenticio, comprendiendo dicho método reducir el nivel de azúcar reductor en el producto alimenticio antes del calentamiento final (p. ej., cocinado) añadiendo a un producto alimenticio un enzima capaz de catalizar la reducción del grupo carbonilo del azúcar reductor, en el que dicho enzima comprende aldosa reductasa.

En la presente memoria, la expresión “azúcar reductor” se refiere a cualquier hidrato de carbono encontrado en productos alimenticios que pueda aportar un grupo carbonilo cuando reaccione con asparagina para formar acrilamida.

30 En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de acrilamida en los alimentos, que comprende:

- (1) añadir un enzima alterador de azúcar reductor a un producto alimenticio, en donde dicho producto alimenticio comprende un azúcar reductor, en donde dicho enzima comprende aldosa reductasa;
- (2) de forma opcional mezclar el enzima con el producto alimenticio;
- (3) permitir un tiempo suficiente para que el enzima reaccione con el azúcar reductor;
- (4) de forma opcional desactivar o de forma opcional eliminar el enzima; y
- (5) calentar el producto alimenticio para formar el producto alimenticio acabado.

45 1. Añadir un enzima alterador de azúcar reductor a un producto alimenticio, en donde dicho producto alimenticio comprende azúcar reductor

El enzima alterador de azúcar reductor es un enzima capaz de catalizar la reducción del grupo carbonilo del azúcar reductor. En la presente memoria, “enzima de azúcar reductor” o “enzima alterador de azúcar reductor” o “enzima” incluye cualquier enzima capaz de reducir el nivel de uno o más azúcares en un producto alimenticio. El enzima alterador de azúcar reductor puede incluir dos clases de enzimas: oxidasas y reductasas que catalizan, respectivamente, la oxidación o la reducción de azúcares reductores.

Los métodos de la presente invención requieren aldosa reductasa.

55 El enzima puede añadirse al producto alimenticio en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el enzima puede añadirse como un polvo o en forma de una solución. Además, el enzima puede añadirse al producto alimenticio en cualquier forma adecuada, como por ejemplo directamente (por ejemplo mediante rociado, vertido, o pulverización sobre el producto alimenticio) o indirectamente. En una realización, el enzima se mezcla con un alimento que no contiene azúcar reductor, posteriormente la mezcla resultante se añade al alimento que contiene azúcar reductor. En otra realización, al menos una parte del azúcar reductor se extrae del producto alimenticio, el extracto resultante se trata con el enzima, posteriormente al menos una parte del extracto vuelve a añadirse al menos a una parte del producto alimenticio; por ejemplo, el enzima puede añadirse a la corriente, o la corriente puede bombearse a través de un lecho o columna de enzima inmovilizado (enzima adsorbido o químicamente unido a un sustrato, preferiblemente un sustrato inerte, p. ej., piezas de plástico o perlas en una columna). En la presente memoria, “añadir” el enzima al producto alimenticio incluye, aunque no de forma limitativa, cualquier modo de unir el azúcar reductor y el enzima.

ES 2 335 500 T3

El enzima reductor aldosa reductasa se utiliza para transformar el azúcar reductor en la forma reducida. Se prefiere el uso de una reductasa porque el producto enzimático resultante es un azúcar que conserva su dulzor.

5 El enzima puede añadirse al producto alimenticio en cualquier etapa del método. Por ejemplo, el enzima puede añadirse a los otros ingredientes durante el mezclado de una masa.

10 En la presente memoria, “producto alimenticio” incluye cualquier tipo de alimento, producto para la alimentación, ingrediente para la alimentación, o mezclas de los mismos, incluyendo cualquier material comestible utilizado en la preparación de alimentos, que contenga azúcar reductor. El producto alimenticio puede ser en cualquier forma adecuada, incluyendo sin cocinar o pre-tratado. Métodos adecuados de pre-tratamiento del producto alimenticio incluyen, aunque no de forma limitativa, escaldar, cocinar al vapor, hervir, trocear, macerar, triturar, reducir el tamaño de partícula, secar con calor, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, puede añadirse enzima a un producto alimenticio antes, durante o después de macerarlo. En una realización, el producto alimenticio se remoja en agua antes de añadir el enzima.

15 Los enzimas se comercializan más en forma de unidades de actividad que en peso o volumen. Por ello, la cantidad eficaz de enzima requerida para alcanzar el nivel deseado de reducción de acrilamida en el producto alimenticio acabado dependerá de la actividad del producto enzimático utilizado en cada caso.

20 La cantidad de enzima que debe añadirse dependerá del nivel de reducción del azúcar reductor y por tanto del nivel de reducción de acrilamida deseado. La cantidad de enzima que debe añadirse también depende de la cantidad de azúcar reductor presente en el producto alimenticio; productos alimenticios con mayor contenido en azúcar reductor generalmente requerirán mayores niveles de enzima o mayor tiempo de reacción para obtener el mismo nivel de reducción de acrilamida. La cantidad de enzima que debe añadirse puede depender también del enzima utilizado en cada caso (por ejemplo, la capacidad en particular del enzima para degradar azúcar reductor) y del producto alimenticio tratado en cada caso. El experto en la técnica será capaz de determinar la cantidad efectiva de enzima a partir del producto alimenticio en particular, del enzima en particular, de la actividad propia del enzima y del resultado deseado.

30 *2. De forma opcional mezclar el enzima con el producto alimenticio*

De forma opcional, pero preferiblemente, el enzima se mezcla a conciencia con el producto alimenticio. Puede utilizarse cualquier método de mezcla adecuado. En una realización, la mezcla se lleva a cabo de forma simultánea con la maceración del producto alimenticio y la adición del enzima.

35

3. Permitir un tiempo suficiente para que el enzima reaccione con el azúcar reductor

40 La cantidad de tiempo necesaria para que el enzima reaccione con el azúcar reductor dependerá de factores que incluyen, aunque no de forma limitativa, el nivel deseado de reducción de acrilamida, las características del producto alimenticio en cada caso (p. ej., la composición química, la cantidad de azúcar reductor presente, el tamaño de partícula) y el enzima añadido en cada caso. Preferiblemente, el enzima se deja reaccionar durante un intervalo de tiempo suficiente como para obtener un producto alimenticio en el que el nivel de azúcar reductor ha sido reducido en al menos 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 30%, más preferiblemente al menos aproximadamente 50%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 70% e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90%. En general, cuanto más tiempo se permita para la reacción del enzima, mayor será el nivel de reducción de azúcar reductor y por ello mayor el nivel de reducción de acrilamida. La etapa de permitir un tiempo suficiente para que la reacción se lleve a cabo del modo adecuado, por ejemplo, puede llevarse a cabo simultáneamente con la adición del enzima al producto alimenticio, mezclando el enzima con el producto alimenticio o mediante combinaciones de los procesos anteriores.

50

Como es conocido en la técnica, el pH y la temperatura son factores que afectan a la actividad enzimática. El experto en la técnica debería ser capaz de determinar fácilmente condiciones óptimas de estos y otros parámetros (p. ej., contenido en agua). Además, condiciones óptimas de pH y de temperatura para diferentes enzimas se encuentran disponibles de forma típica en la bibliografía y/o pueden obtenerse de los proveedores de enzimas.

55

4. De forma opcional desactivar o de forma opcional eliminar el enzima

60 Cuando un enzima ha reaccionado en una cierta medida puede de forma opcional ser desactivado o eliminado del producto alimenticio. Cuando se utilice un enzima que es seguro para el consumo (p. ej., se encuentra presente de forma natural y se halla presente en alimentos comunes) puede decidirse no desactivar o no eliminar el enzima. De forma alternativa, el enzima puede desactivarse mediante cualquier método adecuado de desactivación del enzima. Por ejemplo, el enzima puede desactivarse mediante uso de calor, ajuste del pH, tratamiento con una proteasa o combinaciones de los mismos. Además, el enzima puede eliminarse del producto alimenticio mediante cualquier modo adecuado incluyendo, aunque no de forma limitativa, extracción. El enzima puede desactivarse, eliminarse, o someterse a una combinación de desactivación y de eliminación.

65

ES 2 335 500 T3

5. Calentar el producto alimenticio para formar el producto para la alimentación acabado

El producto alimenticio puede ser entonces calentado del modo habitual, como por ejemplo mediante horneado, freidura, extrusión, secado (p. ej., mediante vacío o en un secador de tambor) hinchado o mediante microondas. Al menos una parte del enzima puede añadirse al producto alimenticio durante la etapa de calentamiento. La desactivación del enzima puede tener lugar mediante calentamiento, por lo tanto la etapa de desactivación opcional y la etapa de cocinado pueden llevarse a cabo de forma simultánea. El procesamiento con calor mediante cocinado puede desnaturalizar e inactivar el enzima de modo que el producto alimenticio no esté sometido de forma continua a actividad enzimática. Además, al menos una parte del tiempo permitido para la reacción enzimática puede tener lugar durante la etapa de calentamiento.

En la presente memoria la expresión “producto para la alimentación acabado” o “producto para la alimentación” incluye, aunque no de forma limitativa, alimentos listos para el consumo y alimentos para usar como ingredientes para preparar otros alimentos.

Preferiblemente, el nivel de acrilamida en el producto para la alimentación acabado se reduce en al menos 10%, preferiblemente en al menos 30%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente todavía de al menos aproximadamente 70%, y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 90%.

B. Modo de llevar a cabo el método

La presente invención puede llevarse a cabo mediante cualquier modo adecuado. Por ejemplo, el método en la presente memoria puede llevarse a cabo en lotes, en semi lotes o en modo continuo.

C. Productos para la alimentación con niveles reducidos de acrilamida

Los productos para la alimentación preparados según el método que se describe en la presente memoria pueden tener una reducción en el nivel de acrilamida de al menos aproximadamente 10%, preferiblemente de al menos aproximadamente 30%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente todavía de al menos aproximadamente 70% y aún más preferiblemente de al menos 90%.

El método que se describe en la presente memoria puede aplicarse a la producción de cualquier producto para la alimentación adecuado, incluyendo de forma no excluyente alimentos que contienen hidratos de carbono, especialmente alimentos de bajo contenido en agua (p. ej., menos de aproximadamente 10%), que se calientan durante la preparación. Por ejemplo, el método puede utilizarse para reducir el nivel de acrilamida presente en puré de patata, patatas fritas a la inglesa, alimentos procesados para aperitivos, patatas fritas a la francesa, cereales para el desayuno, diferentes tipos de pan, galletas, aperitivos salados tipo cracker, pastas para preparar en tostadora, masa para pizza, aperitivos salados tipo pretzel, tortitas fritas de patata o de patata y cebolla, productos alimenticios a base de patata Tater Tots, trozos de tortilla de maíz frita de tipo nacho, y tortillas para tacos.

En otra realización, las patatas fritas procesadas tienen menos de aproximadamente 400 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 300 ppb, más preferiblemente menos de aproximadamente 200 ppb, más preferiblemente todavía menos de aproximadamente 50 ppb y con máxima preferencia menos de aproximadamente 10 ppb.

En otra realización, patatas fritas a la francesa preparadas a partir de patatas troceadas tienen menos de aproximadamente 40 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 30 ppb, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 ppb y con máxima preferencia menos de aproximadamente 10 ppb.

En una realización específica, las patatas fritas a la inglesa según el método en la presente memoria pueden tener menos de aproximadamente 150 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 100 ppb, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 ppb, más preferiblemente incluso menos de aproximadamente 10 ppb y con máxima preferencia menos de aproximadamente 5 ppb.

En otra realización, los trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho y fritos de maíz tienen menos de aproximadamente 75 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 50 ppb y más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ppb.

Aunque el método descrito en la presente memoria se describirá generalmente en términos de productos para la alimentación a base de patata y trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho, el experto en la técnica debería entender que el método en la presente memoria puede aplicarse a cualquier producto para la alimentación que sea adecuado. Ejemplos incluyen aperitivos salados tipo cracker, diferentes tipos de pan (p. ej., de centeno, trigo, avena, patata, pan blanco, productos integrales, de mezclas de grano molido fino, barras, trenzas, panecillos, molletes, panes tipo pita, matzás, focaccia, tostadas melba, pan tostado tipo zwieback, picatostes, productos horneados blandos tipo pretzel, barritas de pan duras y blandas, aperitivos listos para calentar y servir), pastas para preparar en la tostadora, galletas, productos dulces de repostería a la danesa, cruasanes, tartaletas, bases de tarta a la americana, pastas, magdalenas,

bizcochos con poca levadura tipo brownie, pasteles rectangulares con base de bizcocho, donuts, alimentos para aperitivos (p. ej., aperitivos salados tipo pretzel, trozos de tortilla frita de maíz tipo nacho, fritos de maíz, patatas fritas a la inglesa, aperitivos procesados, patatas fritas a la inglesa procesadas, aperitivos extruidos, aperitivos rellenos estruidos, frutos secos variados, muesli, aperitivos variados, tiras de patata frita cortadas de forma fina y alargada), diferentes tipos de grano molido fino, preparados comerciales para preparar productos alimentarios de repostería y panadería (p. ej., pasteles con base de bizcocho, panecillos tipo biscuit americano, bizcochos con poca levadura tipo brownie, pan, tortitas a la americana, creps, productos rebozados, masa para pizza), masas refrigeradas para diferentes productos (p. ej., galletas, panes, colines, cruasanes, molletes, masa para pizza, galletas, productos dulces de repostería a la danesa, bizcochos con poca levadura tipo brownie, base para tarta a la americana), alimentos congelados (bases para tarta a la americana, tartas a la americana, tartaletas, empanadillas, pizzas, masas en forma de bolsillo para rellenar, pasteles, patatas fritas a la francesa, tortitas de patata o de patata y cebolla, productos empanados tales como pollo y pescado, verduras empanadas), panecillos tipo bagel, cereales para el desayuno, panecillos tipo biscuit americano, patatas fritas a la francesa, verduras (p. ej., desecadas, a la brasa, asadas, hervidas, fritas, secadas al vacío), tortillas para taco, tortitas de patata o de patata y cebolla, puré de patatas, tostadas, sándwiches, fritos de grano molido fino o de maíz, creps, tortitas a la americana, gofres, rebozados, base para pizza, arroz, alimentos a base de frutos secos (por ejemplo, mantequilla de cacahuete, alimentos que contienen frutos secos troceados), fruta (p. ej., desecada, a la brasa, asada, a la parrilla, frita, desecada al vacío, gelatinas, productos horneados a base de fruta, rellenos para tarta a la americana a base de fruta, productos flambeados a base de fruta, uvas pasas), buñuelos, bebidas alcohólicas (p. ej., cervezas y bebidas tipo "ale"), productos que comprenden semillas de cacao tostadas (p. ej., chocolates, recubrimientos para confitería, chocolate caliente, mezclas de chocolate caliente), y comida para animales (p. ej., comida para perros, comida para gatos, comida para hurones, comida para cobayas, comida para conejos, comida para ratas, comida para ratones, comida para pollos, comida para pavos, comida para cerdos, comida para caballos, comida para cabras, comida para ovejas, comida para monos, comida para peces).

1. *Productos deshidratados a base de patata*

La presente invención puede utilizarse para fabricar productos deshidratados a base de patata con niveles reducidos de acrilamida. Lo siguiente expone un método preferido de fabricación de dichos productos deshidratados a base de patata, pero la presente invención no está limitada a esta realización específica. Aunque la realización que se expone detalladamente más abajo describe adición de enzima antes de triturar las patatas cocinadas, debería entenderse que el enzima puede añadirse en cualquier fase adecuada de cualquier proceso adecuado para fabricar productos deshidratados a base de patata. Por ejemplo, puede añadirse enzima a las patatas antes de cocinarlas, después de cocinarlas, antes de triturarlas, después de triturarlas o durante cualquier otra fase de procesado adecuada antes de la obtención del producto final deshidratado a base de patata. Además, ejemplos de otras realizaciones pueden comprender: (a) añadir enzima a patata sin cocinar y seguidamente procesar de modo convencional la patata deshidratada, (b) añadir enzima a la patata sin cocinar y seguidamente trocearla o cortarla en rodajas finas y procesarla de modo convencional, (c) añadir enzima a la patata sin cocinar y a continuación trocearla o cortarla en rodajas finas, luego escaldarla y seguidamente procesarla de modo convencional, (d) añadir enzima a patata escaldada, troceada o cortada en rodajas finas y a continuación procesar de modo convencional, o (e) cualquier otro modo adecuado de adición de enzima. El método que se describe en la presente memoria también puede llevarse a la práctica para fabricar productos deshidratados a base de patata conocidos en la técnica, tales como los expuestos en *Potato Processing*, 4th Ed., Talburt and Smith, Eds., AVI Books, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1987, [a continuación "*Potato Processing*"], págs. 535-646.

En una realización preferida, productos de patata deshidratada, como por ejemplo escamas de patata, flóculos, o gránulos, pueden fabricarse de acuerdo con el siguiente método. En general, el método comprende: (1) cocinar las patatas (2) añadir un enzima alterador de azúcar reductor a las patatas cocinadas; (3) conformar un puré de patatas húmedo; y (4) secar el puré de patatas para formar productos deshidratados a base de patata.

Cualquier tipo adecuado de patatas, como por ejemplo las utilizadas para preparar escamas de patata, flóculos, o gránulos, pueden utilizarse para preparar los productos deshidratados a base de patata de la presente memoria. Preferiblemente, los productos deshidratados a base de patata se preparan a partir de patatas tales como, aunque no de forma limitativa, Norchip, Norgold, Russet Burbank, Lady Rosetta, Neorkotah, Sebago, Bintje, Aurora, Saturna, Kinnebec, Idaho Russet, Altura, Russet Norkotah, Atlantic, Shepody, Asterix, y Mentor.

Las patatas se someten a cocción para ablandarlas para hacer puré. Las patatas pueden pelarse, pelarse parcialmente o dejarse sin pelar. Las patatas pueden estar enteras o pueden estar cortadas en trozos de cualquier tamaño antes de cocinarlas. El procedimiento de cocinado puede ser cualquier proceso térmico u otro tipo de proceso que ablande las patatas para hacer puré. Por ejemplo, las patatas pueden ser cocidas sumergiéndolas en agua o vapor.

Por ejemplo, rodajas de patatas con un espesor promedio de aproximadamente 0,95 cm (3/8 pulgada) a aproximadamente 1,27 cm (1/2 pulgada) se cuecen de forma típica con vapor que tiene una temperatura de aproximadamente 93°C (200°F) a aproximadamente 121°C (250°F) de aproximadamente 12 a aproximadamente 45 minutos, más especialmente de aproximadamente 14 a aproximadamente 18 minutos. Los trozos de patata cortados muy finos se cocinan de forma típica con vapor que tiene una temperatura de aproximadamente 93°C (200°F) a aproximadamente 121°C (250°F) durante aproximadamente 7 a aproximadamente 18 minutos, más especialmente de aproximadamente 9 a aproximadamente 12 minutos, para conseguir la dureza deseada.

ES 2 335 500 T3

A continuación, se añade una cantidad eficaz de enzima aldosa reductasa a las patatas cocinadas. Dependiendo del intervalo de temperatura funcional del enzima usado, las patatas cocinadas pueden requerir primero un ajuste de temperatura previo a la adición del enzima. Las patatas cocinadas se trocean entonces para producir un puré húmedo. La conminución de las patatas cocidas puede realizarse mediante cualquier medio adecuado, tal como aunque no de forma limitativa con pasapurés, triturado, rallado o una combinación de los mismos.

Pueden añadirse ingredientes opcionales y mezclarse en el puré húmedo. Dichos ingredientes opcionales puede incluir almidón. El almidón puede incluir, aunque no de forma limitativa, cualquier tipo de almidón natural o almidón modificado, incluyendo cualquier producto deshidratado a base de patata que se introduzca o se reintroduzca en el puré. También puede añadirse al puré húmedo de forma opcional emulsionante como coadyuvante del proceso.

Después de formarse el puré, éste puede secarse y procesarse adicionalmente como se describe posteriormente para formar productos de patata deshidratados. De forma alternativa, el puré húmedo puede utilizarse para producir productos tales como, aunque no de forma limitativa, puré de patata, croquetas de patata, tortitas de patata y aperitivos de patata, tales como patatas fritas a la francesa extruidas, palitos de patata y aperitivos de patatas fritas a la inglesa.

Por ejemplo, el puré de patata húmedo puede utilizarse para producir productos de patatas fritas a la francesa extruidos tales como los descritos en US-3.085.020, concedida el 9 de abril de 1963 a Backinger y col.

Una vez conformado el puré, el puré se seca para formar productos de patata deshidratados. Estos productos de patata deshidratados pueden tener cualquier forma, tales como aunque no de forma limitativa copos, flóculos, gránulos, aglomerados, láminas, trozos, bocaditos, harina o productos en forma de partículas.

Se puede utilizar cualquier procedimiento adecuado, tales como aquellos conocidos en la técnica, para fabricar estos productos de patata deshidratados a partir de un puré y se puede utilizar cualquier equipo adecuado. Por ejemplo, el puré se puede secar para producir copos según los procedimientos conocidos, tales como aquellos descritos en la patente US-6.066.353, concedida el 23 de mayo de 2000 a Villagran y col., así como aquellos procesos descritos en las patentes US- 2.759.832, concedida el 19 de agosto de 1956 a Cording y col., y US-2.780.552, concedida el 5 de febrero de 1957 a Willard y col. El puré puede deshidratarse para fabricar flóculos según el proceso expuesto en US-6.287.622, concedida el 11 de septiembre de 2001 a Villagran y col. Pueden producirse gránulos mediante procesamiento del puré según el proceso descrito en US-3.917.866, concedida el 4 de noviembre de 1975 a Purves y col., o mediante otros procesos conocidos tales como los descritos en US-2.490.431 concedida el 6 de diciembre de 1949 a Greene y col. Secadores adecuados pueden seleccionarse de los dispositivos de secado que son muy conocidos en la técnica incluyendo de forma no excluyente secadores de lecho fluidizado, intercambiadores de calor de pared rascada, secadores de tambor, liofilizadores, secadores de aire inyectado, y similares.

Los métodos de secado preferidos incluyen aquellos que reducen la cantidad de energía térmica total. Se prefiere por ejemplo liofilización, secado en tambor, secado por flujo resonante o de pulso, secado por infrarrojos, o una combinación de los mismos cuando deben producirse escamas; y se prefiere secado por aire inyectado, secado por lecho fluidizado o una combinación de los mismos cuando deben producirse gránulos.

Aunque los productos de patata deshidratados de la presente invención se describirán principalmente en términos de copos, debería ser fácilmente evidente para el experto en la técnica que el puré de patatas de la presente invención puede ser deshidratado para producir cualquier producto de patata deshidratado deseado que pueda derivarse de un puré.

El secado en secador de tambor, tales como los secadores de tambor habitualmente utilizados en la industria de productos de patata, es el método preferido para secar el puré de patatas para formar copos. El proceso preferido utiliza un secador de tambor único en el que el puré de patata húmedo se reparte sobre el tambor en una lámina fina que tiene un espesor de aproximadamente 0,13 mm (0,005") a aproximadamente 2,5 mm (0,1"), preferiblemente de aproximadamente 0,13 mm (0,005") a aproximadamente 1,3 mm (0,05"), más preferiblemente de aproximadamente 0,25 mm (0,01"). De forma típica, cuando se utiliza un secador de tambor, el puré se introduce en la superficie superior del tambor mediante un medio de transporte. Unos rodillos sin calentar de pequeño diámetro aplican progresivamente puré de patatas fresco a partes que ya están en el tambor, formándose así una lámina o capa que tiene un espesor pre-determinado. La velocidad periférica de los rodillos pequeños es la misma que la del tambor. Después de que la capa de puré se desplaza alrededor de una parte de la circunferencia del tambor, una cuchilla retira la lámina secada desprendiendo la lámina secada del tambor. De forma típica, se calienta el propio secador de tambor a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 121°C (250°F) a aproximadamente 191°C (375°F), preferiblemente de aproximadamente 154°C (310°F) a aproximadamente 177°C (350°F), y más preferiblemente de aproximadamente 160°C (320°F) a aproximadamente 167°C (333°F) mediante vapor presurizado contenido dentro del tambor a presión de aproximadamente 0,48 Mpa (4,8 bar (70 psig)) a aproximadamente 0,96 Mpa (9,6 bar (140 psig)). Para conseguir mejores resultados, la velocidad de rotación del tambor del secador y la temperatura interna del mismo se controlan adecuadamente para dar un producto final que tiene un contenido de humedad de aproximadamente 5% a aproximadamente 14%, preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 12%. De forma típica, es suficiente una velocidad de rotación de aproximadamente 9 seg/rev a aproximadamente 25 seg/rev, preferiblemente de aproximadamente 11 seg/rev a aproximadamente 20 seg/rev.

ES 2 335 500 T3

Una vez que el puré húmedo se ha laminado y secado, la lámina desecada de copos resultante se puede romper en trozos más pequeños si así se desea. Estos trozos más pequeños pueden tener cualquier tamaño deseado. Se puede utilizar cualquier método de ruptura de la lámina que minimice el daño celular del almidón y de la patata, tales como fracturación, trituración, fragmentación, corte o pulverización. Por ejemplo, la lámina puede triturarse con un dispositivo Urschel Comitrol™, fabricado por Urschel Laboratories, Inc. de Valparaiso, Indiana, para fraccionar la lámina. De forma alternativa, la lámina de copos puede conservarse intacta. En la presente memoria, tanto la lámina de copos intacta como los trozos de lámina más pequeños se incluyen en la expresión “copos de patata”.

2. Alimentos fabricados a partir de productos deshidratados a base de patata

Los productos deshidratados a base de patata pueden utilizarse para fabricar cualquier producto alimenticio adecuado. Un uso especialmente preferido de los productos deshidratados a base de patata se encuentra en la producción de aperitivos procesados hechos a partir de una masa, preferiblemente patatas fritas a la inglesa procesadas. Ejemplos de dichas patatas fritas a la inglesa procesadas incluyen los descritos en US-3.998.975 concedida el 21 de diciembre de 1976 a Liepa, US-5.464.642 concedida el 7 de noviembre de 1995 a Villagran y col., US-5.464.643 concedida el 7 de noviembre de 1995 a Lodge, y WO 96/01572 publicada el 25 de enero de 1996, de Dawes y col.

En una realización, el aperitivo procesado se fabrica mediante el método que comprende:

- (1) añadir un enzima alterador de azúcar reductor a una masa, en donde dicho enzima comprende aldosa reductasa;
- (2) conformar una pieza de aperitivo a partir de la masa; y
- (3) cocinar la pieza de aperitivo para formar un aperitivo procesado.

Puede llevarse a cabo un proceso de cocinado mediante cualquier método adecuado, por ejemplo freidura, horneado, o una combinación de freidura y horneado. Además, las etapas de conformación y de cocinado pueden llevarse a cabo de forma simultánea, como por ejemplo con productos de aperitivo extruidos.

En otra realización, el aperitivo procesado se elabora mediante el método que comprende:

- (1) mezclar los ingredientes secos;
- (2) de forma opcional añadir emulsionante a los ingredientes secos;
- (3) añadir agua;
- (4) mezclar para formar una masa;
- (5) conformar una lámina de masa;
- (6) conformar una pieza de aperitivo a partir de la lámina de masa; y
- (7) cocinar la pieza de aperitivo para formar un aperitivo procesado.

Puede añadirse enzima en cualquier etapa adecuada del proceso, por ejemplo puede añadirse enzima durante las etapas de mezclado, de forma opcional durante las etapas de adición de emulsionante, de adición de agua, de mezclado, y/o de conformación. De forma alternativa, el enzima puede aplicarse, preferiblemente como una solución, a la superficie de la masa; esto puede tener lugar tanto antes como después de formar las piezas de aperitivo a partir de la lámina de masa. En una realización, la solución de enzima se añade a la superficie de la lámina de masa. El enzima comprende aldosa reductasa.

Los productos a base de patata deshidratada pueden también rehidratarse y utilizarse para producir productos alimenticios tales como puré de patata, hamburguesas de patata, tortitas de patata a la americana, y otros productos de patata tales como patatas fritas a la francesa extruidas y tiras de patata frita cortadas de forma fina y alargada. Por ejemplo, los productos de patata deshidratados se pueden usar para producir productos de patata frita a la francesa extruidos, tales como los descritos en las patentes US-3.085.020, concedida el 9 de abril de 1963 a Backinger y col., y US-3.987.210, concedida el 18 de octubre de 1976 a Cremer. Los productos de patata deshidratados pueden utilizarse también en diferentes tipos de pan, jugos de carne asada, salsas, comida para bebé, o cualquier otro producto alimenticio adecuado.

ES 2 335 500 T3

3. *Patatas fritas a la inglesa*

La presente invención puede utilizarse para fabricar patatas fritas a la inglesa con niveles reducidos de acrilamida. Lo siguiente expone un método preferido de fabricar dichos productos basados en patatas fritas a la inglesa, pero la presente invención no se limita a esta realización particular. Por ejemplo, puede añadirse enzima a cualquier etapa de procesamiento de métodos de elaboración de patatas fritas a la inglesa reconocidos por la técnica, tales como los expuestos en *Potato Processing*, en las págs. 371-489.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de acrilamida en patatas fritas a la inglesa, que comprende:

- (1) de forma opcional pelar patatas;
- (2) de forma opcional lavar patatas;
- (3) cortar patatas para formar rodajas de patata;
- (4) de forma opcional aclarar las rodajas de patata;
- (5) de forma opcional escaldar las rodajas de patata;
- (6) de forma opcional enfriar las rodajas de patata;
- (7) añadir enzima alterador de azúcar reductor a las rodajas de patata, en donde dicho enzima comprende aldosa reductasa;
- (8) de forma opcional secar las rodajas de patata;
- (9) freir las rodajas de patata para formar patatas fritas a la inglesa.

Con máxima preferencia, las rodajas de patata se escaldan antes de añadir el enzima. Aunque lo anterior describe la adición de enzima en la etapa (7) anterior, debería entenderse que puede añadirse enzima en cualquier etapa adecuada del proceso. Por ejemplo, puede añadirse enzima a las patatas antes de cortarlas en rodajas, después de cortarlas en rodajas, después del aclarado, durante el escaldado, durante el enfriamiento, o en cualquier otra etapa adecuada previa al secado, si se lleva a cabo la etapa opcional de secado, o en cualquier otra fase adecuada antes de freir si las rodajas de patata no se dejan secar de forma opcional.

En otra realización, se bombean soluciones de escaldado y de remojo de rodajas de patata que contienen azúcar reductor a través de una columna que contiene enzima inmovilizado. El efluente de la columna se envía de nuevo a las rodajas de patata. Las rodajas de patata se procesan entonces según procedimientos de procesamiento típicos. Realizando el método de este modo puede devolverse al menos parte de los sabores de patata naturales de nuevo a la patata frita a la inglesa que pueden haberse perdido durante el escaldado y durante las fases de tratamiento con enzima.

Las patatas fritas a la inglesa según el método de la presente memoria pueden tener menos de aproximadamente 150 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 100 ppb, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 ppb, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ppb, y con máxima preferencia menos de aproximadamente 5 ppb.

4. *Patatas fritas a la francesa*

La presente invención puede utilizarse para fabricar patatas fritas a la francesa con niveles reducidos de acrilamida. Lo siguiente expone un método preferido de fabricar tales patatas fritas a la francesa, pero la presente invención no está limitada a esta realización particular. Por ejemplo, puede añadirse enzima en cualquier etapa de procesamiento adecuada de métodos reconocidos en la técnica para fabricar patatas fritas a la francesa, tales como los expuestos en *Potato Processing*, en las págs. 491-534, o los métodos descrito en las patentes US-6.001.411 y 6.013.296.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para reducir el nivel de acrilamida en patatas fritas a la francesa, que comprende:

- (1) de forma opcional pelar patatas;
- (2) de forma opcional lavar patatas;
- (3) cortar patatas para formar tiras de patatas;
- (4) de forma opcional aclarar las tiras de patata;

ES 2 335 500 T3

(5) de forma opcional escaldar las tiras de patata;

(6) de forma opcional dejar enfriar las tiras de patata;

5 (7) añadir un enzima alterador de azúcar reductor a las tiras de patata, en donde dicho enzima alterador de azúcar reductor comprende aldosa reductasa;

(8) de forma opcional dejar secar las tiras de patata;

10 (9) de forma opcional recubrir las tiras de patata; y

(10) freír parcialmente las tiras de patata para formar patatas semifritas a la francesa.

15 Las patatas semifritas a la francesa se pueden entonces congelar, envasar y almacenar para posteriormente freírlas para obtener las patatas fritas a la francesa finales.

Con máxima preferencia, las tiras de patata se escaldan antes de añadir el enzima. Si se desea obtener patatas fritas a la francesa recubiertas, puede utilizarse un material de recubrimiento adecuado, como por ejemplo almidón o una mezcla de materiales que comprendan uno o varios tipos de almidón para recubrir las tiras de patata antes de la freidura parcial. Aunque lo anterior describe adición de enzima en la etapa (7) anterior, debería entenderse que puede añadirse enzima en cualquier etapa adecuada del proceso. Por ejemplo, puede añadirse enzima a las patatas antes de cortar, después de cortar, después de aclarar, durante el escaldado, durante el enfriamiento, o en cualquier otra fase adecuada antes del secado, si se realiza la etapa opcional de secado, o en cualquier otra fase adecuada antes de la freidura parcial si las tiras de patata no se dejan secar de forma opcional. Aunque menos preferido, puede añadirse enzima entre las etapas de freidura parcial y de freidura final para formar las patatas fritas a la francesa finales.

20 Las patatas fritas a la francesa acabadas fabricadas a partir de las patatas semifritas a la francesa de la presente invención pueden tener menos de aproximadamente 40 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 30 ppb, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 ppb, y con máxima preferencia menos de aproximadamente 10 ppb.

5. Trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho

35 Los trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho son productos de aperitivo para el consumidor especialmente populares. Los trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho se fabrican de forma tradicional a partir de grano de maíz entero que ha sido cocinado en una solución de cal caliente durante aproximadamente 5 a aproximadamente 50 minutos, y luego se ha dejado macerar durante la noche. El proceso de cocinado-macerado ablanda el casco externo y gelatiniza parcialmente el almidón en el endosperma del maíz. Este maíz cocinado-macerado, called "nixtamal," se lava a continuación para eliminar el casco exterior y se tritura para formar una masa plástica, conocida como "masa de harina de maíz", que contiene aproximadamente 50% de humedad. La masa de harina de maíz recién triturada se dispone en forma de láminas, se corta en piezas de aperitivo y se hornea durante aproximadamente 15 a aproximadamente 30 segundos a una temperatura de aproximadamente 302°C (575°F) a aproximadamente 316°C (600°F) para reducir el contenido de humedad hasta de aproximadamente 20% a aproximadamente 35%. Los trozos de aperitivo horneados se frien a continuación en aceite caliente para formar trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho que tienen un contenido de humedad de menos de aproximadamente 3%. Véase, p. ej., US-2.905.559, concedida el 1 de noviembre de 1958 a Anderson y col., US-3.690.895, concedida el 12 de septiembre de 1979 a Amadon y col., y *Corn: Chemistry and Technology*, American Association of Cereal Chemists, Stanley A. Watson, *et al.*, Ed., págs. 410-420 (1987).

50 También pueden fabricarse trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho a partir de harina seca elaborada a partir de masa de harina de maíz. En procesos típicos para fabricar dicha harina seca elaborada a partir de masa de harina de maíz, como por ejemplo los que se describen en US-2.704.257 concedida el 1 de marzo de 1955 a de Sollano y col., y US-3.369.908, concedida el 10 de febrero de 1968 a Gonzales y col., el maíz tratado a la cal se tritura y se deshidrata hasta obtener una forma estable. La masa de harina de maíz de grano molido fino puede rehidratarse posteriormente con agua para formar una masa de harina de maíz que se utiliza posteriormente para producir trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho, como por ejemplo los que se describen en WO 01/91581, publicada el 6 de diciembre de 2001, de Zimmerman y col.

60 En una realización, un trozo de tortilla frita de maíz de tipo nacho fabricado a partir de masa de harina de maíz se fabrica mediante el método que comprende:

(1) añadir un enzima alterador de azúcar reductor a una masa que comprende masa de harina de maíz, en el que dicho enzima comprende aldosa reductasa;

65 (2) conformar una pieza de aperitivo a partir de la masa; y

(3) cocinar la pieza de aperitivo para formar un trozo de tortilla de maíz de tipo nacho.

ES 2 335 500 T3

En otra realización, un trozo de tortilla frita de maíz de tipo nacho fabricado a partir de nixtamal se fabrica mediante el método que comprende:

- (1) añadir un enzima alterador de azúcar reductor al nixtamal, en el que dicho enzima comprende aldosa reductasa;
- (2) conformar una pieza de aperitivo a partir del nixtamal; y
- (3) cocinar la pieza de aperitivo para conformar un trozo de tortilla de maíz de tipo nacho.

Puede añadirse el enzima en cualquier fase adecuada del proceso. En una realización, la solución de enzima se añade a la superficie de la lámina de masa.

Puede llevarse a cabo un proceso de cocinado mediante cualquier método adecuado, por ejemplo mediante freidura, horneado, o una combinación de freidura u horneado. Además, las etapas de conformación y de cocinado pueden llevarse a cabo de forma simultánea, como por ejemplo mediante extrusión.

En otra realización, los trozos de tortilla frita de maíz de tipo nacho contienen menos de aproximadamente 75 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 50 ppb, y más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ppb. En otra realización, los fritos de maíz fabricados mediante el método descrito en la presente memoria comprenden menos de aproximadamente 75 ppb de acrilamida, preferiblemente menos de aproximadamente 50 ppb, y más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ppb.

D. Artículo comercial

La presente invención puede utilizarse en la fabricación de un artículo de comercio que comprende:

- (a) un producto alimenticio, en el que dicho producto alimenticio tiene un nivel reducido de acrilamida;
- (b) un recipiente para contener el producto alimenticio; y
- (c) un mensaje asociado con el recipiente.

El mensaje informa al usuario de que el producto alimenticio contiene un nivel reducido de acrilamida. El mensaje puede ser material impreso adjuntado directamente o indirectamente al recipiente, adjuntado directamente o indirectamente cerca del recipiente, o de forma alternativa puede ser un mensaje impreso, electrónico, o transmitido asociado con el producto alimenticio o con el recipiente.

El producto alimenticio que tiene niveles reducidos de acrilamida se comercializa en un recipiente que tiene un mensaje asociado con el mismo. Cualquier recipiente a partir del cual pueda administrarse, presentarse, exponerse o almacenarse el producto alimenticio es adecuado. Recipientes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, bolsas, botes, cajas, boles, platos, tarrinas, y latas.

El mensaje informa al consumidor de que el producto alimenticio contiene un nivel reducido de acrilamida. El mensaje puede ser material impreso adjuntado directamente o indirectamente a la superficie del recipiente, adjuntado directamente o indirectamente cerca del recipiente, o de forma alternativa puede ser un mensaje impreso, electrónico, o transmitido asociado con el producto alimenticio o con el recipiente. Mensajes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, mensajes que informan de la presencia de niveles “reducidos” o “bajos” de acrilamida, mensajes que informan de que menos de una cantidad especificada de acrilamida está presente (p. ej., menos de 5 ppb), y mensajes que informan de que el producto alimenticio alcanza o supera un nivel recomendado u obligatorio (p. ej., nivel de señal o umbral de cumplimiento obligatorio).

El mensaje podría informar también al consumidor de que el producto alimenticio está fabricado con un ingrediente o ingredientes con niveles reducidos o bajos de azúcar reductor.

Métodos Analíticos

Los parámetros utilizados para caracterizar los elementos de la presente invención son cuantificados mediante métodos analíticos particulares. Estos métodos se describen detalladamente a continuación.

ES 2 335 500 T3

1. Acrilamida

Método para medir acrilamida (AA) en productos alimenticios

5 Resúmen

Se introduce acrilamida 1-¹³C (AA¹³C) en productos alimenticios y se someten a extracción con agua caliente. El sobrenadante acuoso se extrae tres veces con acetato de etilo, y los extractos de acetato de etilo se combinan y concentran y analizan mediante LC/MS con monitorización de ion seleccionado para la detección específica de AA y de AA¹³C.

Extracción de muestra

- 15 1. Pesar 6,00 ± 0,01 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Nota: colocar la muestra en un procesador de alimentos y pulsar durante 30 segundos de manera que el tamaño de partículas sea de aproximadamente 0,32 cm (1/8 pulgada) o inferior. Si la muestra es demasiado pequeña como para ser triturada de forma eficaz en un procesador de alimentos, colocar la muestra en una bolsa de plástico nueva (p. ej., Whirl-PakTM o equivalente) y pulverizarla con un mazo de caucho hasta que el tamaño de partícula sea de 0,32 cm (1/8 pulgada) o inferior.
- 20 2. Añadir 120 µL de 100 ng/µL AA ¹³C a agua destilada desionizada (patrón interno 2), con una pipeta ajustable 1000-µL (calibrada), directamente sobre la muestra.
- 25 3. Utilizando un dispensador, añadir 40 mL de agua destilada desionizada al matraz y cubrirlo con papel de aluminio.
4. Colocar en un baño de agua a 65°C durante 30 minutos.
- 30 5. Con un dispensador, añadir 10 mL de dicloruro de etileno al matraz, y homogeneizar con un Tekmar TissumizerTM (SDT-1810) o Ultra-Turrax[®] (T18 Basic) durante 30 segundos, o hasta que quede uniforme. Aclarar la sonda en el matraz con agua destilada desionizada.
- 35 6. Colocar 25 g del producto homogeneizado en un vial de 8 dracmas
7. Tapar el tubo de forma hermética y centrifugar durante 30 minutos a 2500-5200 RPM.
8. Transferir 8 g de sobrenadante a otro vial de 8 dracmas tratando de no transferir partículas sólidas.
- 40 9. Añadir 10 mL de acetato de etilo con un dispensador, tapar y agitar con agitador Vortex durante 10 segundos.
10. Dejar fraccionar cualquier emulsión que se haya podido formar; ayudar mediante agitación suave o sacudiendo una o dos veces y a continuación permitir que las capas se separen.
- 45 11. Transferir tanta cantidad de la capa superior (acetato de etilo) como sea posible a un vial de centelleo, sin transferir nada de líquido (agua) de la interfase. Extraer dos veces más con porciones de 5 mL de acetato de etilo y añadir al mismo vial de centelleo. Entonces, añadir aproximadamente 2 g de sulfato de sodio anhidro.
- 50 12. Concentrar el extracto con un vapor suave de nitrógeno en un baño de agua a 60-65°C hasta aproximadamente 1 mL. Transferir el extracto a un vaso de forma cónica Pierce REACTI-VIALTM o equivalente y concentrar de forma adicional el extracto hasta un volumen final de aproximadamente 100-200 µL. Colocar este extracto en un vial automuestreador con una manga cónica.

55

60

65

ES 2 335 500 T3

Preparación de patrones

Soluciones madre y patrones internos

Solución	Peso	Matraz volumétrico	Disolvente	Concentración (ppm)
Solución madre 1	0,1000 g de acrilamida (AA)	100 mL	Acetato de etilo	1000
Patrón interno 1	0,0100 g Acrilamida ¹³ C	100 mL	Acetato de etilo	100
Solución madre 2	0,1000 g de acrilamida (AA)	100 mL	Agua destilada desionizada	1000
Patrón interno 2	0,0100 g Acrilamida ¹³ C	100 mL	Agua destilada desionizada	100

Patrones intermedios

Solución	Volumen de solución madre 1 de AA (µL)	Matraz volumétrico (mL)	Disolvente	Concentración (ppm)
INT 1	100	10	Acetato de etilo	10
INT 2	1000	10	Acetato de etilo	100

Estándares de calibración

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

ES 2 335 500 T3

Procedimiento para limpiar el homogeneizador

Aplicar este procedimiento de limpieza entre cada muestra.

- 5 1. Llenar un matraz Erlenmeyer de 1 L con agua corriente caliente ($\approx 80\%$ lleno) y añadir una gota de lavavajillas líquido Dawn™ (comercializado por Procter & Gamble Co.) o equivalente.
2. Insertar la sonda del elemento dispersante en agua tan adentro como sea posible.
- 10 3. Homogeneizar la solución durante aproximadamente 10-15 segundos.
4. Vaciar la solución de lavado del Erlenmeyer; aclarar y volver a llenar el matraz con agua corriente caliente.
- 15 5. Homogeneizar de nuevo durante aproximadamente 10-15 segundos.
6. Vaciar el matraz y volverlo a llenar con agua corriente caliente; homogeneizar de nuevo durante aproximadamente 10-15 segundos.
- 20 7. Si el agua no está clara y exenta de sólidos en forma de partículas, continuar homogeneizando agua corriente caliente limpia tantas veces como sea necesario para alcanzar esta condición.
8. Cuando el agua corriente caliente esté clara y exenta de sólidos en forma de partículas, aclarar la sonda con agua destilada desionizada.

25

Análisis mediante LC/MS

Las muestras se analizan utilizando un Waters 2690 LC acoplado a un espectrómetro de masas Micromass LCZ.

30

Fase móvil	100% H ₂ O, 10 mM NH ₄ Ac, ajustada a pH 4,6 en peso de ácido fórmico
35 Columna	2,0 mm x 150 mm, YMC C18 AQ (comercializada por Waters Corp.)
Caudal	0,2 mL/min
Interfase	Directa (no división)
40 Volumen de inyección	5 μ L
Modo de ionización MS	Electrospray, modo de ion positivo
45 Modo de detección MS	Monitorización de ion seleccionado: m/z 72 (AA), m/z 73 (AA ¹³ C); tiempos de residencia: 0,5 s

50

Análisis de datos

Se representan las relaciones de respuesta (área de pico de AA/área de pico de AA¹³C) frente a las relaciones de concentración para series de cinco estándares en acetato de etilo. Todos los patrones contienen 4,5 μ g/mL AA¹³C, y concentraciones de AA en el intervalo de 0 a 5 μ g/mL. Mediante regresión lineal se obtiene una curva de calibración a partir de la cual se determinan relaciones de concentración en extractos a partir de relaciones de respuesta medidas. Cuando esta relación de concentración se multiplica por el nivel de AA¹³C (aproximadamente 2 ppm) determinado de forma precisa añadido a la muestra en la etapa dos del procedimiento de extracción, se obtiene el nivel de AA en ppm.

Calculo de muestra mediante LC/MS:

60 La curva de calibración se genera representando gráficamente la relación de respuesta (área m/z 72/área m/z 73) en el eje y frente a la relación de concentración ([AA] / [AA 13C]) en el eje x. Para este ejemplo, la ecuación de esta recta es $y = 0,899x + 0,0123$.

65 Área medida de pico de AA (m/z 72) a 4,0 min: 100.000

Área medida de pico de AA 13C (m/z 73) a 4,0 min: 500.000

ES 2 335 500 T3

Relación de respuesta $R_r = 0,200$. A partir de la pendiente y del punto de intersección de la curva de calibración se calcula la relación de concentración R_c : $R_c = (0,200 - 0,0123) / 0,899 = 0,209$

Dado el nivel de AA 13C introducido en la muestra (2 ppm), el nivel medido de AA es $0,209 \times 2 \text{ ppm} = 0,418 \text{ ppm}$

5

Garantía de calidad/Control de calidad (GC/CC)

10

1. Deben comprobarse semanalmente las calibraciones de todas las balanzas utilizadas en la preparación de estándares y/o muestras con una serie de pesas cualificadas. Las balanzas deberían comprobarse con al menos tres pesas que cubran el intervalo de pesos de muestra/patrones que deban medirse.
2. Debería realizarse diariamente una curva de calibración de seis puntos.
3. Con cada serie de muestras debería analizarse un material de referencia de trabajo (WRM, por sus siglas en inglés). La concentración de este material debería de estar en 2σ de la media móvil. Si no, el instrumento debería recalibrarse y recalcularse el WRM.

15

20 *2. % de reducción de acrilamida*

$\% \text{ de reducción de acrilamida} = [(\text{nivel de acrilamida en la muestra de control} - \text{nivel de acrilamida en la muestra tratada con enzima}) / \text{nivel de acrilamida en la muestra de control}] \times 100$.

25

La muestra de control se prepara exactamente del mismo modo que la muestra tratada con enzima, salvo que no se añade enzima.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para reducir el nivel de acrilamida en un producto alimenticio, que comprende reducir el nivel de
azúcar reductor en el producto alimenticio antes de calentar, en el que reducir el nivel de azúcar reductor en el producto
para la alimentación comprende añadir un enzima alterador de azúcar reductor al producto alimenticio, y en el que
dicho enzima de azúcar reductor comprende aldosa reductasa.

10 2. Un método para reducir el nivel de acrilamida en alimentos que comprende:

(1) añadir un enzima alterador de azúcar reductor a un producto alimenticio, en el que dicho enzima de azúcar
reductor comprende aldosa reductasa y en el que dicho producto alimenticio comprende azúcar reductor;

(2) de forma opcional mezclar el enzima con el producto alimenticio;

15 (3) permitir un tiempo suficiente para que el enzima reaccione con el azúcar reductor;

(4) de forma opcional desactivar o de forma opcional eliminar el enzima; y

20 (5) calentar el producto alimenticio para formar el producto final para la alimentación.

3. El método de la reivindicación 2, en el que el nivel de acrilamida en el producto acabado para la alimentación
se reduce en al menos aproximadamente 10%.

25 4. El método de la reivindicación 3, en el que el nivel de acrilamida en el producto acabado para la alimentación
se reduce en al menos aproximadamente 30%.

30 5. El método de la reivindicación 4, en el que el nivel de acrilamida en el producto acabado para la alimentación
se reduce en al menos aproximadamente 50%.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el nivel de acrilamida en el producto acabado para la alimentación
se reduce en al menos aproximadamente 70%.

35 7. El método de la reivindicación 6, en el que el nivel de acrilamida en el producto acabado para la alimentación
se reduce en al menos aproximadamente 90%.

40

45

50

55

60

65

Figura 1

