

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-069884- -00000-0000

Fecha 2007-07-10 14:08:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
F. 11 "PATENTELIY" Lva 075 FASE NACIONAL
F. 11 PRESENTACION Folios 173

cación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC.

Dirección: 7701 Legacy Drive, Plano, Texas 75024-4099, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

79.143.366 de

Usaquén

TP 20.281

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: ELDER, Vincent Allen

Dirección: 2903 Panorama Drive, Carrollton, TX 75007, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/043302

Fecha 29-NOV-05

Publicación Internacional No. WO/2006/076084

Fecha 20-JUL-06

⑥ Título (54)

MÉTODO PARA MEJORAR LA DESCOMPOSICIÓN DE ACRILAMIDA

⑦

Clasificación Internacional (51)

A21D 2/00

⑧

Prioridad

(33) Pais de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

11-ENE-05

11/033,364

SI

☒ X

NO

☐

⑨

Comprobante de pago No. 07-31023

Fecha 17-ABR-07

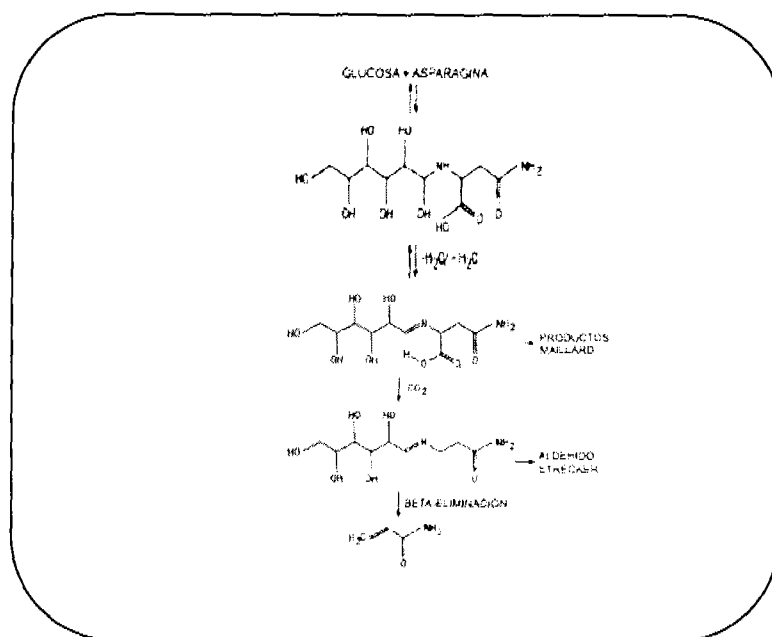
10

ANEXOS

00000

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos, Reporte de búsqueda y notificación de presentación de documento de prioridad.

11 FIGURA CARATERISTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

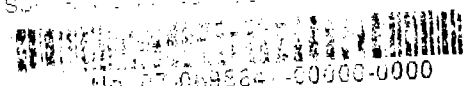
FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

23
DIB
000000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-069824-0000-0000

Fecha: 21/07/2007 14:00:04 Dep. 2020 NULOREACIONE
Pag. 111 PATENTISTAS Eje 378 FASENACIONALI
Art. 111 PRESENTACION Folios 173

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 31,023
FECHA : ABRIL 17 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54690755	17/04/2007	64,180,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

00041

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 2912052 de un documento escrito en inglés, efectuada el día 29 de diciembre de 2005 por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

Texto en inglés y en español mediante el cual **Frito-Lay North America, Inc.** otorga poder a **ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ y/o OLGA GEORGETTE OTERO y/o RICARDO METKE MÉNDEZ y/o JUAN PABLO CONCHA.**

Dado y suscrito en Plano, TX, Estados Unidos el 01 de noviembre de 2005
(Firmado) Thomas P. Schur, Subsecretario

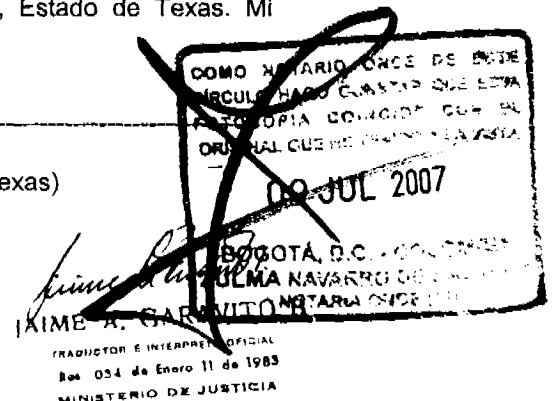
CERTIFICACION NOTARIAL

Texto en inglés y en español mediante el cual el suscrito Notario Público certifica la existencia legal de la sociedad **Frito-Lay North America, Inc.**, así como las funciones y firma de su representante autorizado **Thomas P. Schur**, Subsecretario, para efectos de lo cual se basó en la Escritura de Constitución presentada ante la Secretaría de Estado de Delaware el 10 de septiembre de 1989.
(Firmado) Lisa Mitchell, Notario Público

(Sello notarial que dice: "Lisa Mitchell, Notario Público, Estado de Texas. Mi comisión vence el 25 de julio de 2009")

(Aparece impreso sello del Estado de Texas)

Estado de Texas
Secretaría de Estado
APOSTILLA



1. País: Estados Unidos de América

000/1

2

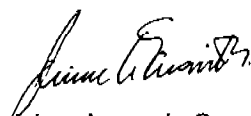
Este documento público

2. Ha sido firmado por LISA MITCHELL
3. Quien actúa en calidad de Notario Público, Estado de Texas
4. Lleva el sello de LISA MITCHELL, Notario Público, Estado de Texas. Mi comisión vence: Julio 25/09

Certificado

5. En Austin, Texas
6. El 04 de noviembre de 2005
7. Por el Secretario del Estado de Texas
8. Certificado N° N-497162
9. Sello (Aparece sello del Estado de Texas)
10. Firma (firmado) Roger Williams, Secretario de Estado

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

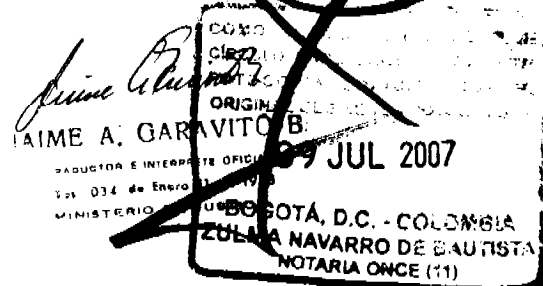


Jaime Armando Garavito Burgos

c.c. N° 19.130.702 de Bogotá

Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 38735





The State of Texas

Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
- This public document*
2. has been signed by LISA MITCHELL
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Texas

4. and bears the seal/stamp of LISA MITCHELL, Notary Public, State of Texas, Commission Expires: 07-25-09

CERTIFIED

5. at Austin, Texas
6. on November 4, 2005
7. by the Secretary of State of Texas
8. Certificate No. N-497162
9. Seal
10. Signature:



Roger William

Roger William
Secretary of State

BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA
ZULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

JUL 2007

BAKER & MCKENZIE

Ralsbeck, Lara, Rodríguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6
Bogotá, Colombia

NIT: 860 088 840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

Frito-Lay North America, Inc.

domiciled in

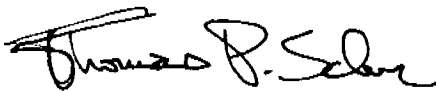
7701 Legacy Drive, Plano, Texas 75024-4099, US

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or OLGA
GEORGETTE OTERO and/or RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA

with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6th floor, of Bogotá D. C., Colombia, a full and sufficient power of attorney to obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits, layout-designs and vegetal varieties; the registration of trademarks, denominations of origin, commercial names, trade emblems, slogans and domain names; its renewal, assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Processes of protection to the consumer, unfair competition, oppositions, cancellations, nullity, precautionary injunctions, infringement, granting of licenses, writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.



Done and subscribed in Plano, TX, US

On the 1st day of November of 2005

PODER

La abajo firmada,

Nombre de la Compañía
Frito-Lay North America, Inc.

domiciliada en

Dirección, ciudad, estado, país

7701 Legacy Drive, Plano, Texas
75024-4099 USA

declara por el presente que otorga a

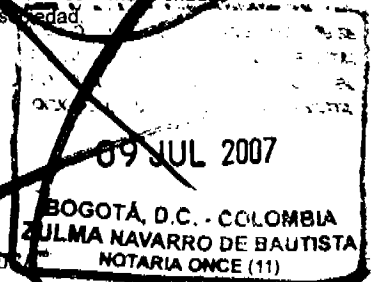
ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or OLGA GEORGETTE
OTERO and/or RICARDO METKE and/or JUAN PABLO
CONCHA

con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; el registro de marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado hasta el momento en los mismos asuntos, por cualquiera de los mencionados apoderados en representación de esta sociedad.

Dado y firmado en Plano, TX, US

A los 1 días del mes de Noviembre de 2005



NOTARIAL CERTIFICATION

On this 1st day of November
2005, the undersigned Notary

Lisa Mitchell

CERTIFIES

1. That **Thomas P. Schur**
of legal age and domiciled in **Plano, Texas, US**
set his hand on the foregoing document.
2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.
3. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant Secretary

of the judicial person **Frito-Lay North America, Inc.**

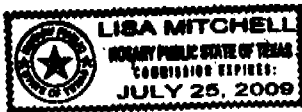
4. That the judicial person **Frito-Lay North America, Inc.**
having its home office in **Plano, Texas, US**

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.
6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source.

Articles of Incorporation were filed with
Delaware Secretary of State on September
10, 1989.

Lisa Mitchell



Notary Public

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 1 días del mes de Noviembre
de 2005, el suscrito Notario

Lisa Mitchell

DA FE

1. Que **Thomas P. Schur**
mayor y domiciliado en **Plano, Texas, US**
suscribió de su puño y letra el documento que antecede.
2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.
3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de **Secretaria Asistente**

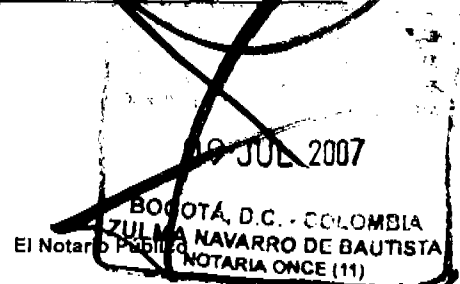
de la persona jurídica **Frito-Lay North America, Inc.**

4. Que la persona jurídica **Frito-Lay North America, Inc.**
con sede en **Plano, Texas, USA**

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.
6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Artículos de Incorporación fueron
presentados ante la Secretaria
del Estado de Delaware en Septiembre
10 de 1989



0000/

Cuadro No. VIII(ii) DECLARACIÓN: DERECHO A SOLICITAR Y A QUE SEA OTORGADA UNA PATENTE

La declaración se debe adecuar a la redacción estandarizada suministrada en la sección 212; ver notas a los cuadros Nos. VIII, VIII(i) a (v) (en general) y en las notas específicas en el cuadro No. VIII(ii). Si este cuadro no se utiliza, esta hoja no debe ser incluida en la solicitud.

Declaración del derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, ha solicitar y a que le sea otorgada una patente (reglas 4.17(ii) y 51bis. 1(a) (ii)), en caso de que la declaración bajo la regla 4.17 (iv) no sea apropiado:

En relación con esta solicitud internacional,

FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC. tiene derecho a solicitar y a que le sea otorgada una patente en virtud de lo siguiente:

Una cesión de:

Vincent Allent ELDER

a FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC

Registrada el 17 de febrero de 2005, en "Reel/Frame 015731/0015"

Esta declaración se hace para los propósitos de todas las designaciones excepto la designación de los Estados Unidos de América.

Box No. VIII (ii) DECLARATION OF ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT
The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51 bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

In relation to this international application,

FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

Vincent Allen ELDER

to FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC.,

recorded on 17 February 2005, at Reel/Frame 015731/0015.

This declaration is made for the purpose of all designations, except for the designation of the United States of America.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 July 2006 (20.07.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/076084 A3

(51) International Patent Classification:
A21D 2/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/043302

(22) International Filing Date:
29 November 2005 (29.11.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11/033,364 11 January 2005 (11.01.2005) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:

US	Not furnished (CON)
Filed on	Not furnished
US	10/929,922 (CIP)
Filed on	30 August 2004 (30.08.2004)
US	10/931,021 (CIP)
Filed on	31 August 2004 (31.08.2004)
US	10/372,738 (CIP)

Filed on 21 February 2003 (21.02.2003)
US 10/372,154 (CIP)

Filed on 21 February 2003 (21.02.2003)
US 10/247,504 (CIP)

Filed on 19 September 2002 (19.09.2002)

(71) Applicant (for all designated States except US):
FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC. [US/US];
7701 Legacy Drive, Plano, TX 75024-4099 (US).

(72) Inventor; and

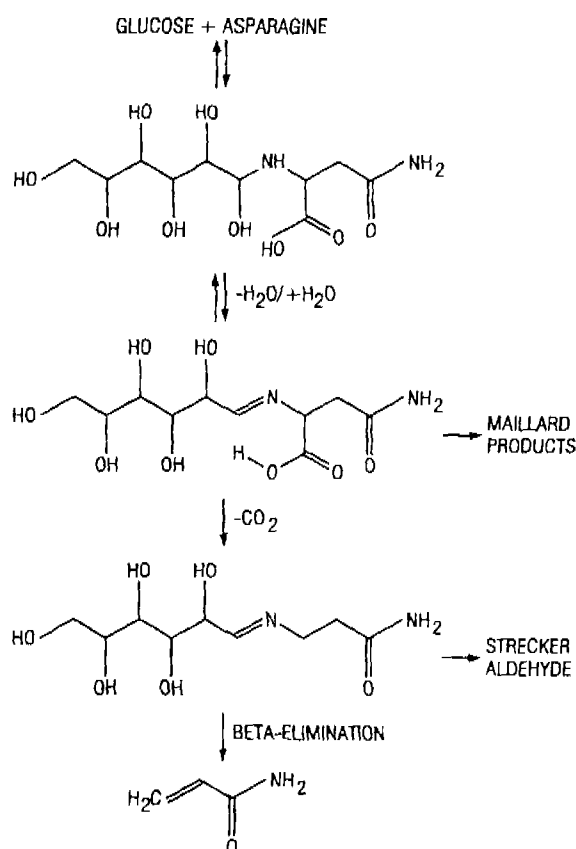
(75) Inventor/Applicant (for US only): **ELDER, Vincent, Allen** [US/US]; 2903 Panorama Drive, Carrollton, TX 75007 (US).

(74) Agent: **CAHOON, Colin, P.**; Carstens & Cahoon, L.L.P., P.O. Box 802334, Dallas, TX 75380 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR ENHANCING ACRYLAMIDE DECOMPOSITION



(57) Abstract: A combination of a free thiol compound and a reducing agent is added to a fabricated food prior to cooking in order to reduce the formation of acrylamide. The fabricated food product can be a corn chip or a potato chip. Alternatively, a non-fabricated snack product, such as a potato chip from a sliced potato can be contacted with a solution having a free thiol compound and a reducing agent. The reducing agent can include any soluble compound that is an electron donor or combination of such compounds. The free thiol compound and reducing agent can be added during milling, dry mix, wet mix, or other admix, so that the agents are present throughout the food product. The combination of the reducing agent and free thiol compound can be adjusted in order to reduce the acrylamide formation in the finished product to a desired level while minimally affecting the quality and characteristics of the end product.

WO 2006/076084 A3



LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US (patent), UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report

(88) **Date of publication of the international search report:**

1 February 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

000000

METHOD FOR ENHANCING ACRYLAMIDE DECOMPOSITION

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 1. Cross-Reference to Related Applications

This application is a continuation-in-part of co-pending U.S. Patent Application 10/929,922 filed on August 30, 2004 and co-pending U.S. Patent Application 10/931,021 filed on August 31, 2004, which are continuations-in-part of co-pending U.S. Patent Application 10/372,738 and co-pending U.S. Patent Application 10/372,154, both filed on 10 February 21, 2003. U.S. Patent Application 10/372,154 is a continuation-in-part of co-pending U.S. Patent Application 10/247,504, filed September 19, 2002.

2. Technical Field

The present invention relates to a method for reducing the amount of acrylamide in thermally processed foods and permits the production of foods having significantly reduced 15 levels of acrylamide. The invention more specifically relates to: a) adding a combination of two or more acrylamide-reducing agents when making a fabricated food product and b) the use of various acrylamide-reducing agents during the production of potato flakes or other intermediate products used in making a fabricated food product.

3. Description of Related Art

20 The chemical acrylamide has long been used in its polymer form in industrial applications for water treatment, enhanced oil recovery, papermaking, flocculants, thickeners, ore processing and permanent press fabrics. Acrylamide participates as a white crystalline solid, is odorless, and is highly soluble in water (2155 g/L at 30°C). Synonyms for acrylamide include 2-propenamide, ethylene carboxamide, acrylic acid amide, vinyl amide, 25 and propenoic acid amide. Acrylamide has a molecular mass of 71.08, a melting point of 84.5°C, and a boiling point of 125°C at 25 mmHg.

In very recent times, a wide variety of foods have tested positive for the presence of

acrylamide monomer. Acrylamide has especially been found primarily in carbohydrate food products that have been heated or processed at high temperatures. Examples of foods that have tested positive for acrylamide include coffee, cereals, cookies, potato chips, crackers, french-fried potatoes, breads and rolls, and fried breaded meats. In general, relatively low contents of acrylamide have been found in heated protein-rich foods, while relatively high contents of acrylamide have been found in carbohydrate-rich foods, compared to non-detectable levels in unheated and boiled foods. Reported levels of acrylamide found in various similarly processed foods include a range of 330 - 2,300 ($\mu\text{g/kg}$) in potato chips, a range of 300 - 1100 ($\mu\text{g/kg}$) in french fries, a range 120 - 180 ($\mu\text{g/kg}$) in corn chips, and levels ranging from not detectable up to 1400 ($\mu\text{g/kg}$) in various breakfast cereals.

It is presently believed that acrylamide is formed from the presence of amino acids and reducing sugars. For example, it is believed that a reaction between free asparagine, an amino acid commonly found in raw vegetables, and free reducing sugars accounts for the majority of acrylamide found in fried food products. Asparagine accounts for approximately 40% of the total free amino acids found in raw potatoes, approximately 18% of the total free amino acids found in high protein rye, and approximately 14% of the total free amino acids found in wheat.

The formation of acrylamide from amino acids other than asparagine is possible, but it has not yet been confirmed to any degree of certainty. For example, some acrylamide formation has been reported from testing glutamine, methionine, cysteine, and aspartic acid as precursors. These findings are difficult to confirm, however, due to potential asparagine impurities in stock amino acids. Nonetheless, asparagine has been identified as the amino acid precursor most responsible for the formation of acrylamide.

Since acrylamide in foods is a recently discovered phenomenon, its exact mechanism of formation has not been confirmed. However, it is now believed that the most likely route

00011

WO 2006/076084

PCT/US2005/043302

for acrylamide formation involves a Maillard reaction. The Maillard reaction has long been recognized in food chemistry as one of the most important chemical reactions in food processing and can affect flavor, color, and the nutritional value of the food. The Maillard reaction requires heat, moisture, reducing sugars, and amino acids.

5 The Maillard reaction involves a series of complex reactions with numerous intermediates, but can be generally described as involving three steps. The first step of the Maillard reaction involves the combination of a free amino group (from free amino acids and/or proteins) with a reducing sugar (such as glucose) to form Amadori or Heyns rearrangement products. The second step involves degradation of the Amadori or Heyns
10 rearrangement products via different alternative routes involving deoxyosones, fission, or Strecker degradation. A complex series of reactions - including dehydration, elimination, cyclization, fission, and fragmentation - results in a pool of flavor intermediates and flavor compounds. The third step of the Maillard reaction is characterized by the formation of brown nitrogenous polymers and co-polymers. Using the Maillard reaction as the likely route
15 for the formation of acrylamide, Figure 1 illustrates a simplification of suspected pathways for the formation of acrylamide starting with asparagine and glucose.

Acrylamide has not been determined to be detrimental to humans, but its presence in food products, especially at elevated levels, is undesirable. As noted previously, relatively higher concentrations of acrylamide are found in food products that have been heated or
20 thermally processed. The reduction of acrylamide in such food products could be accomplished by reducing or eliminating the precursor compounds that form acrylamide, inhibiting the formation of acrylamide during the processing of the food, breaking down or reacting the acrylamide monomer once formed in the food, or removing acrylamide from the product prior to consumption. Understandably, each food product presents unique challenges
25 for accomplishing any of the above options. For example, foods that are sliced and cooked as

coherent pieces may not be readily mixed with various additives without physically destroying the cell structures that give the food products their unique characteristics upon cooking. Other processing requirements for specific food products may likewise make acrylamide reduction strategies incompatible or extremely difficult.

5 By way of example, Figure 2 illustrates well-known prior art methods for making fried potato chips from raw potato stock. The raw potatoes, which contain about 80% or more water by weight, first proceed to a peeling step 21. After the skins are peeled from the raw potatoes, the potatoes are then transported to a slicing step 22. The thickness of each potato slice at the slicing step 22 is dependent on the desired the thickness of the final
10 product. An example in the prior art involves slicing the potatoes to about 0.053 inches in thickness. These slices are then transported to a washing step 23, wherein the surface starch on each slice is removed with water. The washed potato slices are then transported to a cooking step 24. This cooking step 24 typically involves frying the slices in a continuous fryer at, for example, 177°C for approximately 2.5 minutes. The cooking step generally
15 reduces the moisture level of the chip to less than 2% by weight. For example, a typical fried potato chip exits the fryer at approximately 1.4% moisture by weight. The cooked potato chips are then transported to a seasoning step 25, where seasonings are applied in a rotation drum. Finally, the seasoned chips proceed to a packaging step 26. This packaging step 26 usually involves feeding the seasoned chips to one or more weighing devices that then direct
20 chips to one or more vertical form, fill, and seal machines for packaging in a flexible package. Once packaged, the product goes into distribution and is purchased by a consumer.

Minor adjustments in a number of the potato chip processing steps described above can result in significant changes in the characteristics of the final product. For example, an extended residence time of the slices in water at the washing step 23 can result in leaching
25 compounds from the slices that provide the end product with its potato flavor, color and

texture. Increased residence times or heating temperatures at the cooking step 24 can result in an increase in the Maillard browning levels in the chip, as well as a lower moisture content. If it is desirable to incorporate ingredients into the potato slices prior to frying, it may be necessary to establish mechanisms that provide for the absorption of the added ingredients into the interior portions of the slices without disrupting the cellular structure of the chip or leaching beneficial compounds from the slice.

By way of another example of heated food products that represent unique challenges to reducing acrylamide levels in the final products, snacks can also be made from a dough. The term "fabricated snack" means a snack food that uses as its starting ingredient something other than the original and unaltered starchy starting material. For example, fabricated snacks include fabricated potato chips that use a dehydrated potato product as a starting material and corn chips that use masa flour as its starting material. It is noted here that the dehydrated potato product can be potato flour, potato flakes, potato granules, or other forms in which dehydrated potatoes exist. When any of these terms are used in this application, it is understood that all of these variations are included.

Referring back to Figure 2, a fabricated potato chip does not require the peeling step 21, the slicing step 22, or the washing step 23. Instead, fabricated potato chips start with, for example, potato flakes, which are mixed with water and other minor ingredients to form a dough. This dough is then sheeted and cut before proceeding to a cooking step. The cooking step may involve frying or baking. The chips then proceed to a seasoning step and a packaging step. The mixing of the potato dough generally lends itself to the easy addition of other ingredients. Conversely, the addition of such ingredients to a raw food product, such as potato slices, requires that a mechanism be found to allow for the penetration of ingredients into the cellular structure of the product. However, the addition of any ingredients in the mixing step must be done with the consideration that the ingredients may adversely affect the

11

WO 2006/076084

PCT/US2005/043302

sheeting characteristics of the dough as well as the final chip characteristics.

It would be desirable to develop one or more methods of reducing the level of acrylamide in the end product of heated or thermally processed foods. Ideally, such a process should substantially reduce or eliminate the acrylamide in the end product without adversely affecting the quality and characteristics of the end product. Further, the method should be easy to implement and, preferably, add little or no cost to the overall process.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

The proposed invention involves the reduction of acrylamide in food products. In the inventive process, a reducing agent is used to magnify the effect of an acrylamide-reducing agent having a free thiol, such as cysteine. In one aspect, cysteine is used as an acrylamide-reducing agent in conjunction with a reducing agent such as ascorbic acid, stannous chloride, sodium sulfite, or sodium meta-bisulfite.

The reducing agent can magnify the effectiveness of an acrylamide-reducing agent having a free thiol, thereby minimizing off-flavors that can be apparent with higher levels of acrylamide reducing agents. Hence the present invention provides a means for enhancing the quality and characteristics of the end product. Further, such a method of acrylamide reduction is generally easy to implement. The above as well as additional features and advantages of the present invention will become apparent in the following written detailed description.

PCT/US2005/043302

WO 2006/076084

PCT/US2005/043302

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The novel features believed characteristic of the invention are set forth in the appended claims. The invention itself, however, as well as a preferred mode of use, further objectives and advantages thereof, will be best understood by reference to the following detailed description of illustrative embodiments when read in conjunction with the accompanying drawings, wherein:

Figure 1 illustrates a simplification of suspected pathways for the formation of acrylamide starting with asparagine and glucose.

Figure 2 illustrates well-known prior art methods for making fried potato chips from raw potato stock.

Figures 3A and 3B illustrate methods of making a fabricated snack food according to two separate embodiments of the invention.

Figure 4 graphically illustrates the acrylamide levels found in a series of tests in which cysteine and lysine were added.

Figure 5 graphically illustrates the acrylamide levels found in a series of tests in which CaCl_2 was combined with phosphoric acid or citric acid.

Figure 6 graphically illustrates the acrylamide levels found in a series of tests in which CaCl_2 and phosphoric acid were added to potato flakes having various levels of reducing sugars.

Figure 7 graphically illustrates the acrylamide levels found in a series of tests in which CaCl_2 and phosphoric acid were added to potato flakes.

Figure 8 graphically illustrates the acrylamide levels found in a series of tests in which CaCl_2 and citric Acid were added to the mix for corn chips.

Figure 9 graphically illustrates the acrylamide levels found in potato chips fabricated with cysteine, calcium chloride, and either phosphoric acid or citric acid.

Figure 10 graphically illustrates the acrylamide levels found in potato chips when calcium chloride and phosphoric acid are added at either the flakes making step or the chip fabrication step.

5 Figure 11 graphically illustrates the effect of asparaginase and buffering on acrylamide level in potato chips.

Figure 12 graphically illustrates the acrylamide levels found in potato chips fried in oil containing rosemary.

Figure 13 graphically illustrates the effect of the addition of an oxidizing agent or reducing agent to an acrylamide-reducing agent having a free thiol.

00011

WO 2006/076084

PCT/US2005/043302

DETAILED DESCRIPTION

The formation of acrylamide in thermally processed foods requires a source of carbon and a source of nitrogen. It is hypothesized that carbon is provided by a carbohydrate source and nitrogen is provided by a protein source or amino acid source. Many plant-derived food ingredients such as rice, wheat, corn, barley, soy, potato and oats contain asparagine and are primarily carbohydrates having minor amino acid components. Typically, such food ingredients have a small amino acid pool, which contains other amino acids in addition to asparagine.

By “thermally processed” is meant food or food ingredients wherein components of the food, such as a mixture of food ingredients, are heated at temperatures of at least 80°C. Preferably the thermal processing of the food or food ingredients takes place at temperatures between about 100°C and 205°C. The food ingredient may be separately processed at elevated temperature prior to the formation of the final food product. An example of a thermally processed food ingredient is potato flakes, which is formed from raw potatoes in a process that exposes the potato to temperatures as high as 170°C. (The terms “potato flakes”, “potato granules”, and “potato flour” are used interchangeably herein, and are meant to denote any potato based, dehydrated product.) Examples of other thermally processed food ingredients include processed oats, par-boiled and dried rice, cooked soy products, corn masa, roasted coffee beans and roasted cacao beans. Alternatively, raw food ingredients can be used in the preparation of the final food product wherein the production of the final food product includes a thermal heating step. One example of raw material processing wherein the final food product results from a thermal heating step is the manufacture of potato chips from raw potato slices by the step of frying at a temperature of from about 100°C to about 205°C or the production of french fries fried at similar temperatures.

Effect of Amino Acids on Acrylamide Formation

In accordance with the present invention, however, a significant formation of acrylamide has been found to occur when the amino acid asparagine is heated in the presence of a reducing sugar. Heating other amino acids such as lysine and alanine in the presence of a reducing sugar such as glucose does not lead to the formation of acrylamide. But, surprisingly, the addition of other amino acids to the asparagine-sugar mixture can increase or decrease the amount of acrylamide formed.

Having established the rapid formation of acrylamide when asparagine is heated in the presence of a reducing sugar, a reduction of acrylamide in thermally processed foods can be achieved by inactivating the asparagine. By "inactivating" is meant removing asparagine from the food or rendering asparagine non-reactive along the acrylamide formation route by means of conversion or binding to another chemical that interferes with the formation of acrylamide from asparagine.

I. Effect of Cysteine, Lysine, Glutamine and Glycine on Acrylamide Formation

Since asparagine reacts with glucose to form acrylamide, increasing the concentration of other free amino acids may affect the reaction between asparagine with glucose and reduce acrylamide formation. For this experiment, a solution of asparagine (0.176 %) and glucose (0.4%) was prepared in pH 7.0 sodium phosphate buffer. Four other amino acids, glycine (GLY), lysine (LYS), glutamine (GLN), and cysteine (CYS) were added at the same concentration as glucose on a molar basis. The experimental design was full factorial without replication so all possible combinations of added amino acids were tested. The solutions were heated at 120°C for 40 minutes before measuring acrylamide. Table 1 below shows the concentrations and the results.

	Glucose	ASN	GLY	LYS	GLN	CYS	Acrylamide
Order	%	%	%	%	%	%	ppb
1	0.4	0.176	0	0	0	0	1679
2	0.4	0.176	0	0	0	0.269	4
3	0.4	0.176	0	0	0.324	0	5378
4	0.4	0.176	0	0	0.324	0.269	7
5	0.4	0.176	0	0.325	0	0	170
6	0.4	0.176	0	0.325	0	0.269	7
7	0.4	0.176	0	0.325	0.324	0	1517
8	0.4	0.176	0	0.325	0.324	0.269	7
9	0.4	0.176	0.167	0	0	0	213
10	0.4	0.176	0.167	0	0	0.269	6
11	0.4	0.176	0.167	0	0.324	0	2033
12	0.4	0.176	0.167	0	0.324	0.269	4
13	0.4	0.176	0.167	0.325	0	0	161
14	0.4	0.176	0.167	0.325	0	0.269	4
15	0.4	0.176	0.167	0.325	0.324	0	127
16	0.4	0.176	0.167	0.325	0.324	0.269	26

Table 1: Effect of Cysteine, Lysine, Glutamine and Glycine on Acrylamide Formation

As shown in the table above, glucose and asparagine without any other amino acid formed 1679 ppb acrylamide. The added amino acids had three types of effects.

5 1) Cysteine almost eliminated acrylamide formation. All treatments with cysteine had less than 25 ppb acrylamide (a 98% reduction).

2) Lysine and glycine reduced acrylamide formation but not as much as cysteine. All treatments with lysine and/or glycine but without glutamine and cysteine had less than 220 ppb acrylamide (a 85% reduction).

10 3) Surprisingly, glutamine increased acrylamide formation to 5378 ppb (200% increase). Glutamine plus cysteine did not form acrylamide. Addition of glycine and lysine to glutamine reduced acrylamide formation.

These tests demonstrate the effectiveness of cysteine, lysine, and glycine in reducing acrylamide formation. However, the glutamine results demonstrate that not all amino acids
15 are effective at reducing acrylamide formation. The combination of cysteine, lysine, or glycine with an amino acid that alone can accelerate the formation of acrylamide (such as

glutamine) can likewise reduce the acrylamide formation.

II. Effect of Cysteine, Lysine, Glutamine, and Methionine at Different Concentrations and Temperatures

As reported above, cysteine and lysine reduced acrylamide when added at the same concentration as glucose. A follow up experiment was designed to answer the following questions:

1) How do lower concentrations of cysteine, lysine, glutamine, and methionine effect acrylamide formation?

2) Are the effects of added cysteine and lysine the same when the solution is heated at 120°C and 150°C?

A solution of asparagine (0.176 %) and glucose (0.4%) was prepared in pH 7.0 sodium phosphate buffer. Two concentrations of amino acid (cysteine (CYS), lysine (LYS), glutamine (GLN), or methionine (MET)) were added. The two concentrations were 0.2 and 1.0 moles of amino acid per mole of glucose. In half of the tests, two ml of the solutions were heated at 120°C for 40 minutes; in the other half, two ml were heated at 150°C for 15 minutes. After heating, acrylamide was measured by GC-MS, with the results shown in Table 2. The control was asparagine and glucose solution without an added amino acid.

Amino acid/ Temperature	Acrylamide level				
	Control	Amino Acid @ Conc. 0.2	Percentage Of Control	Amino Acid @ Conc. 1.0	Percentage Of Control
LYS-120°C	1332 ppb	1109 ppb	83%	280 ppb	21%
CYS-120°C	1332 ppb	316 ppb	24%	34 ppb	3%
LYS-150°C	3127 ppb	1683 ppb	54%	536 ppb	17%
CYS-150°C	3127 ppb	1146 ppb	37%	351 ppb	11%
GLN-120°C	1953 ppb	4126 ppb	211%	6795 ppb	348%
MET-120°C	1953 ppb	1978 ppb	101%	1132 ppb	58%
GLN-150°C	3866 ppb	7223 ppb	187%	9516 ppb	246%
MET-150°C	3866 ppb	3885 ppb	100%	3024 ppb	78%

Table 2: Effect of Temperature and Concentration of Amino Acids on Acrylamide Level

In the tests with cysteine and lysine, a control formed 1332 ppb of acrylamide after 40 minutes at 120°C, and 3127 ppb of acrylamide after 15 minutes at 150°C. Cysteine and

lysine reduced acrylamide formation at 120°C and 150°C, with the acrylamide reduction being roughly proportional to the concentration of added cysteine or lysine.

In the tests with glutamine and methionine, a control formed 1953 ppb of acrylamide after 40 minutes at 120°C and a control formed 3866 ppb of acrylamide after 15 minutes at 150°C. Glutamine increased acrylamide formation at 120°C and 150°C. Methionine at 0.2 mole/mole of glucose did not affect acrylamide formation. Methionine at 1.0 mole/mole of glucose reduced acrylamide formation by less than fifty percent.

III. Effect of Nineteen Amino Acids on Acrylamide Formation in Glucose and Asparagine Solution

The effect of four amino acids (lysine, cysteine, methionine, and glutamine) on acrylamide formation was described above. Fifteen additional amino acids were tested. A solution of asparagine (0.176 %) and glucose (0.4%) was prepared in pH 7.0 sodium phosphate buffer. The fifteen amino acids were added at the same concentration as glucose on a molar basis. The control contained asparagine and glucose solution without any other amino acid. The solutions were heated at 120°C for 40 minutes before measuring acrylamide by GC-MS. The results are given in Table 3 below.

Amino Acid	Acrylamide Formed	
	ppb	% of Control
Control	959	100
Histidine	215	22
Alanine	478	50
Methionine	517	54
Glutamic Acid	517	54
Aspartic Acid	529	55
Proline	647	67
Phenylalanine	648	68
Valine	691	72
Arginine	752	78
Tryptophan	1059	111
Threonine	1064	111
Tyrosine	1091	114
Leucine	1256	131
Serine	1296	135
Isoleucine	1441	150

Table 3: Effect of Other Amino Acids on Acrylamide Formation

As seen in the table above, none of the fifteen additional amino acids were as effective as cysteine, lysine, or glycine in reducing acrylamide formation. Nine of the additional amino acids reduced acrylamide to a level between 22-78% of control, while six amino acids increased acrylamide to a level between 111-150 % of control.

- 5 Table 4 below summarizes the results for all amino acids, listing the amino acids in the order of their effectiveness. Cysteine, lysine, and glycine were effective inhibitors, with the amount of acrylamide formed less than 15% of that formed in the control. The next nine amino acids were less effective inhibitors, having a total acrylamide formation between 22-78% of that formed in the control. The next seven amino acids increased acrylamide.
- 10 Glutamine caused the largest increase of acrylamide, showing 320% of control.

Amino Acid	Acrylamide produced as % of Control
Control	100 %
Cysteine	0 %
Lysine	10 %
Glycine	13 %
Histidine	22 %
Alanine	50 %
Methionine	54 %
Glutamic Acid	54 %
Aspartic Acid	55 %
Proline	67 %
Phenylalanine	68 %
Valine	72 %
Arginine	78 %
Tryptophan	111 %
Threonine	111 %
Tyrosine	114 %
Leucine	131 %
Serine	135 %
Isoleucine	150 %
Glutamine	320 %

Table 4: Acrylamide Formation in the Presence of 19 Amino Acids

IV. Potato Flakes with 750 ppm of Added L-Cysteine

Test potato flakes were manufactured with 750 ppm (parts per million) of added L-cysteine. The control potato flakes did not contain added L-cysteine. Three grams of potato flakes were weighed into a glass vial. After tightly capping, the vials were heated for 15 minutes or 40 minutes at 120°C. Acrylamide was measured by GC-MS in parts per billion (ppb).

Potato Flakes	Acrylamide (ppb) 15 Min at 120°C	Acrylamide Reduction 15 Min	Acrylamide (ppb) 40 Min at 120°C	Acrylamide Reduction 40 Min
Control	1662	--	9465	--
750 ppm Cysteine	653	60%	7529	20%

Table 5: Reduction of Acrylamide over Time with Cysteine

V. Baked Fabricated Potato Chips

Given the above results, preferred embodiments of the invention have been developed in which cysteine or lysine was added to the formula for a fabricated snack food, in this case baked, fabricated potato chips. The process for making this product is shown in Figure 3A. In a dough preparation step 30, potato flakes, water, and other ingredients are combined to form a dough. (The terms “potato flakes” and “potato flour” are used interchangeably herein and either are intended to encompass all dried flake or powder preparations, regardless of particle size.) In a sheeting step 31, the dough is run through a sheeter, which flattens the dough, and is then cut into discrete pieces. In a cooking step 32, the cut pieces are baked until they reach a specified color and water content. The resulting chips are then seasoned in a seasoning step 33 and placed in packages in a packaging step 34.

A first embodiment of the invention is demonstrated by use of the process described above. To illustrate this embodiment, a comparison is made between a control and test batches to which were added either one of three concentrations of cysteine or one concentration of lysine.

Ingredient		Control	Cysteine #1	Cysteine #2	Cysteine #3	Lysine
Potato flakes & modified starch (g)		5496	5496	5496	5496	5496
Sugar (g)		300	300	300	300	300
Oil (g)		90	90	90	90	90
Leavening agents (g)		54	54	54	54	54
Emulsifier (g)		60	60	60	60	60
L-Cysteine (dissolved in water) ¹ (g)		0	1.8	4.2	8.4	0
L-Lysine monohydrochloride (g)		0	0	0	0	42
Total Dry (g)		6000	6001.8	6004.2	6008.4	6042
Water (ml)		3947	3947	3947	3947	3947
Measurements after Cooking Chips						
H ₂ O, %		2.21	1.73 %	2.28 %	2.57 %	2.68 %
Oil, %		1.99	2.15 %	2.05 %	2.12 %	1.94 %
Acrylamide (ppb)		1030	620	166	104	456
Color	L	72.34	76.53	79.02	78.36	73.2
	A	1.99	-1.14	-2.02	-2.14	1.94
	B	20.31	25.52	23.2	23.0	25.77

Table 6: Effect of Lysine and Various Levels of Cysteine on Acrylamide Level

In all batches, the dry ingredients were first mixed together, then oil was added to each dry blend and mixed. The cysteine or lysine was dissolved in the water prior to adding to the dough. The moisture level of the dough prior to sheeting was 40% to 45% by weight. The dough was sheeted to produce a thickness of between 0.020 and 0.030 inches, cut into chip-sized pieces, and baked.

After cooking, testing was performed for moisture, oil, and color according to the Hunter L-A-B scale. Samples were tested to obtain acrylamide levels in the finished product.

Table 6 above shows the results of these analyses.

In the control chips, the acrylamide level after final cooking was 1030 ppb. Both the addition of cysteine, at all the levels tested, and lysine reduced the final acrylamide level significantly. Figure 4 shows the resulting acrylamide levels in graphical form. In this drawing, the level of acrylamide detected in each sample is shown by a shaded bar 402. Each bar has a label listing the appropriate test immediately below and is calibrated to the scale for

¹ It is expected that the D- isomer or a racemic mixture of both the D- and L- isomers of the amino acids would be equally effective, although the L- isomer is likely to be the best and least expensive source.

acrylamide on the left of the drawing. Also shown for each test is the moisture level of the chip produced, seen as a single point 404. The values for points 404 are calibrated to the scale for percentage of moisture shown on the right of the drawing. Line 406 connects the individual points 404 for greater visibility. Because of the marked effect of lower moisture on the level of acrylamide, it is important to have a moisture level in order to properly evaluate the activity of any acrylamide-reducing agents. As used herein, an acrylamide-reducing agent is an additive that reduces acrylamide content.

Adding cysteine or lysine to the dough significantly lowers the level of acrylamide present in the finished product. The cysteine samples show that the level of acrylamide is lowered in roughly a direct proportion to the amount of cysteine added. Consideration must be made, however, for the collateral effects on the characteristics (such as color, taste, and texture) of the final product from the addition of an amino acid to the manufacturing process.

Additional tests were also run, using added cysteine, lysine, and combinations of each of the two amino acids with CaCl_2 . These tests used the same procedure as described in the tests above, but used potato flakes having varying levels of reducing sugars and varying amounts of amino acids and CaCl_2 added. In Table 7 below, lot 1 of potato flakes had 0.81% reducing sugars (this portion of the table reproduces the results from the test shown above), lot 2 had 1.0% and lot 3 had 1.8% reducing sugars.

Reducing Sugar %	CaCl2 Wt % of total dry	Cysteine ppm of total dry	Lysine % of total dry	Finish H2O wt %	Finish color value	Acrylamide ppb
0.81	0	0	0	2.21	72.34	1030
0.81	0	300	0	1.73	76.53	620
0.81	0	700	0	2.28	79.02	166
0.81	0	1398	0	2.57	78.36	104
0.81	0	0	0.685	2.68	73.20	456
1.0	0	0	0	1.71	72.68	599
1.0	0	0	0	1.63	74.44	1880
1.0	0	0	0	1.69	71.26	1640
1.0	0	0	0	1.99	71.37	1020
1.0	0	700	0	2.05	75.81	317
1.0	0.646	0	0.685	1.74	73.99	179
1.8	0	0	0	1.80	73.35	464
1.8	0	0	0	1.61	72.12	1060
1.8	0	700	0	1.99	75.27	290
1.8	0	1398	0	1.96	75.87	188
1.8	0	0	0.685	1.90	76.17	105
1.8	0.646	0	0.685	2.14	75.87	47
1.8	0.646	700	0	1.83	77.23	148

Table 7: Effect of Varying Concentration of Cysteine, Lysine, Reducing Sugars

As shown by the data in this table, the addition of either cysteine or lysine provides significant improvement in the level of acrylamide at each level of reducing sugars tested. The combination of lysine with calcium chloride provided an almost total elimination of acrylamide produced, despite the fact that this test was run with the highest level of reducing sugars.

VI. Tests in Sliced, Fried Potato Chips

A similar result can be achieved with potato chips made from potato slices. However, the desired amino acid cannot be simply mixed with the potato slices, as with the embodiments illustrated above, since this would destroy the integrity of the slices. In one embodiment, the potato slices are immersed in an aqueous solution containing the desired amino acid additive for a period of time sufficient to allow the amino acid to migrate into the

cellular structure of the potato slices. This can be done, for example, during the washing step 23 illustrated in Figure 2.

Table 8 below shows the result of adding one weight percent of cysteine to the wash treatment that was described in step 23 of Figure 2 above. All washes were at room temperature for the time indicated; the control treatments had nothing added to the water. The chips were fried in cottonseed oil at 178°C for the indicated time.

	Fry Time (seconds)	Finished H ₂ O wt %	Finished oil wt %	Finished Acrylamide
Control - 2-3 min wash	140	1.32 %	42.75 %	323 ppb
1 % cysteine - 15 min wash	140	.86 %	45.02 %	239 ppb
Control - 2-3 min wash	110	1.72 %	40.87 %	278 ppb
Control - 15 min wash	110	1.68 %	41.02 %	231 ppb
1% Cysteine - 15 min wash	110	1.41 %	44.02 %	67 ppb

Table 8: Effect of Cysteine in Wash Water of Potato Slices on Acrylamide

As shown in this table, immersing potato slices of .053 inch thickness for 15 minutes in an aqueous solution containing a concentration of one weight percent of cysteine is sufficient to reduce the acrylamide level of the final product on the order of 100-200 ppb.

The invention has also been demonstrated by adding cysteine to the corn dough (or masa) for tortilla chips. Dissolved L-cysteine was added to cooked corn during the milling process so that cysteine was uniformly distributed in the masa produced during milling. The addition of 600 ppm of L-cysteine reduced acrylamide from 190 ppb in the control product to 75 ppb in the L-cysteine treated product.

Any number of amino acids can be used with the invention disclosed herein, as long as adjustments are made for the collateral effects of the additional ingredient(s), such as changes to the color, taste, and texture of the food. Although all examples shown utilize α -amino acids (where the -NH₂ group is attached to the alpha carbon atom), the applicants anticipate that other isomers, such as β - or γ -amino acids can also be used, although β - and γ -amino acids are not commonly used as food additives. The preferred embodiment of this

00077

invention uses cysteine, lysine, and/or glycine. However, other amino acids, such as histidine, alanine, methionine, glutamic acid, aspartic acid, proline, phenylalanine, valine, and arginine may also be used. Such amino acids, and in particular cysteine, lysine, and glycine, are relatively inexpensive and commonly used as food additives. These preferred amino acids
5 can be used alone or in combination in order to reduce the amount of acrylamide in the final food product. Further, the amino acid can be added to a food product prior to heating by way of either adding the commercially available amino acid to the starting material of the food product or adding another food ingredient that contains a high concentration level of the free amino acid. For example, casein contains free lysine and gelatin contains free glycine. Thus,
10 when Applicants indicate that an amino acid is added to a food formulation, it will be understood that the amino acid may be added as a commercially available amino acid or as a food having a concentration of the free amino acid(s) that is greater than the naturally occurring level of asparagine in the food.

The amount of amino acid that should be added to the food in order to reduce the
15 acrylamide levels to an acceptable level can be expressed in several ways. In order to be commercially acceptable, the amount of amino acid added should be enough to reduce the final level of acrylamide production by at least twenty percent (20%) as compared to a product that is not so treated. More preferably, the level of acrylamide production should be reduced by an amount in the range of thirty-five to ninety-five percent (35-95%). Even more
20 preferably, the level of acrylamide production should be reduced by an amount in the range of fifty to ninety-five percent (50-95%). In a preferred embodiment using cysteine, it has been determined that the addition of at least 100 ppm can be effective in reducing acrylamide. However, a preferred range of cysteine addition is between 100 ppm and 10,000 ppm, with the most preferred range in the amount of about 1,000 ppm. In preferred embodiments using
25 other effective amino acids, such as lysine and glycine, a mole ratio of the added amino acid to the reducing sugar present in the product of at least 0.1 mole of amino acid to one mole of

reducing sugars (0.1:1) has been found to be effective in reducing acrylamide formation. More preferably the molar ratio of added amino acid to reducing sugars should be between 0.1:1 and 2:1, with a most preferable ratio of about 1:1.

The mechanisms by which the select amino acids reduce the amount of acrylamide found are not presently known. Possible mechanisms include competition for reactant and dilution of the precursor, which will create less acrylamide, and a reaction mechanism with acrylamide to break it down." Possible mechanisms include (1) inhibition of Maillard reaction, (2) consumption of glucose and other reducing sugars, and (3) reaction with acrylamide. Cysteine, with a free thiol group, acts as an inhibitor of the Maillard reaction.

Since acrylamide is believed to be formed from asparagine by the Maillard reaction, cysteine should reduce the rate of the Maillard reaction and acrylamide formation. Lysine and glycine react rapidly with glucose and other reducing sugars. If glucose is consumed by lysine and glycine, there will be less glucose to react with asparagine to form acrylamide. The amino group of amino acids can react with the double bond of acrylamide, a Michael addition. The free thiol of cysteine can also react with the double bond of acrylamide.

It should be understood that adverse changes in the characteristics of the final product, such as changes in color, taste, and texture, could be caused by the addition of an amino acid. These changes in the characteristics of the product in accordance with this invention can be compensated by various other means. For example, color characteristics in potato chips can be adjusted by controlling the amount of sugars in the starting product. Some flavor characteristics can be changed by the addition of various flavoring agents to the end product. The physical texture of the product can be adjusted by, for example, the addition of leavening agents or various emulsifiers.

Effect of Di- and Trivalent Cations on Acrylamide Formation

Another embodiment of the invention involves reducing the production of acrylamide by the addition of a divalent or trivalent cation to a formula for a snack food prior to the

cooking or thermal processing of that snack food. Chemists will understand that cations do not exist in isolation, but are found in the presence of an anion having the same valence.

Although reference is made herein to the salt containing the divalent or trivalent cation, it is the cation present in the salt that is believed to provide a reduction in acrylamide formation
5 by reducing the solubility of asparagine in water. These cations are also referred to herein as a cation with a valence of at least two. Interestingly, cations of a single valence are not effective in use with the present invention. In choosing an appropriate compound containing the cation having a valence of at least two in combination with an anion, the relevant factors are water solubility, food safety, and least alteration to the characteristics of the particular
10 food. Combinations of various salts can be used, even though they are discussed herein only as individuals salts.

Chemists speak of the valence of an atom as a measure of its ability to combine with other elements. Specifically, a divalent atom has the ability to form two ionic bonds with other atoms, while a trivalent atom can form three ionic bonds with other atoms. A cation is a
15 positively charged ion, that is, an atom that has lost one or more electrons, giving it a positive charge. A divalent or trivalent cation, then, is a positively charged ion that has availability for two or three ionic bonds, respectively.

Simple model systems can be used to test the effects of divalent or trivalent cations on acrylamide formation. Heating asparagine and glucose in 1:1 mole proportions can generate
20 acrylamide. Quantitative comparisons of acrylamide content with and without an added salt measures the ability of the salt to promote or inhibit acrylamide formation. Two sample preparation and heating methods were used. One method involved mixing the dry components, adding an equal amount of water, and heating in a loosely capped vial. Reagents concentrated during heating as most of the water escaped, duplicating cooking
25 conditions. Thick syrups or tars can be produced, complicating recovery of acrylamide. These tests are shown in Examples 1 and 2 below.

11/11

A second method using pressure vessels allowed more controlled experiments. Solutions of the test components were combined and heated under pressure. The test components can be added at the concentrations found in foods, and buffers can duplicate the pH of common foods. In these tests, no water escapes, simplifying recovery of acrylamide, as shown in Example 3 below.

I. Divalent, Trivalent Cations Decrease Acrylamide, Monovalent Don't

A 20 mL (milliliter) glass vial containing L-asparagine monohydrate (0.15 g, 1 mmole), glucose (0.2 g, 1 mmole) and water (0.4 mL) was covered with aluminum foil and heated in a gas chromatography (GC) oven programmed to heat from 40° to 220°C at 20°/minute, hold two minutes at 220°C, and cool from 220° to 40°C at 20°/min. The residue was extracted with water and analyzed for acrylamide using gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). Analysis found approximately 10,000 ppb (parts/billion) acrylamide. Two additional vials containing L-asparagine monohydrate (0.13 g, 1 mmole), glucose (0.2 g, 1 mmole), anhydrous calcium chloride (0.1 g, 1 mmole) and water (0.4 mL) were heated and analyzed. Analysis found 7 and 30 ppb acrylamide, a greater than ninety-nine percent reduction.

Given the surprising result that calcium salts strongly reduced acrylamide formation, further screening of salts was performed and identified divalent and trivalent cations (magnesium, aluminum) as producing a similar effect. It is noted that similar experiments with monovalent cations, i.e. 0.1/0.2 g sodium bicarbonate and ammonium carbonate (as ammonium carbamate and ammonium bicarbonate) increased acrylamide formation, as seen in Table 9 below.

Salt	Micro Mole Salt	Micromole Acrylamide after heating, ppb
None (control)	0	9857
Sodium bicarbonate	1200	13419
Ammonium carbonate	1250	22027
Ammonium carbonate	2500	47897

Table 9

II. Calcium Chloride and Magnesium Chloride

In a second experiment, a similar test to that described above was performed, but instead of using anhydrous calcium chloride, two different dilutions of each of calcium chloride and magnesium chloride were used. Vials containing L-asparagine monohydrate (0.15 g, 1 mmole) and glucose (0.2 g, 1 mmole) were mixed with one of the following:

- 0.5 mL water (control),
- 0.5 mL 10% calcium chloride solution (0.5 mmole),
- 0.05 mL 10% calcium chloride solution (0.05 mmole) plus 0.45 mL water,
- 0.5 mL 10% magnesium chloride solution (0.5 mmole), or
- 0.05 mL 10% magnesium chloride solution (0.05 mmole) plus 0.45 mL water.

Duplicate samples were heated and analyzed as described in Example 1. Results were averaged and summarized in Table 10 below:

Salt ID	Amt added Micromoles	Acrylamide formed Micromoles	Acrylamide reduction
None (control)	0	408	0
Calcium chloride	450	293	27%
Calcium chloride	45	864	None
Magnesium chloride	495	191	53%
Magnesium chloride	50	2225	None

Table 10: Effect of Calcium Chloride, Magnesium Chloride on Acrylamide

III. pH and Buffering Effects

As mentioned above, this test did not involve the loss of water from the container, but was done under pressure. Vials containing 2 mL of buffered stock solution (15 mM asparagine, 15 mM glucose, 500 mM phosphate or acetate) and 0.1 mL salt solution (1000 mM) were heated in a Parr bomb placed in a gas chromatography oven programmed to heat from 40 to 150°C at 20°/minute and hold at 150°C for 2 minutes. The bomb was removed from the oven and cooled for 10 minutes. The contents were extracted with water and analyzed for acrylamide following the GC-MS method. For each combination of pH and

buffer, a control was run without an added salt, as well as with the three different salts.

Results of duplicate tests were averaged and summarized in Table 11 below:

Salt with Divalent or Trivalent Cation	pH	Buffer Used	Mcg Acrylamide		Acrylamide Reduction
			Salt added	Control	
Calcium chloride	5.5	Acetate	337	550	19%
Calcium chloride	7.0	Acetate	990	1205	18%
Calcium chloride	5.5	Phosphate	154	300	49%
Calcium chloride	7.0	Phosphate	762	855	11%
Magnesium chloride	5.5	Acetate	380	550	16%
Magnesium chloride	7.0	Acetate	830	1205	31%
Magnesium chloride	5.5	Phosphate	198	300	34%
Magnesium chloride	7.0	Phosphate	773	855	10%
Potassium aluminum sulfate	5.5	Acetate	205	550	31%
Potassium aluminum sulfate	7.0	Acetate	453	1205	62%
Potassium aluminum sulfate	5.5	Phosphate	64	300	79%
Potassium aluminum sulfate	7.0	Phosphate	787	855	8%

Table 11: Effect of pH and Buffer on Divalent/Trivalent Cations Reduction of Acrylamide

Across the three salts used, the greatest reductions occurred in pH 7 acetate and pH 5.5 phosphate. Only small reductions were found in pH 5.5 acetate and pH 7 phosphate.

IV. Raising Calcium Chloride Lowers Acrylamide

Following the model systems results, a small-scale laboratory test was run in which calcium chloride was added to potato flakes before heating. Three ml of a 0.4%, 2%, or 10% calcium chloride solution was added to 3 g of potato flakes. The control was 3 g of potato flakes mixed with 3 ml of de-ionized water. The flakes were mixed to form a relatively uniform paste and then heated in a sealed glass vial at 120° C for 40 min. Acrylamide after heating was measured by GC-MS. Before heating, the control potato flakes contained 46 ppb of acrylamide. Test results are reflected in Table 4 below.

800/11

Mixture ID	Acrylamide, ppb	Acrylamide Reduction
Control (water)	2604	None
CaCl ₂ 0.4% solution	1877	28%
CaCl ₂ 2% solution	338	76%
CaCl ₂ 10% solution	86	97%

Table 12:Effect of Calcium Chloride Solution Strength on Acrylamide Reduction

Given the results from above, tests were conducted in which a calcium salt was added to the formula for a fabricated snack food, in this case baked fabricated potato chips. The process for making baked fabricated potato chips consists of the steps shown in Figure 3B. The dough preparation step 35 combines potato flakes with water, the cation/anion pair (which in this case is calcium chloride) and other minor ingredients, which are thoroughly mixed to form a dough. (Again, the term “potato flakes” is intended herein to encompass all dried potato flake, granule, or powder preparations, regardless of particle size.) In the sheeting/cutting step 36, the dough is run through a sheeter, which flattens the dough, and then is cut into individual pieces. In the cooking step 37, the formed pieces are cooked to a specified color and water content. The resultant chips are then seasoned in seasoning step 38 and packaged in packaging step 39.

In a first test, two batches of fabricated potato chips were prepared and cooked according to the recipe given in Table 13; with the only difference between the batches was that the test batch contained calcium chloride. In both batches, the dry ingredients were first mixed together, then oil was added to each dry blend and mixed. The calcium chloride was dissolved in the water prior to adding to the dough. The moisture level of the dough prior to sheeting was 40% to 45% by weight. The dough was sheeted to produce a thickness of between 0.020 and 0.030 inches, cut into chip-sized pieces, and baked.

After cooking, testing was performed for moisture, oil, and color according to the Hunter L-a-b scale. Samples were tested to obtain acrylamide levels in the finished product.

Table 13 below also shows the results of these analyses.

Ingredient	Control	CaCl ₂ Test
Potato flakes and modified starch (g)	5496	5496
Sugar (g)	300	300
Oil (g)	90	90
Leavening agents (g)	54	54
Emulsifier (g)	60	60
Calcium Chloride (dissolved in water) (g)	0	39
Total Dry Mix (g)	6000	6039
Water (ml)	3947	3947
Tests Performed after Chips Cooked		
H ₂ O, %	2.21	2.58
Oil, %	1.99	2.08
Acrylamide, ppb	1030	160
L	72.34	76.67
A	1.99	-.67
B	20.31	24.21

Table 13: Effect of CaCl₂ on Acrylamide in Chips

As these results show, the addition of calcium chloride to the dough in a ratio by weight of calcium chloride to potato flakes of roughly 1 to 125 significantly lowers the level of acrylamide present in the finished product, lowering the final acrylamide levels from 1030 ppb to 160 ppb. Additionally, the percentages of oil and water in the final product do not appear to have been affected by the addition of calcium chloride. It is noted, however, that CaCl₂ can cause changes in the taste, texture, and color of the product, depending on the amount used.

The level of divalent or trivalent cation that is added to a food for the reduction of acrylamide can be expressed in a number of ways. In order to be commercially acceptable, the amount of cation added should be enough to reduce the final level of acrylamide production by at least twenty percent (20%). More preferably, the level of acrylamide production should be reduced by an amount in the range of thirty-five to ninety-five percent (35-95%). Even more preferably, the level of acrylamide production should be reduced by an amount in the range of fifty to ninety-five percent (50-95%). To express this in a different manner, the amount of divalent or trivalent cation to be added can be given as a ratio between

000000

the moles of cation to the moles of free asparagine present in the food product. The ratio of the moles of divalent or trivalent cation to moles of free asparagine should be at least one to five (1:5). More preferably, the ratio is at least one to three (1:3), and more preferably still, one to two (1:2). In the presently preferred embodiment, the ratio of moles of cations to moles of asparagine is between about 1:2 and 1:1. In the case of magnesium, which has less effect on the product taste than calcium, the molar ratio of cation to asparagine can be as high as about two to one (2:1).

Additional tests were run, using the same procedure as described above, but with different lots of potato flakes containing different levels of reducing sugars and varying amounts of calcium chloride added. In Table 14 below, the chips having 0.8 % reducing sugars reproduce the test shown above.

CaCl ₂ (g)	Reducing Sugar %	Moisture %	Color L Value	Acrylamide ppb
0	0.8	2.21	72.34	1030
39	0.8	2.58	76.67	160
0	1.0	1.80	73.35	464
0	1.0	1.61	72.12	1060
17.5	1.0	1.82	74.63	350
39	1.0	2.05	76.95	80
39	1.0	1.98	75.86	192
0	1.8	1.99	71.37	1020
0	1.8	1.71	72.68	599
0	1.8	1.69	71.26	1640
0	1.8	1.63	74.44	1880
39	1.8	1.89	76.59	148
39	1.8	1.82	75.14	275

Table 14: Effect of CaCl₂ Across Varying Levels of Reducing Sugars & Cation Levels

As seen in this table, the addition of CaCl₂ consistently reduces the level of acrylamide in the final product, even when the weight ratio of added CaCl₂ to potato flakes is lower than 1:250.

Any number of salts that form a divalent or trivalent cation (or said another way,

produce a cation with a valence of at least two) can be used with the invention disclosed herein, as long as adjustments are made for the collateral effects of this additional ingredient. The effect of lowering the acrylamide level appears to derive from the divalent or trivalent cation, rather than from the anion that is paired with it. Limitations to the cation/anion pair, other than valence, are related to their acceptability in foods, such as safety, solubility, and their effect on taste, odor, appearance, and texture. For example, the cation's effectiveness can be directly related to its solubility. Highly soluble salts, such as those salts comprising acetate or chloride anions, are most preferred additives. Less soluble salts, such as those salts comprising carbonate or hydroxide anions can be made more soluble by addition of phosphoric or citric acids or by disrupting the cellular structure of the starch based food. Suggested cations include calcium, magnesium, aluminum, iron, copper, and zinc. Suitable salts of these cations include calcium chloride, calcium citrate, calcium lactate, calcium malate, calcium gluconate, calcium phosphate, calcium acetate, calcium sodium EDTA, calcium glycerophosphate, calcium hydroxide, calcium lactobionate, calcium oxide, calcium propionate, calcium carbonate, calcium stearoyl lactate, magnesium chloride, magnesium citrate, magnesium lactate, magnesium malate, magnesium gluconate, magnesium phosphate, magnesium hydroxide, magnesium carbonate, magnesium sulfate, aluminum chloride hexahydrate, aluminum chloride, aluminum hydroxide, ammonium alum, potassium alum, sodium alum, aluminum sulfate, ferric chloride, ferrous gluconate, ferric ammonium citrate, ferric pyrophosphate, ferrous fumarate, ferrous lactate, ferrous sulfate, cupric chloride, cupric gluconate, cupric sulfate, zinc gluconate, zinc oxide, and zinc sulfate. The presently preferred embodiment of this invention uses calcium chloride, although it is believed that the requirements may be best met by a combination of salts of one or more of the appropriate cations. A number of the salts, such as calcium salts, and in particular calcium chloride, are relatively inexpensive and commonly used as food. Calcium chloride can be used in combination with calcium citrate, thereby reducing the collateral taste effects of CaCl_2 .

Further, any number of calcium salts can be used in combination with one or more magnesium salts. One skilled in the art will understand that the specific formulation of salts required can be adjusted depending on the food product in question and the desired end-product characteristics.

5 It should be understood that changes in the characteristics of the final product, such as changes in color, taste, and consistency can be adjusted by various means. For example, color characteristics in potato chips can be adjusted by controlling the amount of sugars in the starting product. Some flavor characteristics can be changed by the addition of various flavoring agents to the end product. The physical texture of the product can be adjusted by, 10 for example, the addition of leavening agents or various emulsifiers.

Combinations of Agents in Making Dough

In the above detailed embodiments of the invention, focus was on the reduction of acrylamide caused by a single agent, such as a divalent or trivalent cation or one of several amino acids, to lower the amount of acrylamide found in cooked snacks. Other embodiments 15 of the invention involve the combination of various agents, such as combining calcium chloride with other agents to provide a significant reduction of acrylamide without greatly altering the flavor of the chips.

I. Combinations of Calcium Chloride, Citric Acid, Phosphoric Acid

The inventors have found that calcium ions more effectively reduce acrylamide 20 content at acidic pH. In the test shown below, the addition of calcium chloride in the presence of an acid was studied and compared to a sample with just the acid.

Ingredient		Control	Phosphoric Acid	Phosphoric Acid & CaCl ₂	Citric Acid & CaCl ₂
Potato flakes/modified starch (g)		5490	5490	5490	5490
Sugar		360	360	360	360
Oil		90	90	90	90
Citric Acid					30
Phosphoric Acid			30	30	
CaCl ₂				30	30
Sodium bicarbonate & monocalcium phosphate		54			
Emulsifier (g)		60	60	60	60
Total Dry Mix (g)		6000	6000	6000	6000
Water (ml)		3950	3950	3950	3950
Moisture %		2.16	2.34	2.07	1.60
Color	L	67.69	71.39	72.70	73.27
	A	5.13	3.24	1.62	0.95
	B	26.51	26.91	26.05	26.24
Acrylamide (ppb)		1191	322	84	83

Table 15: Effect of Combining CaCl₂ with Phosphoric Acid or Citric Acid on Acrylamide

As seen in Table 15 above, the addition of phosphoric acid alone reduced the acrylamide formation by 73% while the addition of CaCl₂ and an acid dropped the acrylamide level by 93%. Figure 5 shows these results in graphical form. In this drawing, the acrylamide level 502 of the control is quite high (1191), but drops significantly when phosphoric acid alone is added and even lower when calcium chloride and an acid are added. At the same time, the moisture levels 504 of the various chips stayed in the same range, although it was somewhat lower in the chips with added agents. Thus, it has been demonstrated that calcium chloride and an acid can effectively reduce acrylamide.

Further tests were performed using calcium chloride and phosphoric acid as additives to a potato dough. Three different levels of calcium chloride were used, corresponding to 0%, 0.45% and 0.90% by weight of the potato flakes. These were combined with three different levels of phosphoric acid, corresponding to 0%, 0.05%, or 0.1% of the flakes. Additionally,

600 //

three levels of reducing sugar in the flakes were tested, corresponding to 0.2%, 1.07%, and 2.07%, although not all combinations of these levels are represented. Each test was mixed into dough, shaped, and cooked to form potato chips. The oil fry temperature, fry time, and sheet thickness were maintained constant at 350F, 16 seconds, and 0.64 mm respectively. For clarity, the results are presented in three separate tables (16A, 16B, and 16C) with each table showing the results for one of the levels of sugar in the potato flakes. Additionally, the tests are arranged so that the controls, with no calcium chloride or phosphoric acid, are on the left-hand side. Within the table, each level of calcium chloride (CC) is grouped together, with variations in the phosphoric acid (PA) following.

Cell		Cntrl (16)	No CC ↓PA (5)	↓CC No PA (7)	↓CC ↑PA (4)	↑CC ↓PA (8)
CaCl2 %		---	---	0.45	0.45	0.90
Phosphoric Acid%		---	0.05	---	0.10	0.05
Moisture		2.36	2.36	2.30	2.30	2.42
Oil		22.83	21.77	23.60	22.20	23.75
Color	L	69.42	74.39	75.00	75.07	74.39
	A	2.69	0.10	-0.02	-0.13	0.10
	B	28.00	27.99	27.80	27.64	27.99
Acrylamide		171	131	41	46	40

Table 16A: CaCl₂/Phosphoric Acid Effect on Acrylamide Level – 0.2% Reducing Sugars

In the lowest level of reducing sugars in this test, we can see that the levels of acrylamide produced are normally in the lower range, as would be expected. At this level of sugars, calcium chloride alone dropped the level of acrylamide to less than ¼ of the control, with little additional benefit gained by the addition of phosphoric acid. In the mid-range of reducing sugars, shown in the following table, the combination of calcium chloride reduces the level of acrylamide from 367 ppb in the control to 69 ppb in cell 12. Although some of this reduction may be attributed to the slightly higher moisture content of cell 12 (2.77 vs. 2.66 for the control), further support is shown by the significant reduction in acrylamide even

000 //

when the levels of calcium chloride and phosphoric acid are halved. This is shown in cell 6, which has a significant reduction in acrylamide and moisture content lower than the control.

Cell		Cntrl (15)	No CC ↑PA (3)	↓CC ↓PA (2a)	↓CC ↓PA (2b)	↓CC ↓PA (6)	↓CC ↓PA (13)	↑CC 0 PA (9)	↑CC ↑PA (12)
CaCl ₂		---	---	0.45	0.45	0.45	0.45	0.90	0.90
Phosphoric Acid%		---	0.10	0.05	0.05	0.05	0.05	---	0.10
Moisture		2.66	2.59	3.16	2.74	2.61	2.56	2.81	2.77
Oil		23.72	24.24	25.24	22.58	23.48	25.12	23.99	24.71
Color	L	69.45	67.69	72.23	70.44	70.58	72.06	72.64	73.59
	A	2.73	4.63	0.54	2.32	2.59	2.03	0.84	0.47
	B	28.00	28.54	26.51	27.55	27.79	27.64	27.05	26.82
Acrylamide		367	451	96	170	192	207	39	69

Table 16B: CaCl₂/Phosphoric Acid Effect on Acrylamide Level – 1.07% Reducing Sugars

Cell		No CC ↓PA (11)	↓CC No PA (1a)	↓CC No PA (1b)	↓CC No PA (1c)	↓CC ↑PA (10)	↑CC ↓PA (14)
CaCl ₂ %		---	0.45	0.45	0.45	0.45	0.90
Phosphoric Acid%		0.05	---	---	---	0.10	0.05
Moisture		2.47	2.68	2.60	3.19	2.80	3.18
Oil		24.70	25.07	24.48	22.81	24.19	23.25
Color	L	61.84	62.32	63.86	69.42	69.11	72.61
	A	8.10	5.18	6.70	3.00	3.78	1.28
	B	28.32	26.27	28.00	27.66	27.70	26.78
Acrylamide		667	431	360	112	150	51

5 Table 16C: CaCl₂/Phosphoric Acid Effect on Acrylamide Level – 2.07% Reducing Sugars

As can be seen from these three tables, the levels of calcium chloride and phosphoric acid necessary to reduce the level of acrylamide increases as the level of reducing sugars increases, as would be expected. Figure 6 shows a graph corresponding to the three tables above, with the bars 602 showing acrylamide level and the points 604 demonstrating moisture level. The results are again grouped by the level of reducing sugar available from the potato; within each group there is a general movement downward as first one and then

10

several acrylamide-reducing agents are used to lower the acrylamide level.

Several days later, another test with the same protocol as for the three tables above was conducted using only the potato flakes with 1.07% reducing sugars with the same three levels of calcium chloride and with four levels of phosphoric acid (0, 0.025%, 0.05%, and 0.10%). The results are shown below in Table 17. Figure 7 graphically shows the results for the table, with acrylamide levels expressed as bars 702 and calibrated to the markings on the left-hand side while percentage moisture is expressed as points 704 and calibrated to the markings on the right-hand side of the drawing. As the amount of calcium chloride increases, e.g. moving from left to right across the whole table, the acrylamide decreases. Likewise, for each level of calcium chloride, e.g. moving left to right within one level of calcium chloride, the level of acrylamide also generally decreases.

Cell		Cntrl (1)	No CC ↓PA (4)	No CC ↑PA (7)	↓CC ↓PA (3)	↓CC ↓PA (6)	↑CC ↓PA (8)	↑CC ↓PA (2)	↑CC ↑PA (5)
CaCl ₂		---	---	---	0.45	0.45	0.90	0.90	0.90
Phosphoric Acid%		---	0.050	0.100	0.050	0.050	0.025	0.050	0.100
Moisture		2.68	2.52	2.38	2.29	2.55	2.45	2.78	2.61
Oil		23.74	22.57	22.13	24.33	23.84	22.54	24.11	22.73
Color	L	65.97	64.67	64.55	65.18	66.82	68.36	70.23	68.75
	A	4.75	5.23	5.53	5.06	4.09	3.17	2.19	2.92
	B	27.70	27.83	27.94	27.79	27.64	27.17	26.28	27.06
Acrylamide		454	435	344	188	77	233	80	66

Table 17: CaCl₂ / Phosphoric Acid Effect on Acrylamide Level – 1.07% Reducing Sugars

II. Calcium Chloride/Citric Acid with Cysteine

In some of the previous tests on corn chips performed by the inventors, the amount of calcium chloride and phosphoric acid necessary to bring the level of acrylamide to a desired level produced objectionable flavors. The following test was designed to reveal if the addition to the potato dough of cysteine – which has been shown to lower the levels of acrylamide in the chips – would allow the levels of calcium chloride and acid to be lowered to acceptable

taste levels while keeping the level of acrylamide low. In this test, the three agents were added to the masa (dough) at a ratio of (i.) 0.106% Ca/Cl₂, 0.084% citric acid, and 0.005% L. cysteine in a first experiment; (ii) 0.106% Ca/Cl₂ and 0.084% citric acid, but no cysteine in a second experiment, and 0.053% Ca/Cl₂, 0.042% citric acid with 0.005% L. cysteine as a third experiment. Each experiment was duplicated and run again, with both results shown below. The masa is about 50% moisture, so the concentrations would approximately double if one translates these ratios to solids only. Additionally, in each test, part of the run was flavored with a nacho cheese seasoning at about 10% of the base chip weight. Results of this test are shown in Table 18 below. In this table, for each category of chip, e.g., plain chip, control, the results of the first-run experiment are given in acrylamide #1; the results of the second experiment are given as acrylamide #2, and the average of the two given as acrylamide average. Only one moisture level was taken, in the first experiment; that value is shown.

Cell	Plain chip				Nacho chip			
	Cntrl	↑CC	↑CC	↓CC	Cntrl	↑CC	↑CC	↓CC
		↑Citric 0 Cys	↑Citric Cys	↓Citric Cys		↑Citric 0 Cys	↑Citric Cys	↓Citric Cys
CaCl ₂ (%)		0.106	0.106	0.053		0.106	0.106	0.053
Citric acid (%)		0.084	0.084	0.042		0.084	0.084	0.042
Cysteine (%)			0.005	0.005			0.005	0.005
Acrylamide #1 ppb	163	154	70	171	90	55	62	77
Acrylamide #2 ppb	102	113	74	103	71	53	50	76
Acrylamide average ppb	132.5	133.5	72	137	80.5	54	56	76.5
Moisture %	1.07	0.91	1.07	0.95	1.26	1.49	1.23	1.25

Table 18: Effect of Cysteine with CaCl₂ / Citric Acid on Acrylamide Level in Corn Chips

When combined with 0.106% CaCl₂ and 0.084% citric acid, the addition of cysteine cut the production of acrylamide approximately in half. In the chips flavored with nacho flavoring, the calcium chloride and citric acid alone reduced the production of acrylamide from 80.5 to 54 ppb, although in this set of tests, the addition of cysteine did not appear to

provide a further reduction of acrylamide.

Figure 8 graphically presents the same data as the table above. For each type of chip on which the experiment was run (e.g., plain chip, control), two bars 802 show the acrylamide results. Acrylamide results 802a from the first experiment are shown on the left for each type chip, with the acrylamide results 802b from the second experiment shown on the right. Both acrylamide results are calibrated to the markings on the left of the graph. The single moisture level is shown as a point 804 overlying the acrylamide graph and is calibrated to the markings on the right of the graph.

After the above test was completed, fabricated potato chips were similarly tested, using potato flakes containing two different levels of reducing sugars. To translate the concentrations used in the corn chip test to fabricated potato chips, the sum of the potato flakes, potato starch, emulsifiers and added sugar were considered as the solids. The amounts of CaCl_2 , citric acid, and cysteine were adjusted to yield the same concentration as in the corn chips on a solids basis. In this test, however, when higher levels of calcium chloride and citric acid were used, a higher level of cysteine was also used. Additionally, a comparison was made in the lower reducing sugar portion of the test, to the use of calcium chloride in combination with phosphoric acid, with and without cysteine. The results are shown in Table 19.

We can see from these that in potato flakes with 1.25% of reducing sugars, the combination of calcium chloride, citric acid, and cysteine at the first level above reduced the formation of acrylamide from 1290 ppb to 594 ppb, less than half of the control figure. Using the higher levels of the combination of agents reduced the formation of acrylamide to 306 ppb, less than half of the control amount.

Using the same potato flakes, phosphoric acid and calcium chloride alone reduced the formation of acrylamide from the same 1290 to 366 ppb, while a small amount of cysteine added with the phosphoric acid and calcium chloride reduced the acrylamide still further, to

188 ppb.

Finally, in the potato flakes having 2% reducing sugars, the addition of calcium chloride, citric acid, and cysteine reduced the formation of acrylamide from 1420 to 665 ppb, less than half.

Cell		Medium reducing sugars (1.25%)					High reducing sugars (2%)	
		Cntrl (1B)	↓CC ↓Citric ↓Cyst (2)	↑CC ↑Citric ↑Cyst (3)	CC PhosA 0Cyst (4)	CC PhosA Cyst (4A)	Cntrl (6)	↓CC ↓Citric ↓Cyst (7)
Calcium chloride			10.2	20.4	36	36		10.2
Citric acid			8	16				8
Phosphoric acid					4	4		
Cysteine			0.48	0.96		0.48		0.48
Acrylamide ppb		1290	594	306	366	188	1420	665
Moisture %		1.82	2.06	2.12	2.06	2.33	2.28	2.23
Color	L	56.84	65.47	69.29	66.88	73.09	61.06	63.50
	A	10.20	6.42	4.07	4.42	1.55	9.03	7.93
	B	27.53	28.40	28.17	28.10	27.07	28.07	28.00

Table 19: Effect of Cysteine with CaCl₂ / Acid on Acrylamide Level in Potato Chips

Figure 9 demonstrates graphically the results of this experiment. Results are shown grouped first by the level of reducing sugars, then by the amount of acrylamide-reducing agents added. As in the previous graphs, bars 902 representing the level of acrylamide are calibrated according to the markings on the left-hand side of the graph, while the points 904 representing the moisture level are calibrated according to the markings to the right-hand side of the graph.

The above experiments have shown that the acrylamide-reducing agents do not have to be used separately, but can be combined to provide added benefit. This added benefit can be used to achieve increasingly lower levels of acrylamide in foods or to achieve a low level of acrylamide without producing significant changes to the taste or texture of those foods. Although the specific embodiments shown have disclosed calcium chloride combined with

citric acid or phosphoric acid and these with cysteine, one of ordinary skill in the art would realize that the combinations could use other calcium salts, the salts of other divalent or trivalent cations, other food-grade acids, and any of the other amino acids that have been shown to lower acrylamide in a finished food product. Additionally, although this has been
5 demonstrated in potato chips and corn chips, one of ordinary skill in the art would understand that the same use of combinations of agents can be used in other fabricated food products that are subject to the formation of acrylamide, such as cookies, crackers, etc.

Agents to Reduce Acrylamide Added in the Manufacture of Potato Flakes

The addition of calcium chloride and an acid has been shown to lower acrylamide in
10 fried and baked snack foods formulated with potato flakes. It is believed that the presence of an acid achieves its effect by lowering the pH. It is not known whether the calcium chloride interferes with the loss of the carboxyl group or the subsequent loss of the amine group from free asparagine to form acrylamide. The loss of the amine group appears to require high temperature, which generally occurs toward the end of the snack dehydration. The loss of the
15 carboxyl group is believed to occur at lower temperatures in the presence of water.

Potato flakes can be made either with a series of water and steam cooks (conventional) or with a steam cook only (which leaches less from the exposed surfaces of the potato). The cooked potatoes are then mashed and drum dried. Analysis of flakes has revealed very low acrylamide levels in flakes (less than 100 ppb), although the products made
20 from these flakes can attain much higher levels of acrylamide.

It was theorized that if either lowering dough pH with acid or adding calcium chloride to the dough interferes with the loss of the carboxylic group, then introducing these additives during the flake production process might either (a) reduce the carboxyl loss thus reducing the rate of amine loss during the snack food dehydration or (b) whatever the mechanism,
25 insure that the intervention additive is well distributed in the dough that is dehydrated into the snack food. The former, if it happens, would be a likely bigger effect on acrylamide than the

latter.

Another possible additive to reduce the formation of acrylamide in fabricated food products is asparaginase. Asparaginase is known to decompose asparagine to aspartic acid and ammonia. Although it is not possible to utilize this enzyme in making potato chips from sliced potatoes, the process of making flakes by cooking and mashing potatoes (a food ingredient) breaks down the cell walls and provides an opportunity for asparaginase to work. In a preferred embodiment, the asparaginase is added to the food ingredient in a pure form as food grade asparaginase.

The inventors designed the following sets of experiments to study the effectiveness of various agents added during the production of the potato flakes in reducing the level of acrylamide in products made with the potato flakes.

I. Calcium Chloride and Phosphoric Acid Used in Making Potato Flakes

This series of tests were designed to evaluate the reduction in the level of acrylamide when CaCl_2 and/or phosphoric acid are added during the production of the potato flakes. The tests also address whether these additives had the same effect as when they are added at the later stage of making the dough.

For this test, the potatoes comprised 20% solids and 1% reducing sugar. The potatoes were cooked for 16 minutes and mashed with added ingredients. All batches received 13.7 gm of an emulsifier and 0.4 gm of citric acid. Four of the six batches had phosphoric acid added at one of two levels (0.2% and 0.4% of potato solids) and three of the four batches received CaCl_2 at one of two levels (0.45% and 0.90% of the weight of potato solids). After the potatoes were dried and ground into flakes of a given size, various measurements were performed and each batch was made into dough. The dough used 4629 gm of potato flakes and potato starch, 56 gm of emulsifier, 162 ml of liquid sucrose and 2300 ml of water.

Additionally, of the two batches that did not receive phosphoric acid or CaCl_2 during flake production, both batches received these additives at the given levels as the dough was made.

The dough was rolled to a thickness of 0.64 mm, cut into pieces, and fried at 350°F for 20 seconds. Table 20 below shows the results of the tests for these various batches.

Batch	0 Ca ↓phos (C) in flakes	↓Ca ↓phos (B) in flakes	↓Ca ↓phos (F) in dough	↑Ca ↓phos (A) in flakes	↑Ca ↓phos (D) in dough	↑Ca ↑phos (E) in flakes
Added to flakes						
Wt. (gm) Calcium Chloride	0	24.7	0	49.4	0	49.4
Wt. (gm) Phosphoric Acid	11.0	11.0	0	11.0	0	21.9
Dried Flake Tests						
Moisture (%)	6.3	6.5	4.5	6.8	6.2	7.7
Water Absorption Index (WAI) (%)	8.2	8.3	9.2	8.2	8.1	8.1
On 20 mesh	1.5	1.8	2.0	1.0	1.7	1.6
On 40 mesh	26.6	30.9	32.3	27.2	28.3	24.4
On 60 mesh	35.3	37.1	36.1	38.4	37.5	35.3
On 80 mesh	14.6	13.2	12.0	14.5	14.4	16.0
On 100 mesh	5.7	4.8	4.5	5.4	5.4	6.5
On 200 mesh	11.5	8.8	8.6	10.1	9.3	12.1
Through 200 mesh	4.7	3.3	4.5	3.4	3.3	4.0
Added to dough						
Calcium Chloride dihydrate	0	0	23.7	0	47.4	0
Phosphoric Acid	0	0	14.4	0	7.9	0
Test Results on Chips						
Moisture	1.87	2.04	2.04	2.07	1.97	2.05
Oil	23.53	23.82	25.12	23.76	24.44	24.98
Color – L	54.63	62.58	67.28	66.89	69.48	66.87
Color – A	13.63	9.23	6.99	6.27	5.61	7.21
Color – B	27.32	28.59	29.54	28.85	29.26	29.37
Acrylamide	1286	344	252	129	191	141

Table 20: Effect of CaCl₂ / Phosphoric Acid added to Flakes or Dough on Acrylamide Level

As seen in the results above and in the accompanying graph of Figure 10, the

- 5 acrylamide level was the highest in Test C when only phosphoric acid was added to the flake preparation and was the lowest when calcium chloride and phosphoric acid were used in combination.

II. Asparaginase Used in Making Potato Flakes

Asparaginase is an enzyme that decomposes asparagine to aspartic acid and ammonia.

- 10 Since aspartic acid does not form acrylamide, the inventors reasoned that asparaginase treatment should reduce acrylamide formation when the potato flakes are heated.

6777 //

The following test was performed. Two grams of standard potato flakes was mixed with 35 ml of water in a metal drying pan. The pan was covered and heated at 100°C for 60 minutes. After cooling, 250 units of asparaginase in 5 ml water were added, an amount of asparaginase that is significantly more than the calculated amount necessary. For control, potato flakes and 5 ml of water without enzyme was mixed. The potato flakes with asparaginase were held at room temperature for 1 hour. After enzyme treatment, the potato flake slurry was dried at 60°C overnight. The pans with dried potato flakes were covered and heated at 120°C for 40 minutes. Acrylamide was measured by gas chromatograph, mass spectrometry of brominated derivative. The control flakes contained 11,036 ppb of acrylamide, while the asparaginase-treated flakes contained 117 ppb of acrylamide, a reduction of more than 98%.

Following this first test, investigation was made into whether or not it was necessary to cook the potato flakes and water prior to adding asparaginase for the enzyme to be effective. To test this, the following experiment was performed:

Potato flakes were pretreated in one of four ways. In each of the four groups, 2 grams of potato flakes were mixed with 35 milliliters of water. In the control pre-treatment group (a), the potato flakes and water were mixed to form a paste. In group (b), the potato flakes were homogenized with 25 ml of water in a Bio Homogenizer M 133/1281-0 at high speed and mixed with an additional 10 ml of deionized water. In group (c), the potato flakes and water were mixed, covered, and heated at 60°C for 60 minutes. In group (d), the potato flakes and water were mixed, covered, and heated at 100°C for 60 minutes. For each pre-treatment group (a), (b), (c), and (d), the flakes were divided, with half of the pre-treatment group being treated with asparaginase while the other half served as controls, with no added asparaginase.

A solution of asparaginase was prepared by dissolving 1000 units in 40 milliliters of deionized water. The asparaginase was from Erwinia chrysanthemi, Sigma A-2925 EC

3.5.1.1. Five milliliters of asparaginase solution (5ml) was added to each of the test potato

flake slurries (a), (b), (c), and (d). Five milliliters of deionized water was added to the control potato flake slurry (a). All slurries were left at room temperature for one hour, with all tests being performed in duplicate. The uncovered pans containing the potato flake slurries were left overnight to dry at 60°C. After covering the pans, the potato flakes were heated at 120°C for 40 minutes. Acrylamide was measured by gas chromatography, mass spectroscopy of brominated derivative.

As shown in Table 21 below, asparaginase treatment reduced acrylamide formation by more than 98% for all pretreatments. Neither homogenizing nor heating the potato flakes before adding the enzyme increased the effectiveness of asparaginase. In potato flakes, asparagine is accessible to asparaginase without treatments to further damage cell structure. Notably, the amount of asparaginase used to treat the potato flakes was in large excess. If potato flakes contain 1% asparagine, adding 125 units of asparaginase to 2 grams of potato flakes for 1 hour is approximately a 50-fold excess of enzyme.

Pre-treatment	Acrylamide ppb		Acrylamide as % of Control
	Control – No Asparaginase	Test – Asparaginase	
(a) No pre-treatment	12512	107	0.9
(b) Homogenizing	12216	126	1.0
(c) Heated at 60 C	12879	105	0.8
(d) Heated at 100 C	12696	166	1.3

Table 21: Effect of Pretreatments of Potato Flakes on Effectiveness of Asparaginase

Another set of tests was designed to evaluate whether the addition of asparaginase during the production of potato flakes provides a reduction of acrylamide in the cooked product made from the flakes and whether buffering the mashed potatoes used to make the flakes to a preferred pH for enzyme activity (e.g., pH = 8.6) increases the effectiveness of the asparaginase. The buffering was done with a solution of sodium hydroxide, made with four grams of sodium hydroxide added to one liter of water to form a tenth molar solution.

Two batches of potato flakes were made as controls, one buffered and one un-

buffered. Asparaginase was added to two additional batches of potato flakes; again one was buffered while the other was not. The asparaginase was obtained from Sigma Chemical and was mixed with water in a ratio of 8 to 1 water to enzyme. For the two batches in which asparaginase was added, the mash was held for 40 minutes after adding the enzyme, in a covered container to minimize dehydration and held at approximately 36°C. The mash was then processed on a drum dryer to produce the flakes. The potato flakes were used to make potato dough according to the previously shown protocols, with the results shown in Table 22 below.

Measurement	Unbuffered Control	Unbuffered Asparaginase	Buffered Control	Buffered Asparaginase
Moisture	1.56	1.53	1.68	1.61
Oil	22.74	23.12	21.77	21.13
Color – L	61.24	60.70	57.24	57.35
Color – A	6.57	9.30	5.04	7.52
Color – B	28.95	28.29	27.12	27.41
Acrylamide ppb	768	54	1199	111

Table 22: Effect of Asparaginase and Buffering on Acrylamide Level in Potato Chips

As shown in Table 22, the addition of asparaginase without a buffer reduced the production of acrylamide in the finished chips from 768 to 54 ppb, a reduction of 93%. The use of a buffer did not appear to have the desired effect on the formation of acrylamide; rather the use of the buffered solution allowed a greater amount of acrylamide to form in both the control and the asparaginase experiments. Still, the asparaginase reduced the level of acrylamide from 1199 to 111, a reduction of 91%. Figure 11 shows the results from Table 22 in a graphical manner. As in the previous drawings, bars 1102 represent the level of acrylamide for each experiment, calibrated according to the markings on the left-hand side of the graph, while points 1104 represent the moisture level in the chips a, calibrated according to the markings on the right-hand side of the graph.

Tests were also run on the samples to check for free asparagine to determine if the enzyme was active. The results are shown below in Table 23.

	Control Unbuffered	Asparaginase Unbuffered	Control Buffered	Asparaginase Buffered
Free Asparagine	1.71	0.061	2.55	0.027
Fructose	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Glucose	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Sucrose	0.798	0.828	0.720	0.322

Table 23: Test for Free Asparagine in Enzyme Treated Flakes

In the unbuffered group, the addition of asparaginase reduced the free asparagine from 1.71 to 0.061, a reduction of 96.5%. In the buffered group, the addition of asparaginase reduced the free asparagine from 2.55 to 0.027, a reduction of 98.9%.

5 Finally, sample flakes from each group were evaluated in a model system. In this model system, a small amount of flakes from each sample was mixed with water to form an approximate 50% solution of flakes to water. This solution was heated in a test tube for 40 minutes at 120°C. The sample was then analyzed for acrylamide formation, with the results shown in Table 24. Duplicate results for each category are shown side by side. In the model
10 system, the addition of asparaginase to the unbuffered flakes reduced the acrylamide from an average of 993.5 ppb to 83 ppb, a reduction of 91.7%. The addition of asparaginase to the buffered flakes reduced the acrylamide from an average of 889.5 ppb to an average of 64.5, a reduction of 92.7%.

	Control Unbuffered		Asparaginase Unbuffered		Control Buffered		Asparaginase Buffered	
Acrylamide ppb	1019	968	84	82	960	819	70	59

Table 24: Model System Effect of Asparaginase on Acrylamide

15 Rosemary Extract Added to Frying Oil

In a separate test, the effect of adding rosemary extract to the frying oil for fabricated potato chips was examined. In this test, identically fabricated potato chips were fried either in oil that had no additives (controls) or in oil that had rosemary extract added at one of four levels: 500, 750, 1,000, or 1,500 parts per million. Table 25 below gives the results of this

20 test.

GO

of cysteine does not contribute to reducing acrylamide because N-acetyl-cysteamine, which has no carboxyl group is about as effective as cysteine at reducing acrylamide. Glutathione, a tripeptide with cysteine in the middle position, was equivalent to cysteine. Although dithiothreitol has two thiol groups, acrylamide with dithiothreitol was similar to the
5 compounds with one thiol group. The two thiol groups in dithiothreitol may react to form disulfides so dithiothreitol was less effective on an equal molar basis than the other thiol containing compounds.

Experimentation, as exemplified by Table 6 above, has shown that acrylamide reduction is roughly proportional to the concentration of added free thiols, such as cysteine.
10 However, collateral effects on the characteristics, such as color, taste, and texture of the final product from the addition of a free thiol compound as cysteine must be considered. High levels of cysteine, for example, can impart undesirable off-flavors in the final product. Hence, additives that can increase or magnify the effectiveness of a free thiol compound, such as cysteine, are desirable because such additives can permit the same level of
15 acrylamide reduction with a lesser concentration of a thiol compound. It has been discovered that when a reducing agent is added to a free thiol compound such as cysteine, acrylamide reduction is enhanced. Reducing agents are known in oxidation-reduction chemistry to be compounds that are electron donors and oxidizing agents are known to be electron acceptors.

Effect of Cysteine + Reducing Agent on Acrylamide Decomposition

20 Simple model systems can be used to test the magnified effectiveness of free thiol compounds with the addition of a reducing agent. A control sample solution comprising a free thiol (1.114 millimolar of cysteine) and acrylamide (0.0352 millimolar) was prepared in a 0.5 molar sodium phosphate buffer having a pH of 7.0. The solution was heated at 120°C for 40 minutes. The recovery of the added acrylamide was 21%. Hence, the amount of
25 acrylamide reduction for the control sample with no reducing agent was 79%. Even though the molar ratio of cysteine to acrylamide was more than 30, not all of the acrylamide reacted

with cysteine.

A test was then run with free thiol compounds and a reducing agent. A solution comprising 135 ppm of a free thiol compound (1.114 millimolar of cysteine), 2500 ppb acrylamide (0.0352 millimolars), and about 305 ppm reducing agent (1.35 millimolar of stannuous chloride dihydrate) was prepared in a 0.5 molar sodium phosphate buffer having a pH of 7.0. After heating at 120°C for 40 minutes, the recovery of added acrylamide was measured to be less than 4%. Hence, the amount of acrylamide reduction with the sample containing a reducing agent was over 96%, an additional 17% over the free thiol alone, or control sample.

Effect of Cysteine + Oxidizing Agent on Acrylamide Decomposition

A test was then run with the addition of an oxidizing agent instead of a reducing agent. A solution of 135 ppm of a free thiol (1.114 millimolar of cysteine), 2500 ppb of acrylamide (0.0352 millimolars), and a 235 ppm of an oxidizing agent (1.35 millimolars of dehydroascorbic acid) was prepared in a 0.5 molar solution of sodium phosphate buffer having a pH of 7.0. After heating at 120°C for 40 minutes, the recovery of added acrylamide was measured to be about 27%. Hence, the amount of acrylamide reduction with the sample containing the oxidizing agent was about 73%, which is less then the reduction achieved by the cysteine control sample. Thus, acrylamide decomposition worsened with the addition of the oxidizing agent.

Further tests were conducted with other oxidizing and reducing agents with an acrylamide solution having about 2500 ng/ml, or 2500 ppb of acrylamide. The results are provided in Table 27 below.

Compound	Concentration (ug/ml)	Concentration millimolar	Recovery of Acrylamide(ng/ml)	% Recovery of Acrylamide
Control Sample (Free Thiol Only)				
Cysteine	135	1.114	534	21%
Reducing Agent + 135 ppm of Cysteine				
Ascorbic Acid (Vitamin C)		11.4		9%
Stannous chloride dihydrate	304.6	1.350	68	3%
Sodium sulfite	170.2	1.350	69	3%
Sodium meta-bisulfite	256.6	1.350	24	1%
Oxidizing Agent + 135 ppm of Cysteine				
Dehydroascorbic acid	235	1.350	673	27%
Gallic acid monohydrate	253.9	1.350	1111	44%
Catechin hydrate	391.9	1.350	877	35%
Epicatechin	391.9	1.350	827	33%
Rutin hydrate	824.2	1.350	1306	52%

Table 27: Effect of Oxidizing and Reducing Agents With Cysteine on Acrylamide

Figure 13 graphically illustrates the theorized effect of the addition of an oxidizing or reducing agent to an acrylamide-reducing agent. Without being bound to theory, it is

5 believed that the reducing agents 1304 increase or magnify the effectiveness of cysteine by keeping cysteine in the reduced, thiol 1306 form. As discussed above, it is believed that the free thiol of cysteine reacts with the double bond of acrylamide. An oxidizing agent 1302, such as dehydroascorbic acid, likely converts the cysteine thiol 1306 into an inactive cysteine disulfide (cystine) 1308. In one embodiment of the invention, the reducing agent having a

10 standard reduction potential (E°) of between about +0.2 and -2.0 volts is used.

Enhanced Effect of Thiol with a Reducing Agent with Potato Flakes

A test was performed to compare the reduction of acrylamide with a free thiol with and without a reducing agent in the presence of potato flakes. Six vials were prepared having 3 grams of potato flakes mixed with 3 mL of dionized water. Cysteine was added to the

15 vials at concentrations (ug cysteine/g potato flake) of 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, and 100

ppm. Casein, a potential free thiol source, was added to a vial at the 1% level. The six samples were each heated at 120°C for 40 minutes. The solutions were then measured for acrylamide concentrations. The results are shown in Table 28 below:

Sample	Added Cysteine (ppm)	Acrylamide (ppb)	Acrylamide as a % of Control
Control Potato Flakes	0	2695	100
Cysteine	800	2220	82
Cysteine	400	2179	81
Cysteine	200	2612	97
Cysteine	100	2832	105
Casein (1%)		2808	104

Table 28: Effect of Various Concentration Levels on Acrylamide Reduction without a Reducing Agent

The data again confirms that as the concentration of cysteine increases, the acrylamide reduction also increases. The above test also indicates that 1% Casein without a reducing agent does not reduce acrylamide.

As shown in Table 27 above, sodium sulfite (reducing agent) increased the effectiveness of cysteine in decreasing added acrylamide an additional 18% over the free thiol, or control sample. A test was conducted to determine the effect of sodium sulfite on the effectiveness of cysteine and casein in decreasing acrylamide levels in potato flakes. Five vials were prepared having 3 grams of potato flakes mixed with 3 mL of dionized water.

Cysteine was added to two vials at a concentration of 400 ppm (ug cysteine/g potato flake). Casein was added to a vial at the 1% level. Sodium sulfite was added at 483 ppm (ug sulfur dioxide per g of potato flake) to the casein vial and one of the cysteine vials. The samples were each heated at 120°C for 40 minutes. The solutions were then measured for acrylamide concentrations. The results are shown in Table 29 below:

Thiol	Reducing Agent	Acrylamide (ppb)	Acrylamide as % of Control
0 ppm Cysteine (Control)	--	3567	100
400 ppm Cysteine		2500	70
--	483 ppm sodium sulfite	3004	84
400 ppm cysteine	483 ppm sodium sulfite	2351	66
1 % Casein	483 ppm sodium sulfite	2632	74

Table 29: Effect of Various Concentration Levels
on Acrylamide Reduction of Potato Flakes without a Reducing Agent

Table 28 indicates that a 1% Casein addition failed to reduce acrylamide levels in potato flakes without a reducing agent. Table 29, however, reveals that the addition of a reducing agent (483 ppm sodium sulfite) results in an additional 10% acrylamide reduction over the sodium sulfite alone.

The thiol and reducing agent were less effective in reducing acrylamide levels in the potato flakes samples (Table 28 and 29) than in the non-potato flakes solutions. There are several potential reasons that explain this. For example, acrylamide was added in the non-potato flake samples but had to be formed in the potato flake samples. Thus, acrylamide formation was probably more important than decomposition. Further, conditions were not optimized for potato flakes. The pH of the potato flakes was not adjusted to pH 7, which would increase the reactivity of cysteine with acrylamide.

In one embodiment, the free thiol compound 1306 is selected from the group consisting of cysteine, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-cysteamine, glutathione reduced, dithiothreitol, casein, and combinations thereof. In one embodiment, the reducing agent 1304 is selected from the group consisting of stannous chloride dihydrate, sodium sulfite, sodium meta-bisulfite, ascorbic acid, ascorbic acid derivatives, isoascorbic acid (erythorbic acid), salts of ascorbic acid derivatives, iron, zinc, ferrous ions, and combinations thereof.

na

One advantage of the present invention is that the same reduction of acrylamide can be achieved by using less free thiol when the free thiol compound is mixed with a reducing agent. Thus, undesirable off-flavors can be reduced or eliminated. The acrylamide reduction can be achieved by using free thiol compound and reducing agent in any dough-based snack food. Another benefit of the present invention is the inherent nutritional benefit associated with some reducing agents. Ascorbic acid, for example, is also commonly known as vitamin C.

While the invention has been particularly shown and described with reference to several embodiments, it will be understood by those skilled in the art that various other approaches to the reduction of acrylamide in thermally processed foods by use of a free thiol and reducing agent additives may be made without departing from the spirit and scope of this invention. For example, while the process has been disclosed with regard to potato and corn products, the process can also be used in processing of food products made from barley, wheat, rye, rice, oats, millet, and other starch-based grains, as well as other foods containing asparagine and a reducing sugar, such as sweet potatoes, onion, and other vegetables. Further, the process has been demonstrated in potato chips and corn chips, but can be used in the processing of many other fabricated food products, such as other types of snack chips, cereals, cookies, crackers, hard pretzels, breads and rolls, and the breading for breaded meats.

CLAIMS:

What is claimed is:

1. A method of reducing the amount of acrylamide produced by thermal processing of a fabricated food containing free asparagine and simple sugars, said method comprising the steps of:
 - a) adding a free thiol compound to a starch-based dough for a thermally processed food;
 - b) adding a reducing agent to said starch-based dough; and
 - c) thermally processing said food product.
2. The method of Claim 1, wherein said adding steps a) and b) add an amount of said free thiol compound and said reducing agent that is sufficient to produce a final level of acrylamide in said thermally processed food that is lower than the final level of acrylamide in a same thermally processed food made with said free thiol and without said reducing agent.
3. The method of Claim 1, wherein said free thiol at step a) further comprises a first thiol concentration and wherein a final level of acrylamide in said thermally processed food that is lower than the final level of acrylamide in a same thermally processed food made with said free thiol at said first concentration without said reducing agent.
4. The method of Claim 1, wherein said adding steps a) and b) add an amount of said free thiol compound and said reducing agent that is sufficient to produce a final level of acrylamide in said thermally processed food that is at least an additional 5 percent lower than the final level of acrylamide in a same thermally processed food made with said free thiol and without said reducing agent.
5. The method of Claim 1 wherein said free thiol compound is selected from the group consisting of cysteine, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-cysteamine, glutathione reduced, di-thiothreitol, casein, and combinations thereof.
6. The method of Claim 1, wherein said reducing agent is selected from the group consisting of stannous chloride dihydrate, sodium sulfite, sodium meta-bisulfite, ascorbic acid, ascorbic acid derivatives, isoascorbic acid (erythorbic acid), salts of ascorbic acid derivatives, iron, zinc, ferrous ions, and combinations thereof.

0000-

WO 2006/076084

PCT/US2005/043302

7. The method of Claim 1, wherein said free thiol compound comprises cysteine and said reducing agent comprises ascorbic acid.
8. The method of Claim 1, wherein said reducing agent comprises a standard reduction potential between about +0.2 and about -2.0 volts.
9. The method of Claim 1, wherein said reducing agent in said starch-based dough at step b) is present at a concentration of less than 2,000 parts per million.
10. The method of Claim 1, wherein the starch-based dough comprises a starch component selected from the group consisting of potatoes, corn, barley, wheat, rye, rice, oats, and millet.
11. The method of Claim 1, wherein said thermally processed food comprises fabricated potato chips.
12. The method of Claim 1, wherein said thermally processed food comprises fabricated corn chips.
13. The method of Claim 1, wherein said thermally processed food comprises a breakfast cereal.
14. The method of Claim 1, wherein said thermally processed food comprises a cracker.
15. The method of Claim 1, wherein said thermally processed food comprises a cookie.
16. The method of Claim 1, wherein said thermally processed food comprises a hard pretzel.
17. The method of Claim 1, wherein said thermally processed food comprises a bread product.
18. The thermally processed food produced by the method of Claim 1.

19. A method of preparing fabricated potato chips, said method comprising the steps of:
- a) preparing a dough comprising potato flakes, water, a free thiol compound and a reducing agent, wherein said free thiol compound and said reducing agent are added in amounts sufficient to reduce the amount of acrylamide produced by thermal processing of said dough to a predetermined level;
 - b) sheeting and cutting said mixture to form cut pieces;
 - c) thermally processing said cut pieces to form potato chips.
20. The method of Claim 19, wherein said predetermined level is lower than an acrylamide level that would be produced in a potato chip prepared in the same manner but without said reducing agent.
21. The method of Claim 19, wherein said predetermined level is at least an additional 5 percent lower than an acrylamide level that would be produced in a potato chip prepared in the same manner but without said reducing agent.
22. The method of Claim 19, wherein said free thiol compound is selected from the group consisting of cysteine, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-cysteamine, glutathione reduced, dithiothreitol, casein, and combinations thereof.
23. The method of Claim 19, wherein said reducing agent is selected from the group consisting of stannous chloride dihydrate, sodium sulfite, sodium meta-bisulfite, ascorbic acid, ascorbic acid derivatives, isoascorbic acid (erythorbic acid), salts of ascorbic acid derivatives, iron, zinc, ferrous ions, and combinations thereof.
24. The method of Claim 19, wherein said free thiol compound comprises cysteine and said reducing agent comprises ascorbic acid.
25. The method of Claim 19, wherein said reducing agent comprises a standard reduction potential between about +0.2 and about -2.0 volts.
26. The method of Claim 19, wherein said reducing agent in said dough at step a) is present at a concentration of less than 2,000 parts per million.
27. The method of Claim 19, wherein said thermally processing step c) comprises baking.
28. The method of Claim 19, wherein said thermally processing step c) comprises frying.

30. A method of preparing potato chips, said method comprising the steps of:
- a) slicing raw potatoes to form potato slices;
 - b) soaking said potato slices in a solution having an free thiol compound and a reducing agent to reduce the level of acrylamide in said potato chips to a predetermined level;
 - c) thermally processing said potato slices to form potato chips.
31. The method of Claim 30, wherein said predetermined level is lower than an acrylamide level that would be produced in a potato chip prepared in the same manner but without said reducing agent.
32. The method of Claim 30, wherein said predetermined level is at least an additional 5 percent lower than an acrylamide level that would be produced in a potato chip prepared in the same manner but without said reducing agent.
33. The method of Claim 30, wherein said free thiol compound at step b) is selected from the group consisting of cysteine, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-cysteamine, glutathione reduced, di-thiothreitol, casein, and combinations thereof.
34. The method of Claim 30, wherein said reducing agent at step b) is selected from the group consisting of stannous chloride dihydrate, sodium sulfite, sodium meta-bisulfite, ascorbic acid, ascorbic acid derivatives, isoascorbic acid (erythorbic acid), salts of ascorbic acid derivatives, iron, zinc, ferrous ions, and combinations thereof.
35. The method of Claim 30, wherein said reducing agent at step b) comprises a standard reduction potential between about +0.2 and about -2.0 volts.
36. The method of Claim 30, wherein said soaking step b) reduces a final level of acrylamide in said thermally processed food that is lower than the final level of acrylamide in a same thermally processed food made without said reducing agent.

[Handwritten signature]

- 37. The method of Claim 30, wherein said soaking step b) reduces a final level of acrylamide an additional 5 percent lower than an acrylamide level that would be produced in a potato chip prepared in the same manner but without said reducing agent.
- 38. The method of Claim 30, wherein said thermally processing step c) comprises baking.
- 39. The method of Claim 30, wherein said thermally processing step c) comprises frying.
- 40. The potato chips produced by the method of Claim 30.

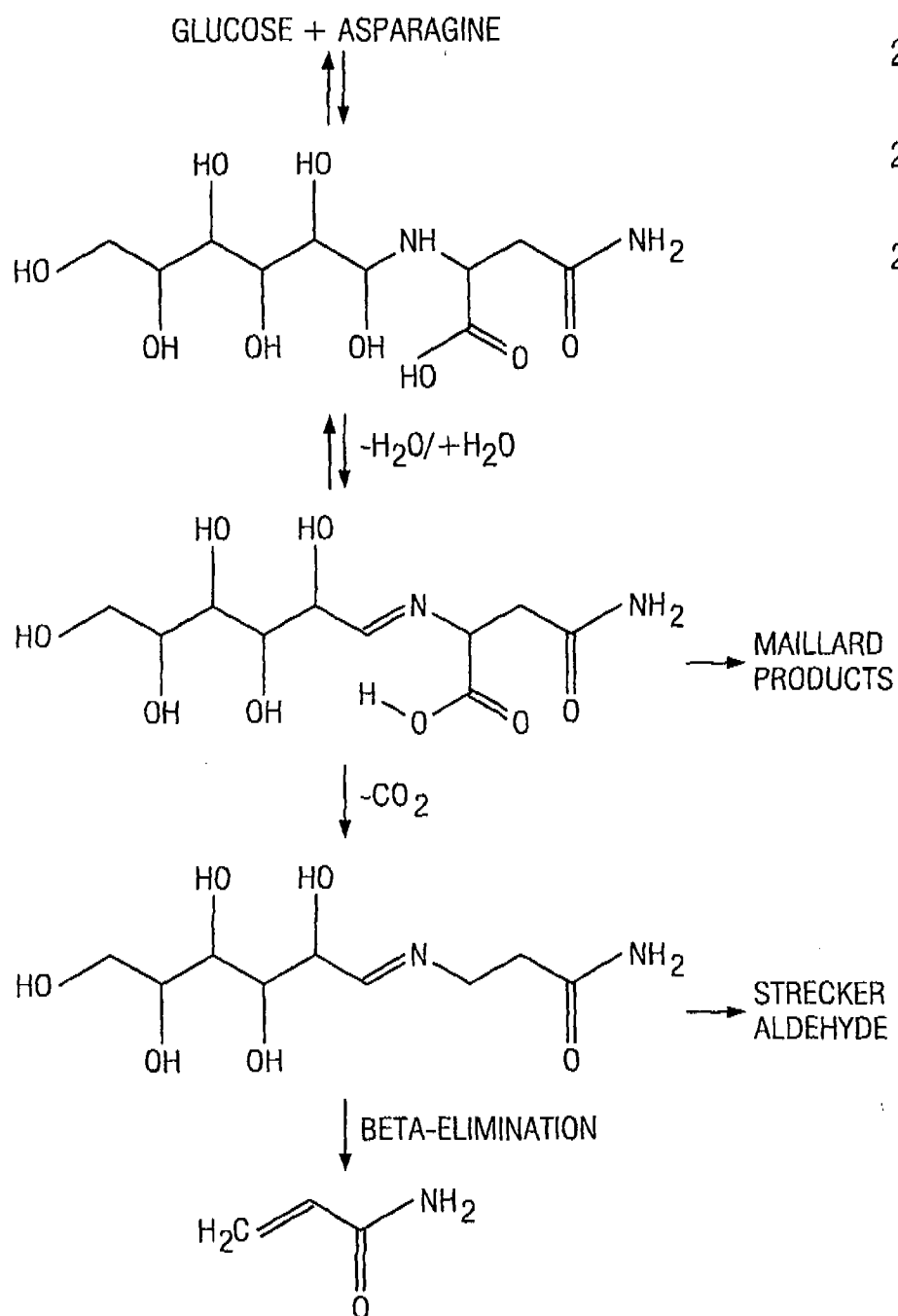


FIG. 1

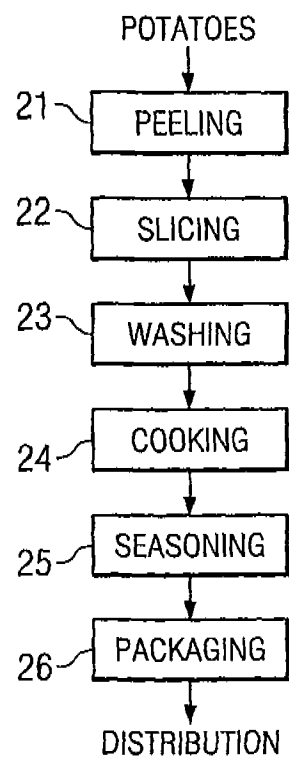


FIG. 2
(PRIOR ART)

FIG. 3A

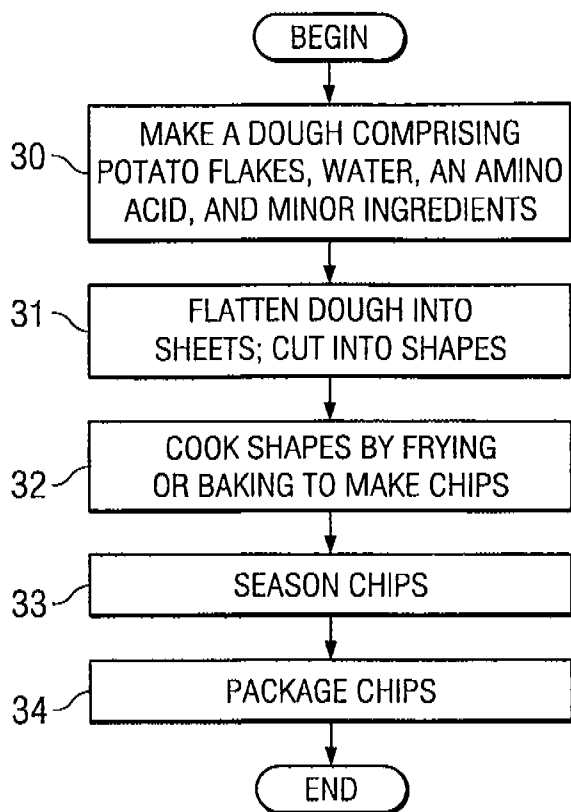
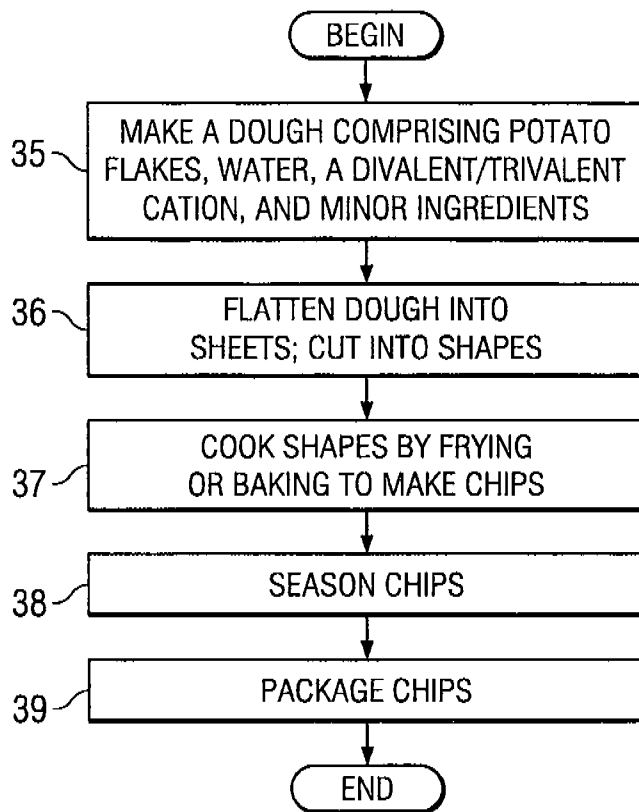


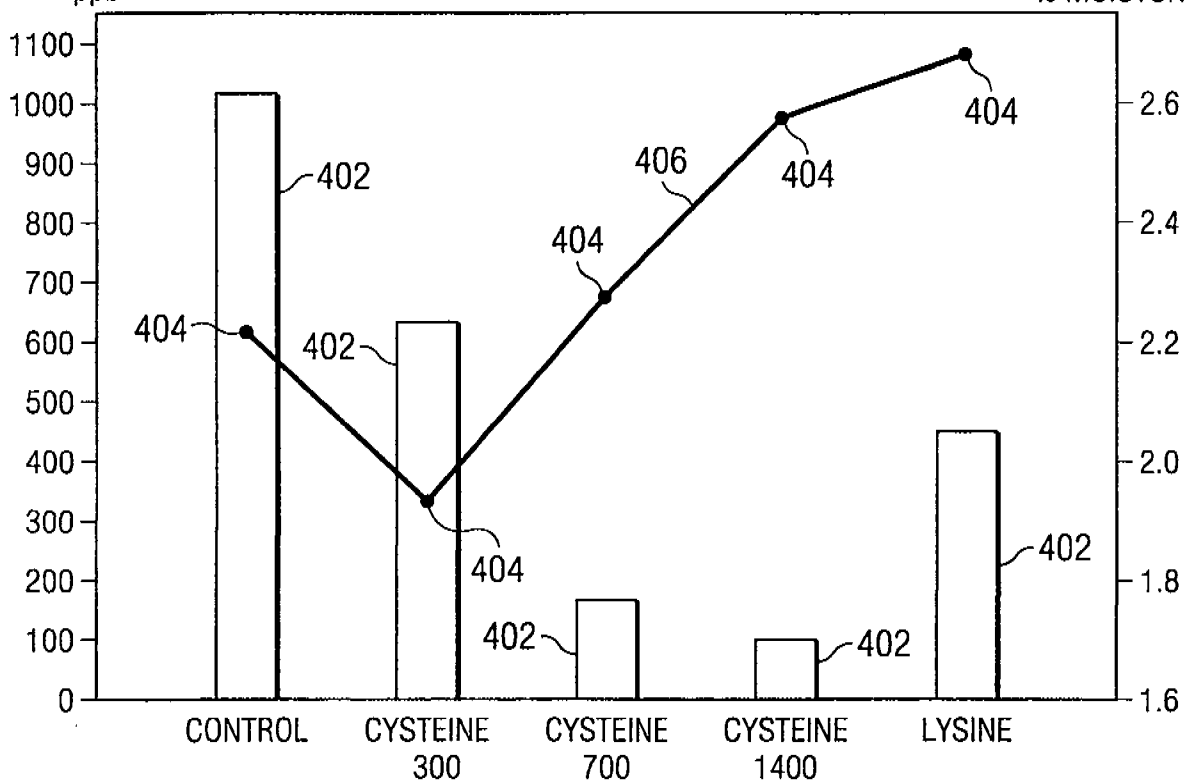
FIG. 3B

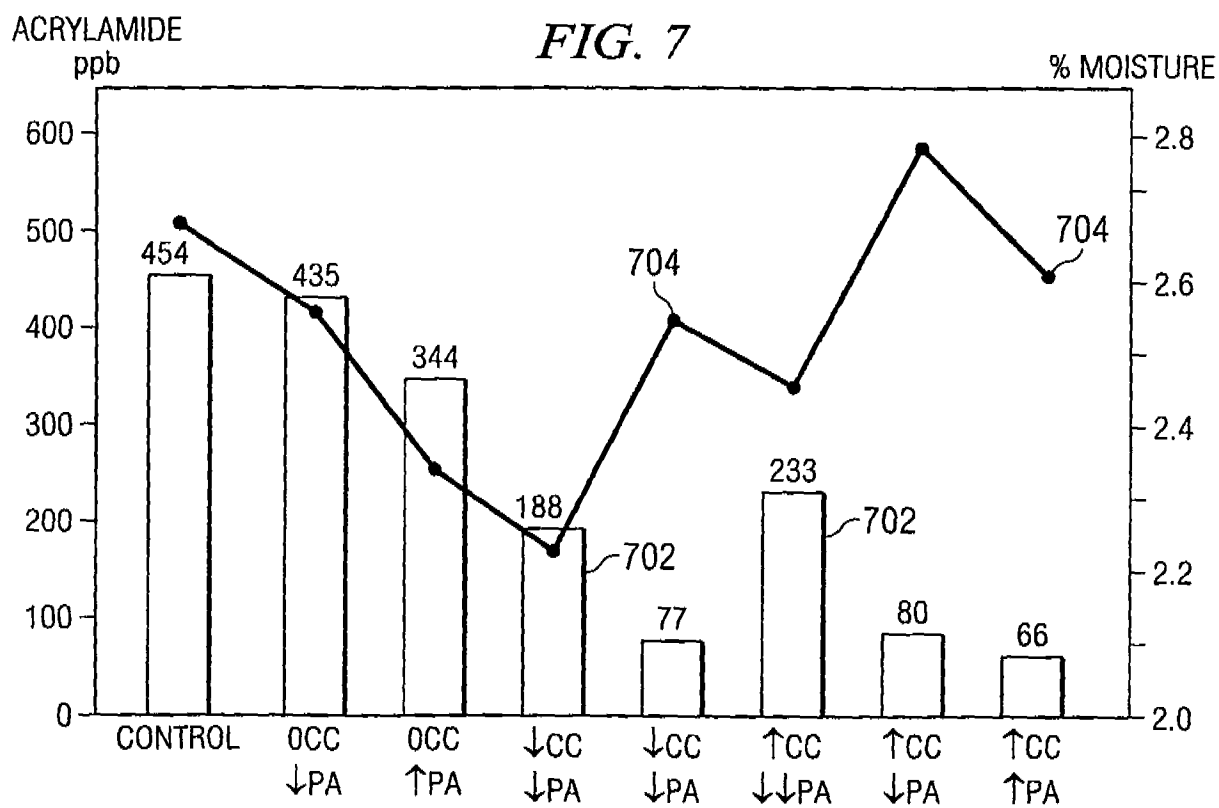
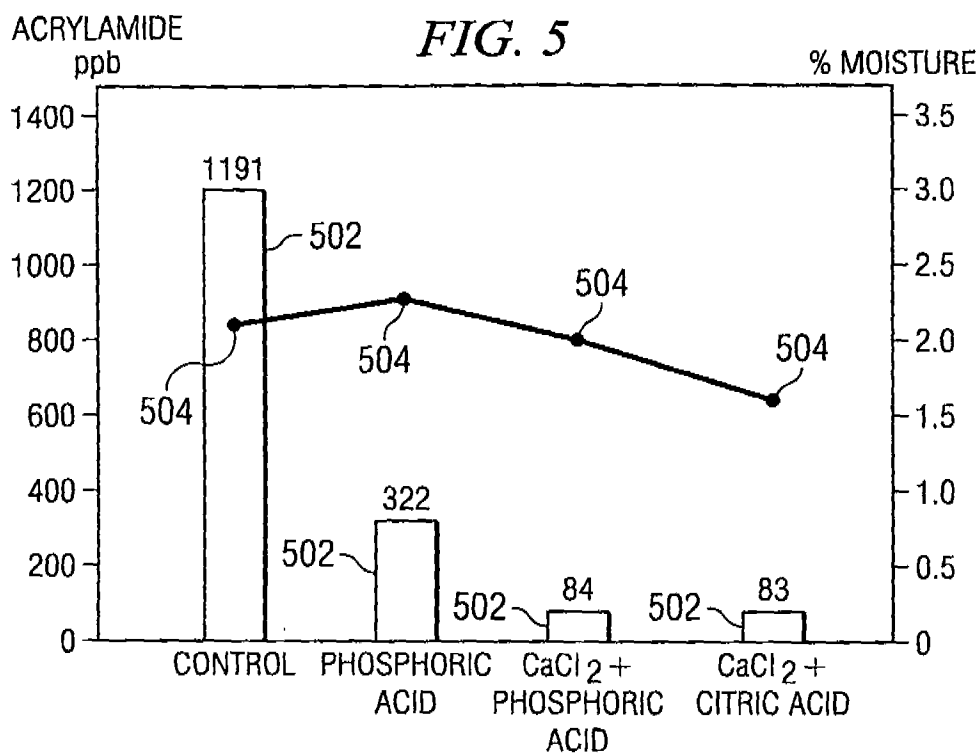


ACRYLAMIDE
ppb

FIG. 4

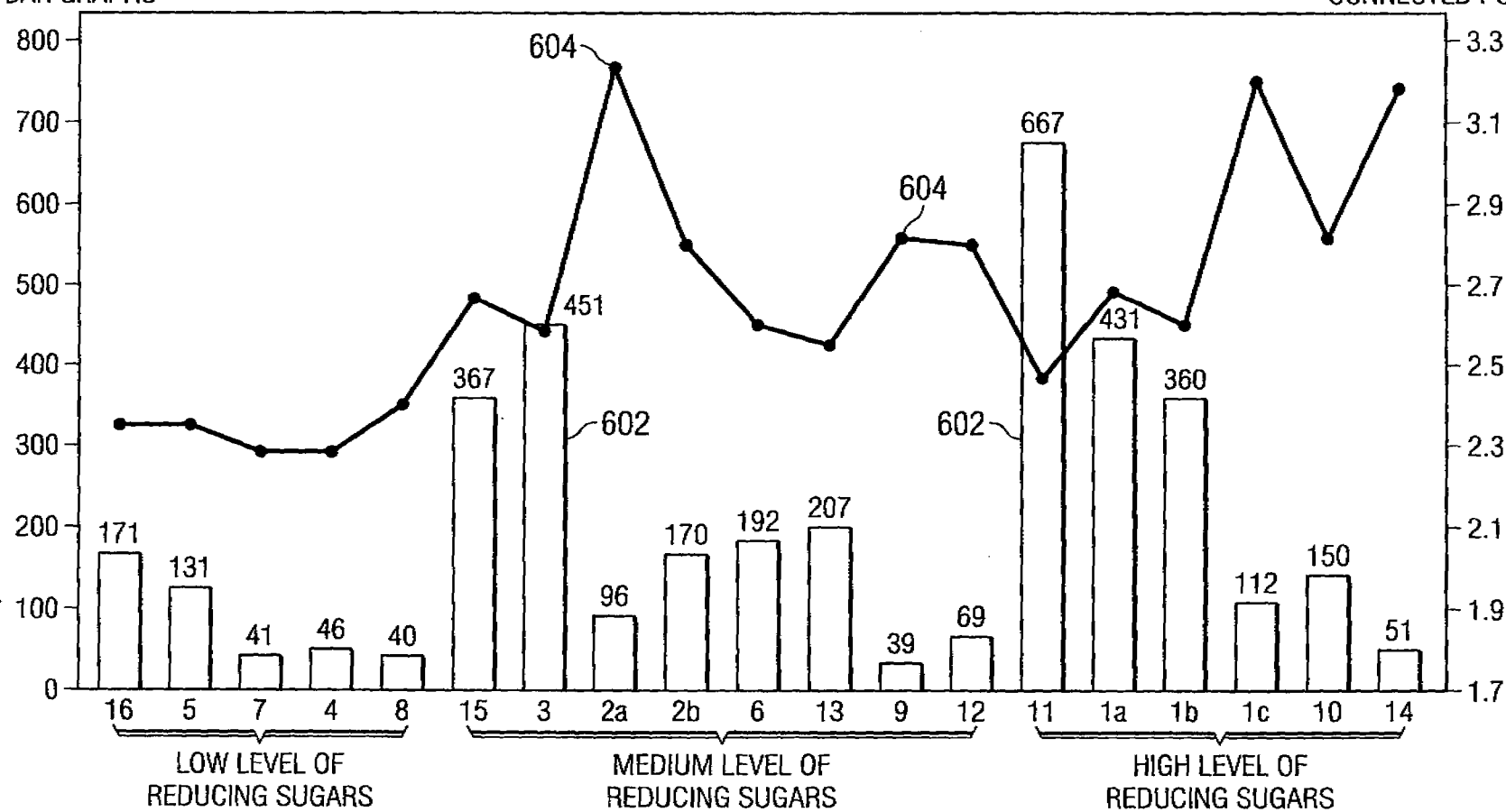
% MOISTURE



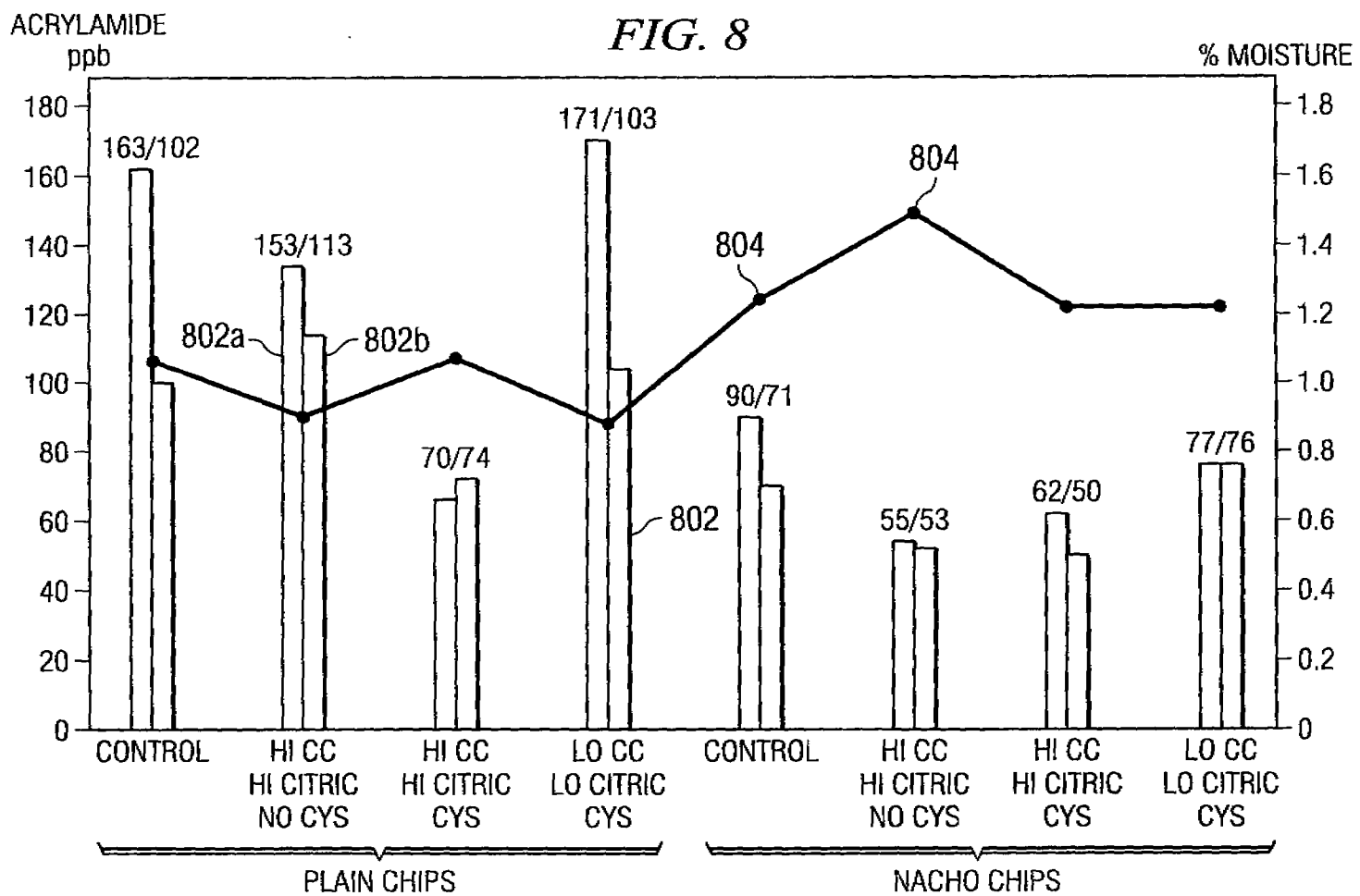


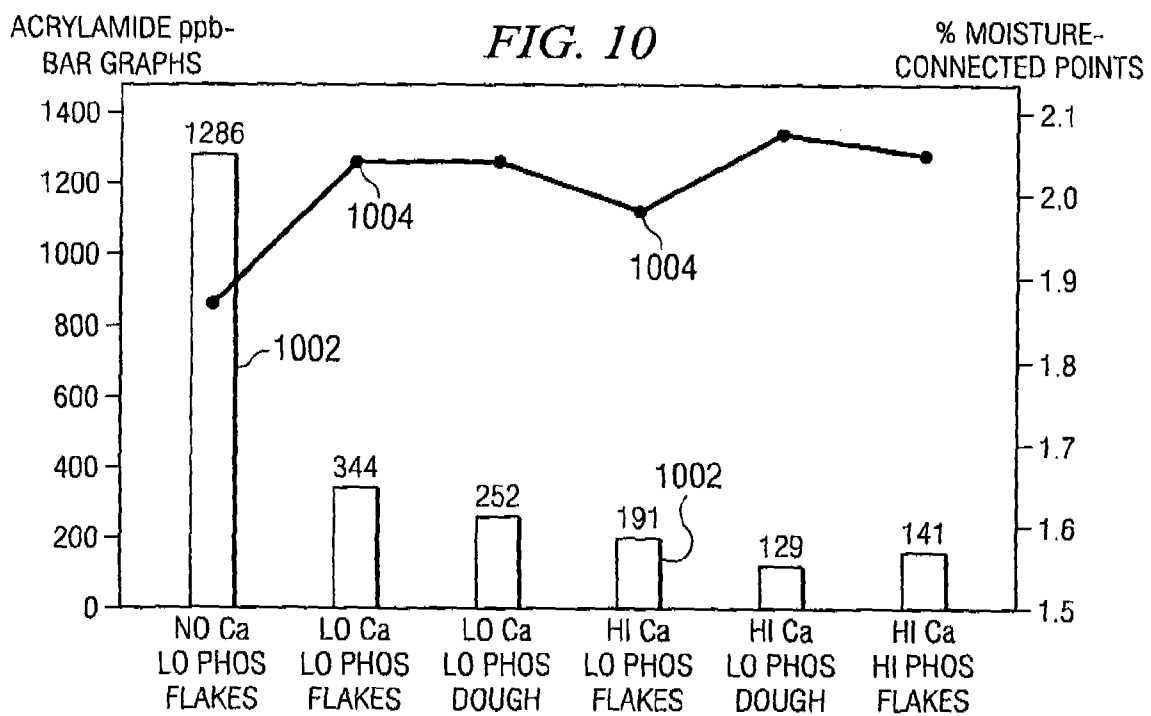
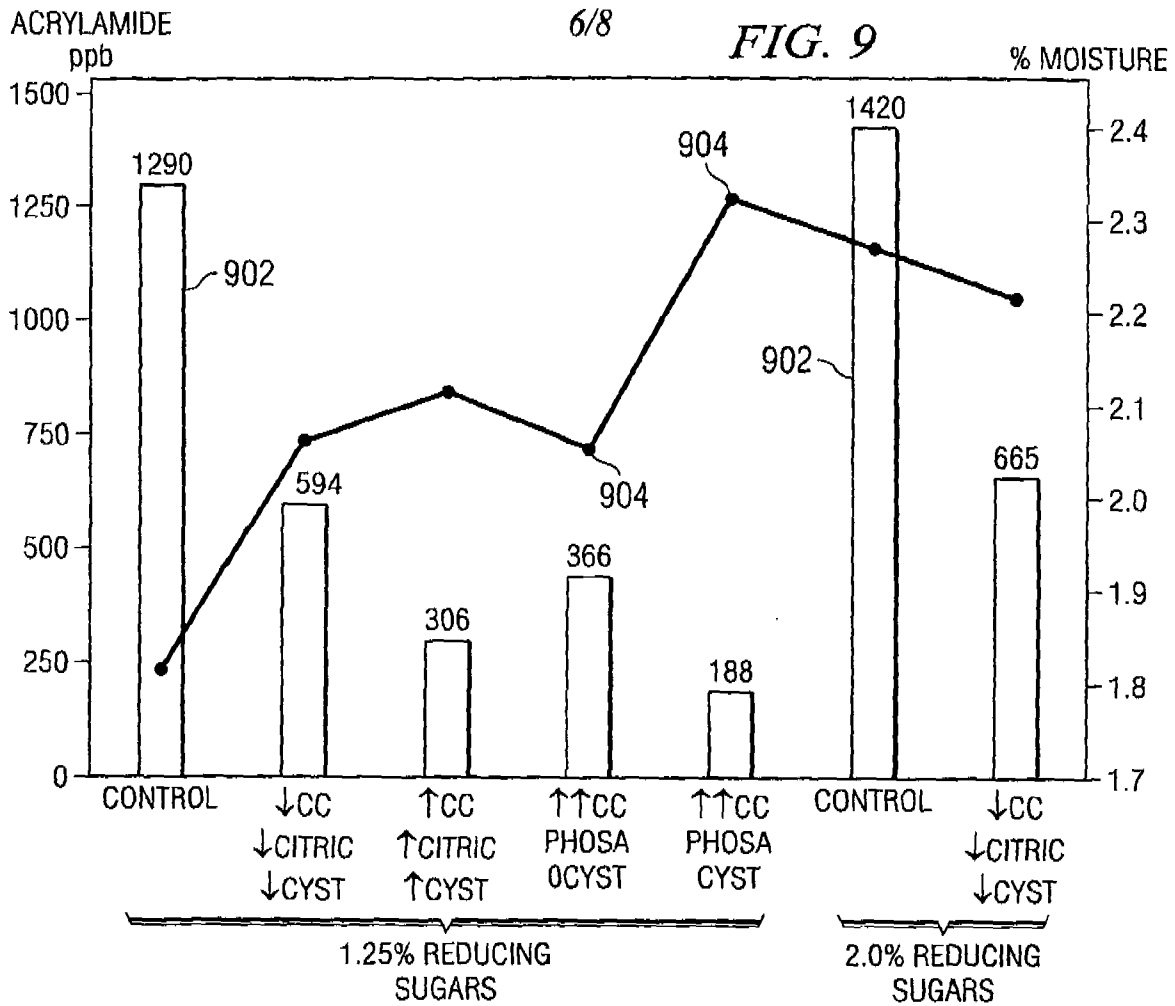
ACRYLAMIDE ppb-
BAR GRAPHS

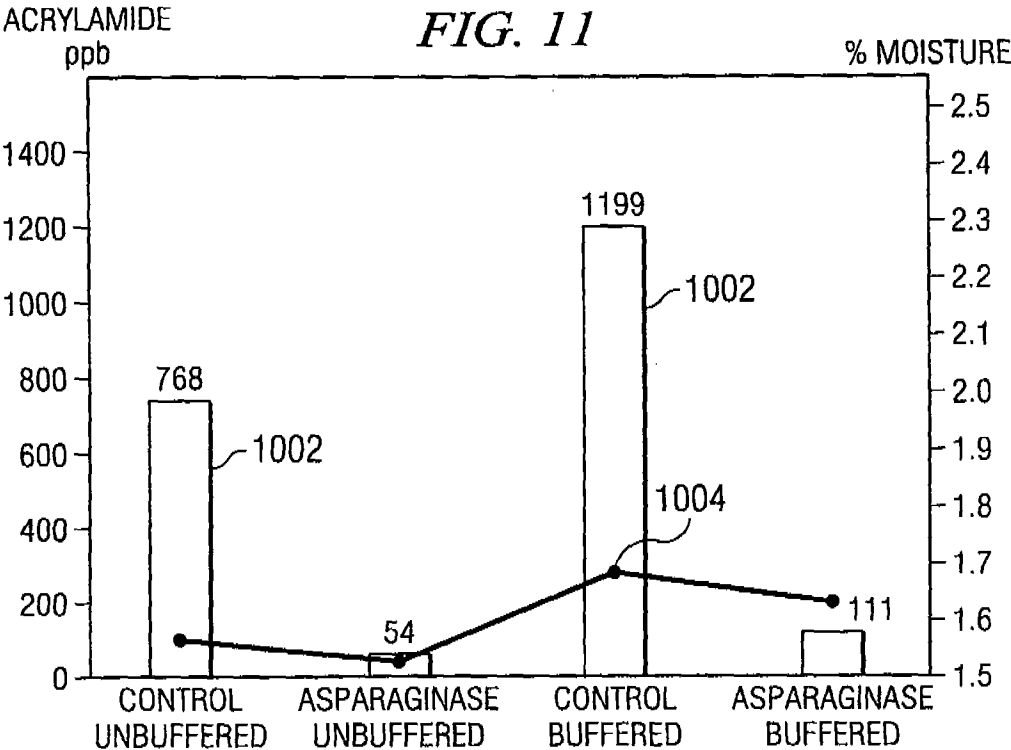
FIG. 6

% MOISTURE-
CONNECTED POINTS

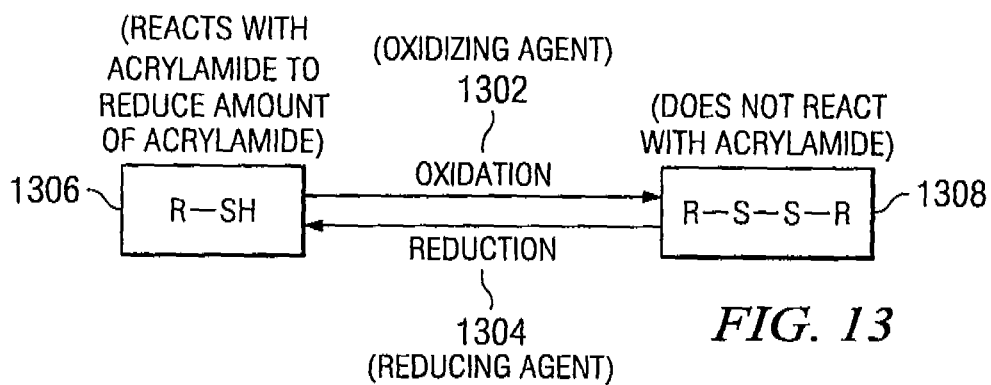
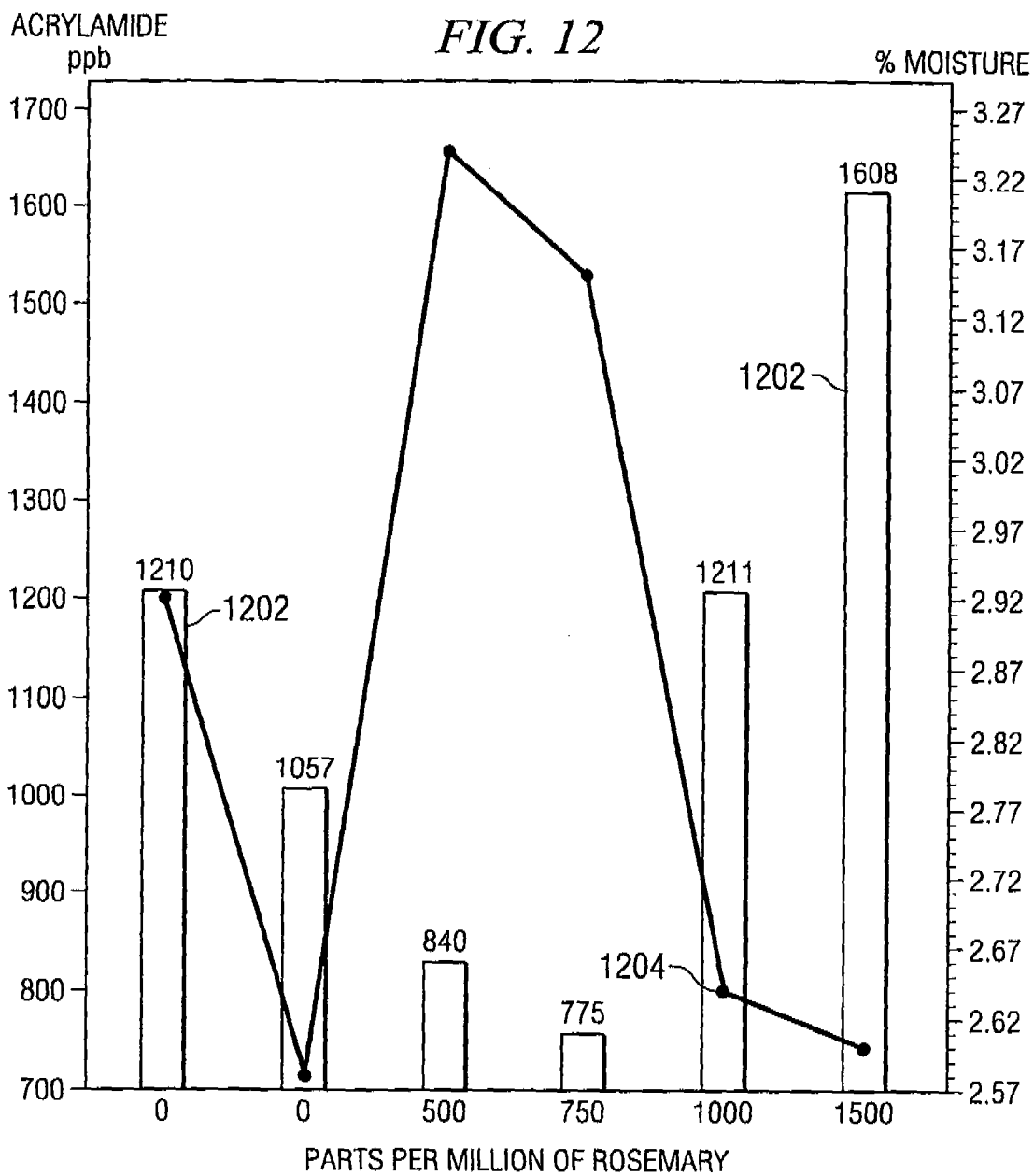
4/8







8/8



80

e 00000

MÉTODO PARA MEJORAR LA DESCOMPOSICIÓN DE ACRILAMIDA

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

1. Referencias Cruzadas a Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud de patente US co-pendiente 10/929,922 presentada en agosto 30, 2004 y la solicitud de patente U.S. co-pendiente 10/931,021 presentada en agosto 31, 2004, que es continuación en parte de la solicitud de patente U.S. 10/372,378 y la solicitud de patente U.S. co-pendiente 10/372,154, presentadas en febrero 21, 2003. La solicitud de patente U.S. 10372,154 es una continuación en parte de la solicitud de patente U.S. co-pendiente 10/247,504 presentada en septiembre 19, 2002.

2. Campo Técnico

La presente invención se relaciona con un método para reducir la cantidad de acrilamida de alimentos procesados térmicamente y permite la producción de alimentos que tienen niveles significativamente reducidos de acrilamida. La invención se relaciona más específicamente con: a) agregar una combinación de dos o más agentes reductores de acrilamida cuando elaboran un producto alimenticio y b) el uso de varios agentes reductores de acrilamida durante la producción de hojuelas de papa u otros productos intermedios utilizados en la fabricación de un producto alimenticio fabricado.

3. Descripción de la Técnica Relacionada

La acrilamida química se ha utilizado bastante en su forma de polímero en aplicaciones industriales para el tratamiento de agua, recuperación de aceite mejorada, elaboración de papel, floculantes, espesantes, procesamiento de mineral y telas de presión permanente. La acrilamida participa como un sólido cristalino blanco, es inodoro, y es altamente soluble en agua (2155 g/l a 30°C). Los sinónimos para la acrilamida incluyen 2-propenamida, etileno carboxamida, amida de ácido acrílico, vinilamida y amida de ácido propenóico. La acrilamida tiene una masa molecular de 71.08, un punto de fusión de 84.5°C, y un punto de ebullición de 125°C a 25 mmHg.

En tiempos muy recientes, una amplia variedad de alimentos han dado positivo para la presencia de monómero de acrilamida. La acrilamida se ha encontrado especialmente y principalmente en productos alimenticios carbohidratados que se han calentado o procesado a altas temperaturas. Ejemplos de alimentos que han dado positivo para acrilamida incluyen café, cereales, galletas, trozos de papa, papa a la francesa, panes y rollos, y comidas apanadas fritas. En general, los contenidos relativamente bajos de la acrilamida se han encontrado en productos ricos de proteínas calentados, mientras que los contenidos relativamente altos de acrilamida se han encontrado en productos ricos en carbohidratos, comparado con niveles no detectables en alimentos servidos y no calentados. Los niveles de acrilamida encontrados en varios alimentos procesados en forma similar incluyen un rango de 320-2300 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en trozos de papa, un rango de 300-1100

($\mu\text{g/kg}$) en papas a la francesa, un rango de 120-180 ($\mu\text{g/kg}$) en trozos de maíz y los niveles variantes no detectables hasta 1400 ($\mu\text{g/kg}$) en varios cereales para el desayuno.

Actualmente se cree que la acrilamida se forma de la presencia de aminoácidos y de azúcares reductores. Por ejemplo, se cree que una reacción entre asparagina libre, un aminoácido encontrado comúnmente en vegetales, y azúcares reductores libres cuenta para la mayoría de la acrilamida encontrada en los productos alimenticios freídos. Los conteos de asparagina para aproximadamente 40% del total de aminoácidos libres encontrados en papas, aproximadamente 18% del total de aminoácidos libres totales encontrados en centeno de alta proteína, y aproximadamente 14% del total de aminoácidos libres encontrados en trigo.

La formación de acrilamida a partir de aminoácidos diferentes de asparagina es posible, pero no se ha confirmado aún en ningún grado de certeza. Por ejemplo, alguna formación de acrilamida se ha reportado a partir de ensayos de glutamina, metionina, cisteína y ácido aspártico como precursores. Estos hallazgos son difíciles de confirmar, sin embargo, debido a las impurezas de asparagina potenciales en aminoácidos madre. A pesar de eso, la asparagina se ha identificado como el precursor de aminoácido más responsable para la formación de acrilamida.

En razón a que la acrilamida en los alimentos es un fenómeno recientemente descubierto, su mecanismo exacto de formación no se ha confirmado. Sin embargo, se cree ahora que la ruta más

83

probable para la formación de acrilamida involucra una reacción Maillard. La reacción Maillard ha sido bastante reconocida en la química de alimentos como una de las reacciones químicas más importantes en el proceso de alimentos y puede afectar el sabor, color, y el valor nutricional del alimento. La reacción Maillard requiere calor, humedad, azúcares reductores y aminoácidos.

La reacción Maillard involucra una serie de reacciones complejas con números intermedios, pero puede ser descrita de forma general que involucra tres etapas. La primera etapa de la reacción Maillard involucra la combinación de un grupo amino libre (de un grupo de aminoácidos libres y/o proteínas) con un azúcar reductor (tal como glucosa) para formar productos Amadori o Heyns. La segunda etapa involucra la degradación de los productos Amadori o Heyns redispuestos por vía de diferentes rutas alternativas que involucran desoxiozonas, fisión o degradación Strecker. Una serie compleja de reacciones-que incluyen deshidratación, eliminación, sustitución, ciclización, fisión, y fragmentación-resulta en un grupo de intermedios de sabor y compuestos de sabor. La tercera etapa de la reacción Maillard se caracteriza por la formación de polímeros y copolímeros nitrogenados cafés. Utilizando la reacción Maillard como la ruta probable para la formación de acrilamida, la figura 1 ilustra una simplificación de rutas sospechosas para la formación de acrilamida partiendo con asparagina y glucosa.

No se ha determinado que la acrilamida es perjudicial para los humanos, pero su presencia en los productos alimenticios, especialmente en niveles elevados, es indeseable. Como se anotó

84

previamente, concentraciones relativamente mayores de acrilamida se encuentran en productos alimenticios que se han calentado o procesado térmicamente. La reducción de la acrilamida en tales productos alimenticios se puede lograr al reducir o eliminar los compuestos precursores que forman acrilamida, inhibiendo la formación de acrilamida durante el proceso del alimento, o hacer reaccionar el monómero de acrilamida una vez formado en el alimento, o remover la acrilamida del producto antes del consumo. Se entiende que cada producto alimenticio presenta retos únicos para lograr cualquiera de las opciones anteriores. Por ejemplo, los alimentos que se rebanan y cocinan como piezas coherentes pueden no ser fácilmente mezclados con varios aditivos sin destruir físicamente las estructuras celulares que dan a los productos alimenticios sus características únicas luego de cocción. Otros requerimientos de procesamiento para productos alimenticios específicos pueden probablemente hacer estrategias de acrilamida incompatibles o extremadamente difíciles.

Por vía de ejemplo, la figura 2 ilustra métodos de la técnica anterior bien conocidos para elaborar trozos de papas fritas a partir de materia prima de papa. La materia prima de papa, que contiene aproximadamente 80% o más de peso de agua, si procede primero a una etapa de pelado 21. Después de que se pela la piel de materia prima de papas, se transporta luego a una etapa de rebanado 22. El espesor de cada rebanada de papa en la etapa de rebanado 22 es dependiente del deseo del espesor del producto final. Un ejemplo en la técnica anterior involucra rebanar las papas aproximadamente 0.053 pulgadas de espesor. Estas rebanadas se transportan luego a una etapa de lavado 23, en donde la

825

superficie de almidón en cada rebanada se remueve con agua. Las rebanadas de papas lavadas se transportan luego a una etapa de cocción 24. Esta etapa de cocción 24 involucra típicamente freír las rebanadas en una freidora continua a, 173°C durante aproximadamente 5 minutos. La etapa de cocción reduce generalmente el nivel de humedad del trozo de al menos el 2% en peso. Por ejemplo, un trozo de papa típico sale de la freidora en aproximadamente 1.4% de humedad por peso. Los trozos de papa cocinados se transportan luego a una etapa de razonamiento 25, en donde se aplica el razonamiento en un tambor de rotación. Finalmente, los trozos sazonados proceden a una etapa de empaque 26. Esta etapa de empaque 26 involucra usualmente alimentar con las papas sazonadas uno o más dispositivos de pesado que dirigen luego los trozos a una o más máquinas de forma vertical, llenado, y sellado para empaque en un empaque flexible. Una vez empacado el producto va a distribución y se compra por el consumidor.

Ajustes menores en un número de etapas de procesamiento de trozos de papa descritos anteriormente pueden resultar en cambios significativos en las características del producto final. Por ejemplo, un tiempo de residencia extendido de las rodajas en agua en la etapa de lavado 23 puede resultar en escape de compuestos de las rodajas que suministra el producto final con un sabor, color y textura de papa. Los tiempos de residencia incrementados o altas temperaturas en la etapa de cocción 24 pueden resultar en un incremento en los niveles de oscurecimiento Maillard en el trozo, así como también un menor contenido de humedad. Sí es deseable incorporar ingredientes dentro de las rodajas de papa antes de freírlas, puede ser necesario establecer mecanismos que

proporcionen la absorción de los ingredientes agregados dentro de las porciones interiores de las rodajas sin interrumpir la estructura celular del trozo o escapar los compuestos benéficos de las rodajas.

Por vía de otro ejemplo de productos alimenticios calentados que representan cambios únicos para reducir los niveles de acrilamida en los productos finales, también se pueden hacer pasabocas a partir de una pasta. El término "pasabocas fabricado" significa un alimento pasaboca que utiliza como su ingrediente de partida algo diferente del material de partida original almidonado no alterado. Por ejemplo, los pasabocas fabricados, incluyen trozos de papas fabricados que usan un producto de papa deshidratado como un material de partida y trozos de maíz que utilizan harina de masa como su material de partida. Es de notar aquí que el producto de papa deshidratado puede ser harina de papa, hojuelas de papa, gránulos de papa, u otras formas en que exista la papa deshidratada. Cuando cualquiera de estos términos se utiliza en esta solicitud, se entiende que todas estas variaciones se incluyen.

Con referencia de nuevo a la figura 2, un trozo de papa fabricado no requiere la etapa de pelado 21, la etapa de pelado 22, o la etapa de lavado 23. En cambio, los trozos de papa fabricados inician con, por ejemplo, hojuelas de papa, que se mezclan con agua y otros ingredientes menores para fabricar una pasta. Esta pasta luego se lamina y se corta antes de proceder a una etapa de cocción. La etapa de cocción puede involucrar freír u hornear. Los trozos luego proceden a una etapa de razonamiento y una etapa

de empaque. La mezcla de la pasta de papa generalmente ~~le~~ confiere en si misma la adición fácil de otros ingredientes. Por el contrario, la adición de tales ingredientes a un producto alimenticio de materia prima, tal como rodajas de papa, requiere que un mecanismo se encuentre para permitir la preparación de ingredientes dentro de la estructura celular del producto. Sin embargo, la adición de cualquier ingrediente en la etapa de mezclado se debe hacer con la consideración de que los ingredientes pueden afectar adversamente las características de laminado de la pasta, así como también las características finales del trozo.

Sería deseable desarrollar uno o más métodos para reducir el nivel de acrilamida en el producto final de alimentos procesados térmicamente o calentados. En forma ideal, tal un proceso debe reducir sustancialmente o eliminar la acrilamida en el producto final sin afectar adversamente la calidad y características del producto final. Adicionalmente, el método debe ser fácil de implementar y, preferiblemente, agregar poco o ningún costo al proceso general.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención propuesta involucra la reducción de acrilamida en los productos alimenticios. En el proceso de la invención, se utiliza un agente reductor para magnificar el efecto de un agente reductor de acrilamida que tiene un tiol libre, tal como cisteína. En un aspecto, la cisteína se utiliza como un agente reductor de acrilamida en conjunto con un agente reductor tal

como ácido ascórbico, cloruro estañoso, sulfito de sodio o metabisulfito de sodio.

El agente reductor puede magnificar la efectividad de un agente reductor de acrilamida que tiene un tiol libre, minimizando por lo tanto la pérdida de sabor que puede ser evidente con mayores niveles de agentes reductores de acrilamida. Por lo tanto la presente invención suministra medios para mejorar la calidad y características del producto final. Adicionalmente, tal un método para la reducción de acrilamida es generalmente fácil de implementar. Lo anterior así como también las características adicionales y ventajas de la presente invención serán evidentes en la siguiente descripción detallada escrita.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características novedosas de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas. La invención en sí misma, sin embargo, así como también una forma preferida de uso, objetivos adicionales y ventajas de estos se entenderán mejor como referencia a la siguiente descripción detallada de las modalidades ilustrativas cuando se lean en conjunto con los dibujos acompañantes, en donde:

La figura 1 ilustra una simplificación de la ruta sospechadas para la formación de acrilamida partiendo de asparagina y glucosa.

La figura 2 ilustra los métodos de la técnica anterior bien conocidos para elaborar trozos de papa frita a partir de materia prima de papa.

La figura 3A y 3B ilustran métodos para elaborar un alimento pasabola fabricado de acuerdo con dos modalidades separadas de la invención.

La figura 4 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida en una serie de ensayos en los que se agrega cisteína y glicina.

La figura 5 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida encontrados en una serie de ensayos en el que se combina CaCl_2 con ácido fosfórico o ácido cítrico.

La figura 6 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida encontrados en una serie de ensayos en el que se agrega ácido fosfórico y CaCl_2 a hojuelas de papa que tienen varios niveles de azúcares reductores.

La figura 7 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida encontrados en una serie de ensayos en el que se agrega ácido fosfórico y CaCl_2 a hojuelas de papa.

La figura 8 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida encontrados en una serie de ensayos en el que se agrega ácido cítrico y CaCl_2 a la mezcla de trozos de maíz.

La figura 9 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida encontrados en trozos de papa fabricados con cisteína, cloruro de calcio, y también ácido fosfórico o ácido cítrico.

La figura 10 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida encontrados en trozos de papa cuando se agrega ácido fosfórico y cloruro de calcio en la etapa de elaboración de hojuelas o la etapa de fabricación de trozos.

La figura 11 ilustra gráficamente el efecto de la asparagina y la amortiguación en el nivel de acrilamida en trozos de papa.

La figura 12 ilustra gráficamente los niveles de acrilamida encontrados en trozos de papa freídos en aceite que contiene romero.

La figura 13 ilustra gráficamente el efecto de la adición de un agente oxidante o de un agente reductor con un agente reductor de acrilamida que tiene un tiol libre.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La formación de acrilamida en los alimentos procesados térmicamente requieren una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno. Se hipotetiza que el carbono se suministra mediante una fuente de carbohidrato y el nitrógeno se suministra mediante una fuente de proteína o aminoácido. Muchos ingredientes alimenticios derivados de plantas tal como arroz, trigo, maíz, cebada, soya, papa y avena contienen asparagina y son

A
91

principalmente carbohidratos que contienen menores contenidos de aminoácidos. Típicamente, tales ingredientes alimenticios tienen un pequeño grupo de aminoácidos que contienen otros aminoácidos en adición a la asparagina.

Por "procesado térmicamente" significa alimento o ingrediente alimenticio en donde los componentes del alimento, tal como mezcla de ingredientes alimenticios, se calientan a temperaturas de al menos 80°C. Preferiblemente el procesamiento térmico del alimento o ingredientes de alimentos tiene lugar a temperaturas entre aproximadamente 100°C y 205°C. El ingrediente alimenticio puede ser procesado separadamente a temperaturas elevadas antes de la formación del producto alimenticio final. Un ejemplo de un ingrediente alimenticio procesado térmicamente son las hojuelas de papa, que se forma a partir de materia prima de papas en un proceso que expone la papa a temperaturas tan altas como 270°C. (los términos "hojuelas de papas" "gránulos de papa" y "harina de papas" se utilizan intercambiabilmente aquí, y significan que denotan cualquier producto deshidratado basado en papa. Ejemplos de otros ingredientes alimenticios procesados térmicamente incluyen avena procesada, arroz seco y hervido, productos de soya cocidos, masa de maíz, granos de café tostado y granos de cacao tostado. Alternativamente los ingredientes de productos alimenticios de materia prima se pueden utilizar en la preparación de productos alimenticios finales en donde la producción del producto alimenticio final incluye una etapa de calentamiento térmico. Un ejemplo del procesamiento de materia prima en donde el producto alimenticio final resulta de una etapa de calentamiento es la fabricación de trozos de papa a partir de

rodajas de papa de materia prima mediante la etapa de freír a una temperatura de aproximadamente 100°C a aproximadamente 205°C o la producción de papas a la francesa freídas a temperaturas similares.

Efecto de los aminoácidos sobre la formación de acrilamida

De acuerdo con la presente invención, sin embargo se ha encontrado que una formación significativa de acrilamida puede ocurrir cuando el aminoácido asparagina se calienta en la presencia de un azúcar reductor. Calentar otros aminoácidos tales como lisina y alanina en la presencia de un grupo reductor tal como glucosa no conduce a la formación de acrilamida, pero sorprendentemente, la adición de otros aminoácidos a la mezcla de azúcar-asparagina puede incrementar o reducir la cantidad de acrilamida formada.

Habiendo establecido la formación rápida de acrilamida cuando se calienta la asparagina en la presencia de un azúcar reductor, se puede alcanzar una reducción de la acrilamida en alimentos procesados térmicamente al inactivar la asparagina. Por "inactivación" se significa la remoción de la asparagina a partir del alimento o presentar la asparagina no reactiva junto a la ruta de formación de acrilamida por medio de conversión o unión a otro químico que interfiere con la formación de acrilamida a partir de asparagina.

I. Efecto de cisteína, Lisina, Glutamina y Glicina en la formación de Acrilamida.

En relación que la asparagina reacciona con la glucosa para formar acrilamida que incrementa la concentración de otros aminoácidos libres, puede afectar la reacción entre la asparagina con glucosa y reducir la formación de acrilamida. Para este experimento, se prepara una solución de asparagina (0.176%) y glucosa (0.4%) en amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0. Otros cuatro aminoácidos, glicina (GLI), lisina (LIS), glutamina (GLN), y cisteína (CIS) se agregan en la misma concentración como la glucosa sobre una base molar. El diseño experimental es completamente factorial sin la replicación de tal forma que se prueban todas las combinaciones posibles de aminoácidos agregados. Las soluciones se calientan a 120°C a 40 minutos antes de medir la acrilamida. La tabla 1 adelante muestra la concentración y los resultados.

	Glucosa	ASN	GLY	LIS	GLN	CIS	Acrilamida
Orden	%	%	%	%	%	%	Ppb
1	0.4	0.176	0	0	0	0	1679
2	0.4	0.176	0	0	0	0.269	4
3	0.4	0.176	0	0	0.324	0	5378
4	0.4	0.176	0	0	0.324	0.269	7
5	0.4	0.176	0	0.325	0	0	170
6	0.4	0.176	0	0.325	0	0.269	7
7	0.4	0.176	0	0.325	0.3245	0	1517
8	0.4	0.176	0	0.325	0.324	0.269	7
9	0.4	0.176	0.167	0	0	0	213
10	0.4	0.176	0.167	0	0	0.269	6
11	0.4	0.176	0.167	0	0.324	0	2033
12	0.4	0.176	0.167	0	0.324	0.269	4
13	0.4	0.176	0.167	0.325	0	0	161
14	0.4	0.176	0.167	0.325	0	0.269	4

9A

15	0.4	0.176	0.167	0.325	0.324	0	127
16	0.4	0.176	0.167	0.325	0.324	0.269	26

Tabla 1: Efecto de Cisteína, Lisina, Glutamina y Glicina en la formación de Acrilamida

Como se muestra en la tabla anterior, la glucosa y la asparagina sin ningún otro aminoácido forma acrilamida 1679 ppb. Los aminoácidos agregados tienen tres tipos de efectos.

1) La cisteína casi elimina la formación de acrilamida. Todos los tratamientos con cisteína tienen menos de 25 ppb de acrilamida (una reducción del 98%).

2) La lisina y glicina reducen la formación de acrilamida pero no tanto como la cisteína. Todos los tratamientos con lisina y/o glicina, pero sin glutamina y cisteína tienen menos de 220 ppb de acrilamida (una reducción del 85%).

3) Sorprendentemente, la glutamina incrementa la formación a 5378 ppb (200% de incremento). La glutamina más cisteína no forman acrilamida. La adición de glicina y lisina a glutamina reduce la formación de acrilamida.

Estos ensayos muestran la efectividad de la cisteína, lisina y glicina en reducir la formación de acrilamida. Sin embargo, los resultados de la glutamina demuestran que no todos los aminoácidos son efectivos en reducir la formación de acrilamida. La combinación de cisteína, lisina, o glicina con un aminoácido que solo puede acelerar la formación de acrilamida (tal como

glutamina) pueden de igual manera reducir la formación de acrilamida (tales como glutamina) pueden similarmente reducir la formación de acrilamida.

II. Efecto de la cisteína, lisina, glutamina, y Metionina a diferentes concentraciones y temperaturas.

Como se reportó anteriormente, la cisteína y lisina reducen la acrilamida cuando se agrega en la misma concentración como glucosa. Se diseña un experimento para responder a las siguientes preguntas:

- 1) Cómo reducir las concentraciones de cisteína, lisina, glutamina, y metionina que afectan la formación de acrilamida?
- 2) Son los efectos de lisina y cisteína agregadas iguales cuando la solución se calienta a 120°C y 150°C?

Una solución de asparagina (0.176%) y glucosa (0.4%) se prepara en amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0. Dos concentraciones de aminoácido (cisteína (CYS), lisina (LYS), glutamina (GLN), o metionina (MET) se agregan. Las dos concentraciones son 0.2 y 1.0 moles de aminoácido por mol de glucosa. En la mitad de los ensayos, dos ml de las soluciones fueron calentadas a 120°C por 40 minutos; en la otra mitad, 2 ml se calientan a 150°C durante 15 minutos. Después de calentar, se mide la acrilamida mediante GC-MS, con los resultados mostrados en la tabla 2. El control es solución de asparagina y glucosa sin agregar aminoácido.

00027

Aminoácido/ Temperatura	Nivel de Acrilamida				
	Control	Aminoácido @ Conv. 0.2	Porcentaje de control	Aminoácido @ Conv. 1.0	Porcentaje de control
LYS-120°C	1332 ppb	1109 ppb	83%	280 ppb	21%
CYS-120°C	1332 ppb	316 ppb	24%	34 ppb	3%
LYS-150°C	3127 ppb	1683 ppb	54%	536 ppb	17%
CYS-150°C	3127 ppb	1146 ppb	37%	351 ppb	11%
GLN-120°C	1953 ppb	4126 ppb	211%	6795 ppb	348%
MET-120°C	1953 ppb	1978 ppb	101%	1132 ppb	58%
GLN-150°C	3866 ppb	7223 ppb	187%	9516 ppb	246%
MET-150°C	3866 ppb	3885 ppb	100%	3024 ppb	78%

Tabla 2: Efectos de Temperatura y Concentración de Aminoácidos sobre el nivel de acrilamida.

En los ensayos con cisteína y lisina, un control formado de 1332 ppb de acrilamida después de 40 minutos a 120°C, y 3127 de acrilamida después de 15 minutos a 150°C. La cisteína y lisina reducen la formación de acrilamida a 120°C y 150°C, con la reducción de acrilamida que es aproximadamente proporcional a la concentración de cisteína o lisina agregada.

En los ensayos con glutamina y metionina, un control forma 1953 ppb de acrilamida después de 40 minutos a 120°C y un control forma 3866 ppb de acrilamida después de 15 minutos a 150°C. La glutamina incrementa la formación de acrilamida a 120°C y 150°C. la metionina en 0.2 mol/mol de glucosa no afecta la formación de acrilamida. La metionina en 1.0 mol/mol de glucosa reduce la formación de acrilamida por menos del cincuenta por ciento.

ppb/

III. Efecto de Diecinueve aminoácidos sobre la formación de acrilamida en Glucosa y solución de asparagina

El efecto de cuatro aminoácidos (lisina, cisteína, metionina, y glutamina) en la formación de acrilamida se describió anteriormente. Se ensayan quince aminoácidos adicionales. Una solución de asparagina (0.176%) y glucosa (0.4%) se prepara en amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0. Se agregan quince aminoácidos a la misma concentración como glucosa en una base molar. El control contiene asparagina y solución de glucosa sin ningún otro aminoácido. Las soluciones se calientan a 120°C por 40 minutos antes de medir la acrilamida mediante GC-MS. Los resultados son dados en la tabla 3 siguiente.

	Acrilamida formada	
	ppb	% de control
Control		
Aminoácido	959	100
Histidina	215	22
Alanina	478	50
Metionina	517	54
Ácido glutámico	517	54
Acido aspártico	529	55
Prolina	647	67
Fenilalanina	648	68
Valina	691	72
Arginina	752	78
Triptófano	1059	111
Treonina	1064	111
Tirosina	1091	114
Leucina	1256	131
Serina	1296	135
Isoleucina	1441	150

89/

Tabla 3: Efecto de otros aminoácidos en la formación de acrilamida

Como se ve en la tabla anterior, ninguno de los quince aminoácidos adicionales son tan efectivos como la cisteína, lisina, o glicina en la formación de la reducción de acrilamida. Nueve de los aminoácidos adicionales reducen la acrilamida a un nivel entre 22-78% de control, mientras seis aminoácidos incrementan la acrilamida entre un nivel de 111-150% de control.

La tabla 4 siguiente resume los resultados para todos los aminoácidos, lista los aminoácidos en el orden de su efectividad. La cisteína, lisina, y glicina fuero inhibidores efectivos, con la cantidad de acrilamida formada menor del 15% de aquella formada en el control. Los siguientes nueve aminoácidos son inhibidores menos efectivos, que tienen una formación de acrilamida total entre 22-78% de aquella formada en el control. Los siguientes siete aminoácidos incrementan la acrilamida. La glutamina origina el mayor incremento de acrilamida, que muestra el 320% de control.

Aminoácido	Acrilamida producida como % de Control
Control	100%
Cisteína	0%
Lisina	10%
Glicina	13%
Histidina	22%
Alanina	50%
Metionina	54%
Acido glutámico	54%

60077

Acido aspártico	55%
Prolina	67%
Fenilalanina	68%
Valina	72%
Arginina	78%
Triptofano	111%
Treonina	111%
Tirosina	114%
Leucina	131%
Serina	135%
Isoleucina	150%
Glutamina	320%

Tabla 4: Formación de Acrilamida en la presencia de 19 aminoácidos

IV. Hojuelas de papa con 750 ppm de L-Cisteína agregada

Las hojuelas de papa de ensayo se fabrican con 750 ppm (partes por millón) de L-cisteína agregada. Las hojuelas de papa de control no contienen L-cisteína agregada. Tres gramos de hojuelas de papa se pesan en un frasco de vidrio. Después de tapar herméticamente, se calientan los frascos durante 15 minutos o 40 minutos a 120° C. Se mide la acrilamida por GC-MS en partes por billón (ppb).

Hojuelas de papa	Acrilamida (ppb) 15 mi a 120°C	Reducción de Acrilamida 15 min	Acrilamida (ppb) 40 min a 120°C	Reducción de Acrilamida 40 min
Control	1662	--	9465	--
750 ppm cisteína	653	60%	7529	20%

n. 00177

Tabla 5: Reducción de Acrilamida sobre el tiempo con cisteína

V. Trozos de Papa Fabricados Horneados

Dados los anteriores resultados, las modalidades preferidas de la invención se han desarrollado en la cual la cisteína o lisina se agrega a la fórmula para un producto pasabola fabricado, en este caso trozos de papa fabricados horneados. El proceso de elaboración de este producto se muestra en la figura 3A. En una etapa de preparación de pasta 30, las hojuelas de papa, agua, y otros ingredientes se combinan para formar una pasta (los términos "hojuelas de papa" y "harina de papa" se utilizan intercambiabilmente aquí y están destinadas a abarcar todas las preparaciones y en polvo u hojuelas secas, sin tener en cuenta el tamaño de partículas. En una etapa de la nominación 31, la pasta se pasa a través de un laminador, que aplana la pasta y luego la corta en piezas discretas. En una etapa de cocción 32, las piezas de corte se hornean hasta que alcanzan un contenido de agua y color específico. Los trozos resultantes luego se sazonan en una etapa de razonamiento 33 y se colocan en empaques en una etapa de empaque 34.

Una primera modalidad de la invención se demuestra por el uso del proceso descrito anteriormente. Para ilustrar esta modalidad, se hace una comparación entre una tanda de ensayo y de control a la que se agregan una de tres concentraciones de cisteína o una concentración de lisina.

0377

Ingrediente		Control	Cisteína # 1	Cisteína # 2	Cisteína # 3	Lisina
Hojuelas de papa & almidón modificado (g)		5496	5496	5496	5496	5496
Azúcar (g)		300	300	300	300	300
Aceite (g)		90	90	90	90	90
Agentes de fermentación (g)		54	54	54	54	54
Emulsificador (g)		60	60	60	60	60
L- cisteína disuelto en agua (g)		0	1.8	4.2	8.4	0
Monoclorhidrato L-lisina (g)		0	0	0	0	42
Total seco (g)		6000	6001.8	6004.2	6008.4	6042
Agua (ml)		3947	3947	3947	3947	3947
Mediciones después de cocción de trozos						
H2O, %		2.21	1.73%	2.28	2.57	2.68
Aceite, %		1.99	2.15%	2.05	2.12	1.94
Acrilamida (ppb)		1030	620	166	104	456
Color	L	72.34	76.53	79.02	78.36	73.2
	A	1.99	- 1.14	-2.02	-2.14	1.94
	B	20.31	25.52	23.2	23.0	25.77

Tabla 6: Efectos de Lisina y Varios niveles de Cisteína en el nivel de Acrilamida

En todas las tandas, los ingredientes secos se mezclan juntos, luego se agrega el aceite a cada mezcla seca y se mezcla. La cisteína o lisina se disuelve en el agua antes de agregar a la pasta. El nivel de humedad de la pasta antes de laminación es de 40% a 45% por peso. La pasta se lamina para producir un espesor

¹Se espera que el isómero D o una mezcla racémica de ambos isómeros del D y L de los aminoácidos pueda ser igualmente efectiva, aunque el isómero L parece ser el mejor y la fuente menos costosa.

entre 0.020 y 0.030 pulgadas, cortado en piezas de tamaño de trozo y horneadas.

Después de cocción, se desarrolla el ensayo para humedad, aceite, y color de acuerdo con la escala Hunter L-A-B. Las muestras se ensayan para obtener niveles de acrilamida en el producto terminado. La tabla 6 anterior muestran los resultados de estos análisis.

En los trozos de control, el nivel de acrilamida después de la cocción final es 1030 ppb. La adición de cisteína, en todos los niveles ensayados, y la lisina reduce significativamente el nivel de acrilamida final. La figura 4 muestra los niveles de acrilamida resultantes en forma gráfica. En este dibujo, el nivel de acrilamida detectado en cada muestra se exhibe por una barra sombreada 402. Cada barra tiene una marca que lista el ensayo apropiado por debajo y se calibra con la escala para acrilamida en la izquierda del dibujo. También se muestra para cada ensayo el nivel de humedad producido por el trozo, visto como un punto único 404. Los valores para los puntos 404 se calibran a la escala por porcentaje de humedad mostrado a la derecha del dibujo. La línea 406 conecta los puntos individuales 404 para mayor visibilidad. Debido al efecto marcado de reducción de humedad en el nivel de acrilamida, es importante tener un nivel de humedad con el fin de evaluar apropiadamente la actividad de cualquier agente reductor de acrilamida. Como se utiliza aquí, un agente reductor de acrilamida es un aditivo que reduce el contenido de acrilamida.

103

11/

La adición de cisteína o lisina a la pasta reduce significativamente el nivel de acrilamida presente en el producto terminado. Las muestras de cisteína muestran que el nivel de acrilamida se reduce en aproximadamente en una proporción directa a la cantidad de cisteína agregada. Se debe hacer consideración, sin embargo, para los efectos colaterales en las características (tales como color, sabor, y textura) del producto final de la adición de un aminoácido al proceso de fabricación.

Ensayos adicionales también se ejecutan, utilizando lisina, cisteína agregada, y combinaciones de cada uno de los dos aminoácidos con CaCl_2 . Estos ensayos utilizan el mismo procedimiento como se describió en los ensayos anteriores, pero utilizan hojuelas de papas que tienen niveles de papa que tienen niveles variantes de azúcares reductores y cantidades variantes de aminoácidos y CaCl_2 agregados. En la tabla 7 adelante, el lote 1 de hojuelas de papa tiene 0.81% de azúcares reductores (esta porción de la tabla reproduce los resultados del ensayo mostrado anteriormente), el lote 2 tiene el 1.0% y el lote 3 tiene 1.8% de azúcares reductores.

% de azúcar reductor	% de peso total seco de CaCl_2	Cisteína ppm de total seco	% de lisina total seco	% en peso de H_2O terminado	Valor color terminado	Acrilamida ppb
0.81	0	0	0	2.21	72.34	1030
0.81	0	300	0	1.73	76.53	620
0.81	0	700	0	2.28	79.02	166
0.81	0	1398	0	2.57	78.36	104
0.81	0	0	0.685	2.68	73.20	456
1.0	0	0	0	1.71	72.68	599

2011

1.0	0	0	0	1.63	74.44	1880
1.0	0	0	0	1.69	71.26	1640
1.0	0	0	0	1.99	71.37	1020
1.0	0	700	0	2.05	75.81	317
1.0	0.646	0	0.685	1.74	73.99	179
1.8	0	0	0	1.80	73.35	464
1.8	0	0	0	1.61	72.12	1060
1.8	0	700	0	1.99	75.27	290
1.8	0	1398	0	1.96	75.87	188
1.8	0	0	0.685	1.90	76.17	105
1.8	0.646	0	0.685	2.14	75.87	47
1.8	0.646	700	0	1.83	77.23	148

Tabla 7: Efecto de variación de concentración de cisteína, Lisina, Azúcares reductores

Como se muestra por los datos en esta tabla, la adición de cisteína o lisina, suministra mejora significativa en el nivel de acrilamida a cada nivel de azúcares reductores ensayados. La combinación de lisina con cloruro de calcio suministra una eliminación casi total de la acrilamida producida, a pesar del hecho de que este ensayo se corre con el nivel mayor de azúcares reductores.

VI: Ensayos en Trozos de Papa Fritos Rebanados

Un resultado similar se puede alcanzar con trozos de papa hechos de rodajas de papa. Sin embargo, el aminoácido deseado no se puede mezclar simplemente con las rodajas de papa, como con las modalidades ilustradas anteriormente, en razón a que esto podría destruir la integridad de las rodajas. En una modalidad, las rodajas de papa se sumergen en una solución acuosa que contiene

el aditivo de aminoácido deseado durante un periodo de tiempo suficiente para permitir al aminoácido migrar en la estructura celular de las rodajas de papa. Esto se puede hacer, por ejemplo, durante la etapa de lavado 23 ilustrado en la figura 2.

La tabla 8 siguiente muestra los resultados de agregar un porcentaje en peso de cisteína al tratamiento de lavado que se describe en la etapa 23 de la figura 2 anterior, todos los lavados son a temperatura ambiente durante el tiempo indicado. Los tratamientos de control no agregan nada al agua. Los trozos se frien en aceite de semilla de algodón a 178°C durante el tiempo indicado.

	Tiempo de freído (segundos)	% en peso de H2O terminado	% en peso de aceite terminado	Acrilamida terminada
Control-2-3 min lavado	140	1.32%	42.75%	323 ppb
1% cisteína-15 min lavado	140	.86%	45.02%	239 ppb
Control-2-3 min lavado	110	1.72%	40.87%	278 ppb
Control-15 min lavado	110	1.68%	41.02%	231 ppb
1% cisteína-15 min lavado	110	1.41%	44.02%	67 ppb

Tabla 8: Efecto de Cisteína en Lavado con Agua de rodajas de papa sobre Acrilamida

Como se muestra en esta tabla, sumergir rodajas de papa de 0.53 pulgadas de espesor por 15 minutos en una solución acuosa que

contiene una concentración de un porcentaje en peso de cisteína es suficiente para reducir el nivel de acrilamida del producto final en el orden de 100-200 ppb.

La invención también se ha demostrado al agregar cisteína a la pasta de maíz (o masa) para trozos de tortilla. La L-cisteína disuelta se agrega para maíz cocido durante el proceso de molido de tal forma que la cisteína se distribuye uniformemente en la masa producida durante el molido. La adición de 600 ppm de L-cisteína reduce la acrilamida de 190 ppb en el producto de control a 75 ppb tratado con L-cisteína.

Cualquier número de aminoácidos se puede utilizar con la invención descrita aquí, mientras que se hacen ajustes para los efectos colaterales de los ingredientes adicionales, tal como cambios al color, sabor, y la textura del alimento. Aunque todos los ejemplos muestran la utilización de los α aminoácidos (cuando los grupos $-NH_2$ se adhieren al átomo de carbono alfa), los solicitantes anticipan que otros isómeros, tal como aminoácidos β o γ también se pueden utilizar, aunque los aminoácidos β y γ no se utilizan comúnmente como aditivos alimenticios. La modalidad preferida de esta invención utiliza cisteína, lisina, y/o glicina. Sin embargo, otros aminoácidos, tales como histidina, alanina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, fenilalanina, valina, y arginina también pueden ser usados. Tales aminoácidos, y en particular cisteína, lisina, histidina, y glicina son relativamente económicos y utilizados comúnmente como aditivos alimenticios. Estos aminoácidos preferidos se pueden utilizar solos o en combinación con el fin de reducir la cantidad

107
de acrilamida en el producto alimenticio final. Adicionalmente, los aminoácidos se pueden agregar a un producto alimenticio antes de calentar por vía de agregar el aminoácido disponible comercialmente al material de partida al producto alimenticio o agregar otro ingrediente alimenticio que contiene un alto nivel de concentración del aminoácido libre. Por ejemplo, la caseína contiene lisina y gelatina que contiene glicina libre. Así, cuando el solicitante indica que un aminoácido se agrega a una formulación alimenticia, se entenderá que el aminoácido se puede agregar como un aminoácido disponible comercialmente o como un alimento que tiene una concentración de aminoácidos libres que es mayor que el nivel de ocurrencia natural de asparagina en el alimento.

La cantidad de aminoácido que se debe agregar al alimento con el fin de reducir los niveles de acrilamida a un nivel aceptable se pueden expresar en varias formas. Con el fin de ser comercialmente aceptables, la cantidad de aminoácido agregada debe ser suficiente para reducir el nivel final de acrilamida por lo menos al veinte por ciento (20%) como se compara con un producto que no se trata. Más particularmente, el nivel de producción de acrilamida se debe reducir mediante una cantidad en el rango de treinta y cinco a noventa y cinco por ciento (35 a 95%). Aún más preferiblemente, el nivel de producción de acrilamida se debe reducir mediante una cantidad en el rango de cincuenta a noventa y cinco por ciento (50-95%). En una modalidad preferida que utiliza cisteína, se ha determinado que la adición de al menos 100 ppm puede ser efectiva en la reducción de acrilamida. Sin embargo, un rango preferido de adición de

- 02/11

cisteína está entre 100 ppm y 10000 ppm, con el rango más preferido en la cantidad de aproximadamente 1000 ppm. En modalidades preferidas que utilizan otros aminoácidos efectivos, tal como lisina y glicina, una proporción de mol del aminoácido agregado al azúcar reductor presente en el producto de al menos 0.1 mol de aminoácido a un mol de azúcar reductor (0.1:1) se ha encontrado que es efectivo en la reducción de la formación de acrilamida. más preferiblemente el índice molar de aminoácido agregado a los azúcares reductores debe estar entre 0.1:1 a 2:1, con una proporción más preferible de aproximadamente 1:1.

Los mecanismos mediante los cuales los aminoácidos seleccionados reducen la cantidad de acrilamida encontrada no se conocen actualmente. Mecanismos posibles incluyen la competición para reactivos y dilución del precursor, que creará menos acrilamida, y un mecanismo de reacción con acrilamida para reducirla. Mecanismos posibles incluyen (1) inhibición de la reacción Maillard (2) consumo de glucosa y otros azúcares reductores, (3) reacción con acrilamida. La cisteína con un grupo tiol libre, actúa como un inhibidor de la reacción Maillard. En razón a que la acrilamida se considera que se forma a partir de asparagina por la reacción Maillard, la cisteína debe reducir la rata de reacción Maillard y la formación de acrilamida. La lisina y glicina reaccionan rápidamente con la glucosa y otros azúcares reductores. Si la glucosa se consume por la lisina y la glicina habrá menos glucosa para reaccionar con la asparagina para formar acrilamida. El grupo amino de aminoácidos puede reaccionar con el doble enlace de acrilamida, una adición Michael. El tiol libre de

la cisteína también puede reaccionar con el doble enlace de acrilamida.

Se debe entender que cambios adversos en las características del producto final, tal como cambios en color, sabor, y textura se deben originar por la filtración de un aminoácido. Estos cambios en las características del producto de acuerdo con esta invención se pueden compensar por otros varios medios. Por ejemplo, características del color en trozos de papa se pueden ajustar al controlar la cantidad de azúcares en el producto de partida. Algunas características de sabor se pueden cambiar por la adición de varios agentes saborizantes al producto final. La textura física del producto se puede ajustar, por ejemplo, mediante la adición de agentes de fermentación o varios emulsificadores.

Efecto de Cationes Di- y Trivalentes en la formación de Acrilamida.

Otra modalidad de la invención involucre reducir la producción de acrilamida por la adición de un catión divalente o trivalente a una fórmula para un alimento pasabola antes de cocinar o procesar térmicamente ese alimento pasabola. Los químicos entenderán que los cationes no existen en aislamiento, sino que se encuentran en presencia de un anión que tiene la misma valencia aunque se hace referencia aquí a la sal que contiene el catión bivalente o trivalente, este es el catión presente en la sal que se cree suministra una reducción de acrilamida al reducir la solubilidad como asparagina en agua. Estos cationes también se refieren aquí como un catión con una valencia de al menos dos. De forma

interesante, los cationes de una valencia única no son efectivos en el uso con la presente invención. En la selección de un compuesto apropiado que contiene el catión que contiene una valencia de al menos dos en combinación con un anión, los factores relevantes son la solubilidad en agua, seguridad del alimento y alteración de las características del alimento particular. Las combinaciones de varias sales se pueden utilizar, aunque ellas se discuten aquí solo como sales individuales.

Los químicos hablan de la valencia de un átomo como una medición de su capacidad para combinarse con otros elementos. Específicamente, un átomo bivalente tiene la capacidad de formar dos enlaces iónicos con otros átomos, mientras que un átomo trivalente puede formar tres enlaces iónicos con otros átomos. Un catión es un ión cargado positivamente, esto es un átomo que tiene uno o más electrones, que le dan una carga positiva. Un catión bivalente o trivalente, entonces, es un ión cargado positivamente que tiene una disponibilidad para dos o tres enlaces iónicos respectivamente.

Los sistemas de modelo se pueden utilizar para probar los efectos de cationes bivalentes o trivalentes en la formación de acrilamida. Calentar la asparagina y la glucosa en proporciones de 1:1 mol pueden generar acrilamida. Comparaciones cuantitativas de contenido de acrilamida con o sin y sales agregadas mide la capacidad de la sal para promover o inhibir la formación de acrilamida. Se utilizan dos métodos de calentamiento y preparación de muestra. Un método involucra mezclar los componentes secos, agregar una cantidad igual de agua, y calentar

111
en un frasco tapado en forma floja. Los reactivos concentrados durante el calentamiento como la mayoría del agua escapada, duplicando las condiciones de cocción. Se pueden producir jarabes espesos o alquitranes, que complican la recuperación de la acrilamida. Estos ensayos se muestran en los ejemplos 1 y 2 adelante.

Un segundo método que utilizan recipientes de presión permite experimentos más controlados. Las soluciones de los componentes de prueba se combinan y calientan bajo presión. Los componentes de ensayo se pueden agregar en concentraciones encontradas en alimentos, y los amortiguadores pueden duplicar el pH de alimentos comunes. En estos ensayos, no escapa agua, simplificando la recuperación de la acrilamida, como se muestra en el Ejemplo 3 adelante.

I. Cationes Divalentes, Trivalentes Reducen la Acrilamida, Monovalente

Un frasco de vidrio de 20 mL (mililitros) que contiene monohidrato de L-asparagina (0.15 g, 1 mmol), glucosa (0.2 g, 1 mmol) y agua (0.1 mL) se cubre con una hoja de aluminio y se calienta en un horno de cromatografía de gas (GC) programado para calentar de 40° a 220°C en 20°/minuto, mantenido 2 minutos a 220°C, y enfriado de 220° a 40°C en 20°/min. El residuo se extrae con agua y se analiza para acrilamida utilizando espectroscopia de masa-cromatografía (GC-MS). El análisis encuentra aproximadamente 10,000 ppb (partes/billón) de acrilamida. Dos frascos adicionales que contienen monohidrato de L-asparagina

112

000000

(0.13 g, 1 mmol), glucosa (0.2 g, 1 mmol), cloruro de calcio anhidro (0.1 g, 1 mmol) y agua (0.4 mL) se calientan y analizan. El análisis encuentra 7 y 30 ppb de acrilamida, una reducción mayor del 99%.

Dados los resultados sorprendentes que la sal de calcio reduce fuertemente la formación de acrilamida, la solución adicional de sale se desarrolla e identifica cationes divalentes y trivalentes (magnesio, aluminio) ya que producen un efecto similar. Se nota que experimentos similares con cationes monovalentes, es decir 0.1/0.2 g de bicarbonato de sodio y carbonato de amonio (como el carbamato de amonio y el bicarbonato de amonio) incrementan la formación de acrilamida, como se ve en la Tabla 9 adelante.

Sal	Sal Micro Mol	Micromol de Acrilamida después de calentar, ppb
Ninguno (control)	0	9857
Bicarbonato de sodio	1200	13419
Carbonato de amonio	1250	22027
Carbonato de amonio	2500	47897

II. Cloruro de Calcio y Cloruro de Magnesio

En un segundo experimento, un ensayo similar a aquel descrito anteriormente se desarrolla, pero en cambio se utilizar cloruro de calcio anhidro, dos diluciones diferentes de cada uno de cloruro de calcio y cloruro de magnesio se utilizan. Frascos que contienen monohidrato de L-asparagina (0.15 g, 1 mmol) y glucosa (0.2 g, 1 mmol) se mezclan con uno de lo siguiente:

113

0.05/1/1

0.5 mL de agua (control),
0.5 mL 10% solución de cloruro de calcio (0.5 mmol),
0.05 mL 10% solución de cloruro de calcio (0.05 mmol) mas 0.45 mL de agua,
0.5 mL 10% solución de cloruro de magnesio (0.5 mmol), o
0.5 mL 10% solución de cloruro de magnesio (0.05 mmol) mas 0.45 mL de agua.

Se calientan muestras por duplicado y se analizan como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se promedian y se resumen en la Tabla 10 adelante:

ID de Sal	Micromoles agregadas Amt	Acrilamida formada Micromoles	Reducción de acrilamida
Ninguno (control)	0	408	0
Cloruro de calcio	450	293	27%
Cloruro de calcio	45	864	Ninguno
Cloruro de magnesio	495	191	53%
Cloruro de magnesio	50	2225	Ninguno

Tabla 10: Efecto del Cloruro de Calcio, Cloruro de Magnesio sobre la Acrilamida

III. Efecto de Amortiguación y pH

114

Como se mencionó anteriormente, éste ensayo no involucra la pérdida de agua del recipiente, pero se hace bajo presión reducida. Los frascos que contienen 2 mL de solución made amortiguada (15 mM de asparagina, 15 mM de glucosa, 500 mM de fosfato o acetato) y 0.1 mL de solución de sal (1000 mM) se calientan en una bomba Parr colocada en un horno de cromatografía programado para calentar de 40 a 150°C en 20°/minuto y se mantiene a 150°C durante 2 minutos. La bomba se remueve del horno y se enfría guante 10 minutos. Los contenidos se extraen con agua y se analizan para acrilamida siguiendo el método GC-MS- Para cada combinación de ph y amortiguador, un control se corre sin agregar sal, así como también con tres diferentes sales.

Los resultados de ensayos duplicados se promedian y se resumen en la Tabla 11 adelante:

Sal con Cati3n Divalente o Trivalente	pH	Amortiguador utilizado	Acrilamida Mcg		Reducci3n de Acrilamida
			Sal agregada	Control	
Cloruro de calcio	5.5	Acetato	337	550	19%
Cloruro de calcio	7.0	Acetato	990	1205	18%
Cloruro de calcio	5.5	Fosfato	154	300	49%
Cloruro de calcio	7.0	Fosfato	762	855	11%
Cloruro de magnesio	5.5	Acetato	380	550	16%
Cloruro de magnesio	7.0	Acetato	830	1205	31%
Cloruro de magnesio	5.5	Fosfato	198	300	34%
Cloruro de magnesio	7.0	Fosfato	773	855	10%
Sulfato de aluminio potasio	5.5	Acetato	205	550	31%

115

111

Sulfato de aluminio potasio	7.0	Acetato	453	1205	62%
Sulfato de aluminio potasio	5.5	Fosfato	64	300	79%
Sulfato de aluminio potasio	7.0	Fosfato	787	855	8%

Tabla 11: Efecto de pH y Amortiguador en la Reducción de Cationes

Divalentes/Trivalentes de Acrilamida

A través de las tres sales utilizadas, las más grandes reducción ocurren en acetato pH 7 y fosfato pH 5.5. Solo se encuentran pequeñas reducciones en acetato pH 5.5 y en fosfato pH 7.

IV. El Incremento de Cloruro de Calcio Reduce la Acrilamida

Siguiendo los resultados del sistema modelo, un ensayo de laboratorio a pequeña escala se corre en el cual se agrega cloruro de calcio a hojuelas de papa antes de calentar. 3 mL de 0.4%, 2% o 10% se solución de cloruro de calcio se agrega a 3g de hojuelas de papa. El control es 3 g de hojuelas de papa mezcladas con 3 mL de agua desionizada. Las hojuelas de mezclan para formar una pasta relativamente uniforme y luego se calientan en un frasco de vidrio sellado a 120°C durante 40 min. La acrilamida después de calentar se mide por GC-MS. Antes de calentar, las hojuelas de papa de control contienen 46 ppb de acrilamida. Los resultados se reflejan en la Tabla 4 adelante.

Mezcla ID	Acrilamida, ppb	Reducción Acrilamida
Control (agua)	2604	Ninguno
0.4% solución CaCl ₂	1877	28%

116
no 1/1

2% solución CaCl ₂	338	76%
10% solución CaCl ₂	86	97%

Tabla 12: Efecto de la Resistencia de la Solución de Cloruro de Calcio sobre la Reducción de Acrilamida

Dados los resultados anteriores, se conducen ensayos en los cuales una sal de calcio se agrega a la formula para un producto pasaboca fabricado, en éste caso trozos de papa fabricados horneados. El proceso de elaboración de los trozos de papa fabricados horneados consiste de las etapas mostradas en la Figura 3B. La etapa de preparación de la pasta 35 combina hojuelas de papa con agua, el par catión/anión (que en éste caso es cloruro de calcio) y otros ingredientes menores, que se mezclan vigorosamente para formar una pasta. (De nuevo, el término "hojuelas de papa" se destina aquí a abarca todas las hojuelas de papa secas, gránulos, o preparaciones en polvo, con respecto al tamaño de partícula). En la etapa de laminación/curado 36, la pasta se corre a través de un laminador, que aplana la pasta, y luego se corta en piezas individuales. En la etapa de cocción 37, las piezas formadas se cocinan a un color específico y contenido de agua. Los trozos resultantes se sazonan luego en la etapa de razonamiento 38 y se empacan en la etapa de empaque 39.

En un primer ensayo, dos tantas de trozos de papa fabricados se preparan y se cocinan de acuerdo con la receta dada en la Tabla 13; con la única diferencia entre las tantas que es la tanda de ensayo que contiene cloruro de calcio. En ambas tantas, los ingredientes de secado se mezclan primero juntos, luego el aceite

117
117

se agrega a cada mezcla seca y se mezcla. El cloruro de calcio se disuelve en el agua antes de agregar a la pasta. El nivel de humedad de la pasta antes de laminado es de 40% a 45% en peso. La pasta se plana para producir un espesor de entre 0.020 y 0.030 pulgadas, se corta en piezas de tamaño de trozo, y se hornean.

Después de cocción, se desarrolla una prueba para humedad, aceite y color de acuerdo con la escala Hunter L-a-b. Las muestras se ensayan para obtener niveles de acrilamida en el producto terminado.

La Tabla 13 adelante también muestra los resultados de éstos análisis.

Ingrediente	Control	Prueba CaCl ₂
Hojuelas de papa y almidón modificado (g)	5496	5496
Azúcar (g)	300	300
Aceite (g)	90	90
Agentes de fermentación (g)	54	54
Emulsificadores (g)	60	60
Cloruro de calcio (disuelto en agua) (g)	0	0
Mezcla seca total (g)	6000	6000
Agua (ml)	3947	3947
Pruebas desarrolladas después de Trozos Cocinados		
H ₂ O, %	2.21	2.58
Aceite, %	1.99	2.08
Acrilamida, ppb	1030	160

L	72.34	76.67
A	1.99	-.67
B	20.31	24.21

Tabla 13: Efecto del CaCl_2 en Acrilamida en Trozos

Como muestran estos resultados la adición de cloruro de calcio a la lasta en una proporción en peso de cloruro de calcio a hojuelas papa de aproximadamente 1 a 125 reduce significativamente el nivel de acrilamida presente en el producto terminado, reduciendo los niveles de acrilamida finales de 1030 ppb a 160 ppb. Adicionalmente, los porcentajes de aceite y agua en el producto final no parecen haber afectado por la adición de cloruro de calcio. Se nota, sin embargo, que el CaCl_2 puede originar cambios en el sabor, textura y color del producto dependiendo de la cantidad utilizada.

El nivel del catión divalente o trivalente que se agrega a un alimento para la reducción de acrilamida se puede expresar en un número de formas. Con el fin de ser comercialmente aceptable, la cantidad agregada debe ser suficiente para reducir el nivel final de producción de acrilamida por al menos 20% (20%). Mas preferiblemente, el nivel de producción de acrilamida se debe reducir por una cantidad en el rango de 35% a 95% (35-95%). Aún más preferiblemente, el nivel de producción de acrilamida se debe reducir por una cantidad en el rango de 50 a 95% (50-95%). Para expresar esto en una forma diferente, la cantidad de catión divalente o trivalente a ser agregado se puede dar como una proporción de moles de catión a los moles de la asparagina presente en el producto alimenticio. La proporción de moles de

449
110

cación divalente o trivalente a moles de asparagina libre debe ser de al menos 1 a 5 (1:5). Más preferiblemente, la proporción es al menos 1 a 3 (1:3), y más preferiblemente todavía, 1 a 2 (1:2). En la modalidad actualmente preferida, la proporción de moles de cationes a moles de asparagina está entre aproximadamente 1:2 y 1:1, en el caso del magnesio, que tiene menor efecto en el sabor del producto que el calcio, el índice molar del catión a asparagina puede ser tan alto como aproximadamente 2 a 1 (2:1).

Se hacen ensayos adicionales, utilizando el mismo procedimiento como se describió anteriormente, pero con diferentes lotes de hojuelas de papa, que contienen diferentes niveles de azúcares reductores y cantidades variantes de cloruro de calcio agregado. En la Tabla 14 adelante, los trozos que tienen 0.8% de azúcares reductores reproducen el ensayo mostrado anteriormente.

CaCl ₂	% de Azúcar Reductor	% de Humedad	Valor de Color L	Acrilamida ppb
0	1.8	2.21	72.34	1030
39	1.8	2.58	76.67	160
0	1.0	1.80	73.35	464
0	1.0	1.61	72.12	1060
17.5	1.0	1.82	74.63	350
39	1.0	2.05	76.95	80
39	1.0	1.98	75.86	192
0	1.8	1.99	71.37	1020
0	1.8	1.71	72.68	599
0	1.8	1.69	71.26	1640

120
n° 111

0	1.8	1.63	74.44	1880
39	1.8	1.89	76.59	148
39	1.8	1.82	75.14	275

Tabla 14: Efecto de CaCl_2 a través de Niveles Variantes de Catión
& Azúcares Reductores

Como se ve en esta tabla, la adición de CaCl_2 reduce consistentemente el nivel de acrilamida en el producto final, aún cuando la proporción en peso del CaCl_2 agregado a las hojuelas de papa es menor de 1:250.

Cualquier número de sales que forman un catión divalente o trivalente (o dicho de otra forma, produce un catión con una valencia de al menos dos) se puede utilizar con la invención descrita aquí, mientras que se hacen ajustes para los efectos colaterales de éste ingrediente adicional. El efecto de reducir el nivel de acrilamida parece derivar del catión divalente o trivalente, a diferencia del anión que se empareja con este. Las limitaciones al par catión/anión, de diferentes de valencia, se relacionan con su aceptabilidad en alimentos, tales como seguridad, solubilidad, y su efecto en el sabor, olor, apariencia, y textura. Por ejemplo, la efectividad del catión se puede relacionar directamente con su solubilidad. Sales altamente solubles, tales como aquella que comprenden acetato o aniones de cloruro, son aditivos más preferidos. Sales menos salobres, tal como aquellas sales que comprenden aniones de carbonato o dióxido se pueden hacer más solubles por la adición de ácido fosfórico o cítrico o al interrumpir la estructura celular, la estructura similar del alimento basado en almidón. Los cationes sugeridos

12"

incluyen calcio, magnesio, aluminio, hierro, cobre y zinc. Sales adecuadas de estos cationes incluyen cloruro de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio, malato de calcio, gluconato de calcio, fosfato de calcio, acetato de calcio, EDTA sodio calcio, glicerofosfato de calcio, hidróxido de calcio, lactobionato de calcio, óxido de calcio, propionato de calcio, carbonato de calcio, lactato estearoil calcio, cloruro de magnesio, citrato de magnesio, lactato de magnesio, malato de magnesio, gluconato de magnesio, fosfato de magnesio, hidróxido de magnesio, carbonato de magnesio, sulfato de magnesio, hexahidrato cloruro de aluminio, cloruro de aluminio, hidróxido de aluminio, alúmina amonio, alúmina potasio, alúmina sodio, sulfato de aluminio, cloruro férrico, gluconato ferroso, citrato de amonio férrico, pirofosfato férrico, fumarato ferroso, lactato ferroso, sulfato ferroso, cloruro cúprico, gluconato cúprico, sulfato cúprico, gluconato de zinc, óxido de zinc y sulfato de zinc. La modalidad actualmente preferida de esta invención utiliza cloruro de calcio, aunque se cree que los requerimientos se pueden cumplir mejor por una combinación de sales de uno o más de los cationes apropiados. Un número de sales, tal como sales de calcio, y en particular cloruro de calcio, son relativamente económicas y utilizadas comúnmente como alimentos. El cloruro de calcio se puede utilizar en combinación con el citrato de calcio, reduciendo por lo tanto los efectos de sabor colaterales del CaCl_2 . Adicionalmente, cualquier número de sales de calcio se pueden utilizar en combinación con o más sales de magnesio. Un experto en la técnica entenderá que la formulación específica de sales requeridas se pueden ajustar dependiendo del producto

122
122

alimenticio en cuestión y las características finales del producto deseadas.

Se debe entender que los cambios en las características del producto final, tal como cambios en color, sabor y consistencia se pueden ajustar por varios medios. Por ejemplo, las características de color en trozos de papa se pueden ajustar al controlar la cantidad de azúcares en el producto de partida. Algunas características de sabor se pueden cambiar por la adición de varios agentes saborizantes al producto final. La textura física del producto se puede ajustar, por ejemplo, mediante la adición de agentes de fermentación o varios emulsificadores.

Combinaciones de Agentes en la Elaboración de Pasta

En las modalidades detalladas anteriores de la invención, se hace énfasis en la reducción de la acrilamida originada por un único agente, tal como un catión divalente o trivalente o uno o varios aminoácidos, para reducir la cantidad de acrilamida encontrada en pasabocas cosidos. Otras modalidades de la invención involucran la combinación de varios agentes, tal como combinar cloruro de calcio con otros agentes para suministrar una reducción significativa de acrilamida sin alterar enormemente el sabor de los trozos.

I. Combinaciones de Cloruro de Calcio, Ácido Cítrico, Ácido Fosfórico

423
123

111

Los inventores han encontrado que los iones de calcio reducen más efectivamente el contenido de acrilamida en pH ácido. En el ensayo mostrado adelante, la adición de cloruro de calcio en la presencia de un ácido se estudia y compara con una muestra sólo con el ácido.

Ingrediente		Control	Ácido Fosfórico	Ácido Fosfórico & CaCl ₂	Ácido Cítrico & CaCl ₂
Hojuelas de papa/almidón modificado (g)		5490	5490	5490	5490
Azúcar		360	360	360	360
Aceite		90	90	90	90
Ácido Cítrico					30
Ácido Fosfórico			30	30	
CaCl ₂				30	30
Bicarbonato de sodio & fosfato de monocalcio		54			
Emulsificador (g)		60	60	60	60
Mezcla Seca Total (g)		6000	6000	6000	6000
Agua (mL)		3950	3950	3950	3950
% de Humedad		2.16	2.34	2.07	1.60
Color	L	67.69	71.39	72.70	73.27
	A	5.13	3.24	1.62	0.95
	B	26.51	26.91	26.05	26.24
Acrilamida (ppb)		1191	322	84	83

Tabla 15: Efecto de Combinar CaCl₂ con Ácido Fosfórico o Ácido Cítrico sobre Acrilamida

Como se ve en la Tabla 15 anterior, la adición de ácido fosfórico solo reduce la formación de acrilamida al 73% mientras que la adición de CaCl₂ y un ácido reduce el nivel de acrilamida al 93%.

La Figura 5 muestra estos resultados en forma gráfica. En éste dibujo, el nivel de acrilamida 502 del control es bastante alto (1191), pero cae significativamente cuando el ácido fosfórico solo se agrega, y se reduce aún cuando el cloruro de calcio y un ácido se agregan. Al mismo tiempo, los niveles de humedad 504 de los varios trozos permanecen en el mismo rango, aunque es algo menor en los trozos con agentes agregados. Así, se ha demostrado que el cloruro de calcio y un ácido pueden reducir efectivamente la acrilamida.

Se desarrollan ensayos adicionales utilizando cloruro de calcio y ácido fosfórico como aditivo a una pasta de papa. Se utilizan tres niveles diferentes de cloruro de calcio, que corresponden a 0%, 0.45% y 0.90% en peso de las hojuelas de papa. Estas se combinan con tres niveles diferentes de ácido fosfórico, que corresponden a 0%, 0.05%, o 0.1% de las hojuelas. Adicionalmente, los tres niveles de azúcar reductor en las hojuelas se ensayan, que corresponden 0.2%, 1.7%, y 2.07%, aunque no todas las combinaciones de éstos niveles se representan. Cada ensayo se mezcla en la pasta, se le da forma, y se cocina para formar trozos de papa. La temperatura de freído del aceite, el tiempo de freído, y el espesor de la hoja se mantienen constante a 350°F, 16 segundos, y 0.64 mm respectivamente. Para claridad, los resultados se presentan en tres tablas separadas (16A, 16B, y 16C) con cada tabla que muestra los resultados para uno de los niveles de azúcar en las hojuelas de papa. Adicionalmente, los ensayos están dispuestos de tal forma que los controles, sin cloruro de calcio o ácido fosfórico, están en el lado izquierdo.

Dentro de la tabla, cada nivel de cloruro de calcio (CC) se agrupan, con variaciones en el siguiente ácido fosfórico (PA).

Célula		Cntrl (16)	No CC ↓PA (5)	↓CC No PA (7)	↓CC ↑PA (4)	↑CC ↓PA (8)
CaCl ₂		---	---	0.45	0.45	0.90
% de Ácido Fosfórico		---	0.05	---	0.10	0.05
Humedad		2.36	2.36	2.30	2.30	2.42
Aceite		22.83	21.77	23.60	22.20	23.75
Color	L	69.42	74.39	75.00	75.07	74.39
	A	2.69	0.10	-0.02	-0.13	0.10
	B	28.00	27.99	27.80	27.64	27.99
Acrilamida		171	131	41	46	40

Tabla 16A: Efecto del CaCl₂/Ácido Fosfórico en el Nivel de Acrilamida - 0.2% de Azúcares Reductores

En el nivel más bajo de los azúcares reductores en éste ensayo, podemos que los niveles de acrilamida producidos están normalmente en el rango más bajo, como se esperaría. En este nivel de azúcares, cloruro de calcio solo cae el nivel de acrilamida a menos de 1/4 del control, con poco beneficio adicional ganado por la adición del ácido fosfórico. En el rango medio de azúcares reductores, muestra la siguiente tabla, la combinación de cloruro de calcio que reduce el nivel de acrilamida de 367 ppb en el control a 69 ppb en la célula 12. Aunque algo de esta reducción se le puede atribuir al contenido de humedad ligeramente mayor de la célula 12 (2.77 vs. 2.66 para

126

el control)), el soporte adicional se muestra por la reducción significativa en acrilamida aún cuando lo niveles de cloruro de calcio y ácido fosfórico se detengan. Esto se muestra en la célula 6, que tiene una reducción significativa en contenido de humedad y acrilamida menor que el control.

Célula		Cntrl	No CC	↓CC	↓CC	↓CC	↓CC	↑CC	↑CC
		(15)	↑PA (3)	↓PA (2a)	↓PA (2b)	↓PA (6)	↓PA (13)	0 PA (9)	↑PA (12)
CaCl ₂		---	---	0.45	0.45	0.45	0.45	0.90	0.90
% de Ácido Fosfórico		---	0.10	0.05	0.05	0.05	0.05	---	0.10
Humedad		2.66	2.59	3.16	2.74	2.61	2.56	2.81	2.77
Aceite		23.72	24.24	25.24	22.58	23.48	25.12	23.99	24.71
Color	L	69.45	67.69	72.23	70.44	72.23	72.06	72.64	73.59
	A	2.73	4.63	0.54	2.32	0.54	2.03	0.84	0.47
	B	28.00	28.54	26.51	27.55	26.51	27.64	27.05	26.82
Acrilamida		367	451	96	170	192	207	39	69

Tabla 16B: Efecto del CaCl₂/Ácido Fosfórico en el Nivel de Acrilamida - 1.07% de Azúcares Reductores

Célula		No CC	↓CC	↓CC	↓CC	↓CC	↑CC
		↓PA (11)	Np PA (1a)	No PA (1b)	No PA (1c)	↑PA (10)	↑PA (9)
CaCl ₂		---	0.45	0.45	0.45	0.45	0.90
% de Ácido Fosfórico		0.05	---	---	---	0.10	0.05
Humedad		0.47	2.68	2.60	3.19	2.80	3.18
Aceite		24.70	25.07	24.48	22.81	24.19	23.25
Color	L	61.84	62.32	63.86	69.42	69.11	72.61

127

	A	8.10	5.18	6.70	3.00	3.78	1.28
	B	28.32	26.27	28.00	27.66	27.70	26.78
Acrilamida		667	431	360	112	150	51

Tabla 16C: Efecto del CaCl₂/Ácido Fosfórico en el Nivel de Acrilamida - 2.07% de Azúcares Reductores

Como se puede ver a partir de estas tres tablas, los niveles del cloruro de calcio y ácido fosfórico necesarios para reducir el nivel de acrilamida incrementa cuando se incrementan los niveles de azúcares reductores, como se podría esperar. La Figura 6 muestra una gráfica que corresponde a las tres tablas anteriores, con la barras 602 que muestran un nivel de acrilamida y los puntos que 604 que demuestran el nivel de humedad. Los resultados se agrupan de nuevo mediante el nivel de azúcar reductor disponible de la papa; dentro de cada grupo existe un movimiento general hacia abajo como un primero y se utilizan varios agentes reductores de acrilamida para reducir el nivel de acrilamida.

Varios días después, otro conjunto con el mismo protocolo para las tres tablas anteriores se conduce utilizando solo las hojuela de papa con 1.07% de azúcares reductores con los mismos tres niveles de cloruro de calcio y con cuatro nivele de ácido fosfórico (0, 0.025%, 0.05%, y 0.10%). Los resultados se muestran adelante en la Tabla 17. La Figura 7 muestra gráficamente los resultados para la tabla, con niveles de acrilamida expresados como barras 702 y calibrados a las marcas en el lado izquierdo mientras que el porcentaje de humedad se expresa como puntos 704 y se calibra a las marcas en el lado derecho del dibujo. Como la cantidad de cloruro de calcio se incrementa, por ejemplo

~~0010~~

moviéndose de izquierda a derecha a través de la tabla completa, se reduce la acrilamida. De la misma forma, para cada nivel de cloruro de calcio, por ejemplo el movimiento de izquierda a derecha dentro de un nivel de cloruro de calcio, el nivel de la acrilamida también se reduce generalmente.

Célula		Cntrl	No CC	No CC	↓CC	↓CC	↑CC	↑CC	↑CC
		(1)	↓PA (4)	↑PA (7)	↓PA (3)	↓PA (6)	↓↓PA (8)	↓PA (2)	↑PA (5)
CaCl ₂		---	---	---	0.45	0.45	0.90	0.90	0.90
% de Ácido Fosfórico		---	0.050	0.100	0.050	0.050	0.025	0.050	0.100
Humedad		2.68	2.52	2.38	2.29	2.55	2.45	2.78	2.61
Aceite		23.74	22.57	22.13	24.33	23.84	22.54	24.11	22.73
Color	L	65.97	64.67	64.55	65.18	66.82	68.36	70.23	68.75
	A	4.75	5.23	5.53	5.06	4.09	3.17	2.19	2.92
	B	27.70	27.83	27.94	27.79	27.64	27.17	26.28	27.06
Acrilamida		454	435	344	188	77	233	80	66

Tabla 17: Efecto del CaCl₂/Ácido Fosfórico en el Nivel de
Acrilamida - 1.07% de Azúcares Reductores

II. Cloruro de Calcio/Ácido Cítrico con Cisteína

En algunos de los ensayos previos en trozos de maíz desarrollado por los inventores, la cantidad de cloruro de calcio y ácido fosfórico necesario para llevar el nivel de acrilamida a un nivel deseado produce sabores cuestionables. El siguiente ensayo se diseña para revelar si la adición de pasta de papa de cisteína - que se ha mostrado que reduce los niveles de acrilamida en los tozos - podría permitir que los niveles de cloruro de calcio y

ácido se reduzcan a niveles de sabor aceptables mientras mantienen el nivel de acrilamida abajo. En éste ensayo, los tres agentes se agregan a la masa (pasta) en una proporción de (i.) 0.16% Ca/Cl₂, 0.084% ácido cítrico, y 0.005% L. de cisteína en un primer experimento; (ii) 0.106% Ca/Cl, y 0.084% ácido cítrico, pero sin cisteína en un segundo experimento, y 0.053% Ca/Cl₂, 0.042% ácido cítrico con 0.005% L. cisteína como un tercer experimento. Cada experimento se duplica y se repite nuevamente, con los resultados mostrados adelante. La masa es de aproximadamente 50% de humedad, de tal forma que las concentraciones podrían doblarse aproximadamente si uno traduce éstas proporciones sólo a sólidos. Adicionalmente, en cada ensayo, parte de la serie se saborizan con un sazónador de queso nacho en aproximadamente 10% del peso del trozo base. Los resultados de éste ensayo se muestran en la Tabla 18 adelante. En esta tabla, para cada categoría de trozo, por ejemplo, trozo plano, control, los resultados del primer experimento se dan en acrilamida #1; los resultados del segundo experimento se dan como acrilamida #2, y el promedio de los dos dado como promedio de acrilamida. Solo se toma un nivel de humedad, en el primer experimento; ese valor se muestra.

Célula	Trozo Plano				Trozo Nacho			
	Cntrl	↑CC	↑CC	↓CC	Cntrl	↑CC	↑CC	↓CC
		↑Cítrico 0 Cys	↑Cítrico Cys	↓Cítrico Cys		↑Cítrico 0 Cys	↑Cítrico Cys	↓Cítrico Cys
CaCl ₂ (%)		0.106	0.106	0.053		0.106	0.106	0.053
(%) de Ácido Cítrico		0.084	0.084	0.042		0.084	0.084	0.042
(%) de Cisteína			0.005	0.005			0.005	0.005
Acrilamida #1 ppb	163	154	70	171	90	55	62	77

Acrilamida #2 ppb	102	113	74	103	71	53	50	76
Porcentaje de acrilamida ppb	132.5	133.5	72	137	80.5	54	56	76.5
% de Humedad	1.07	0.91	1.07	0.95	1.26	1.49	1.23	1.25

Tabla 18: Efecto de la Cisteína con CaCl₂/Ácido Cítrico en el Nivel de Acrilamida en Trozos de maíz

Cuando se combina con 0.106% de CaCl₂ y 0.084% % de ácido cítrico, la adición de cisteína corta la producción de acrilamida aproximadamente en la mitad. En los trozos saborizados con sabor nacho, el cloruro de calcio y el ácido cítrico solo reducen la producción de acrilamida de 80.5 a 54 ppb, aunque en este conjunto de ensayos, la adición de cisteína no parece suministrar una reducción adicional de acrilamida.

La Figura 8 presente gráficamente lo mismos datos como la tabla anterior. Para cada tipo de trozo en el que el experimento se corre (trozo plano, de control), dos barras 802 muestran los resultados de la acrilamida. Los resultados de la acrilamida 802a del primer experimento se muestran en la izquierda para cada tipo de trozo, con los resultados de acrilamida 802b del segundo experimento mostrado a la derecha. Ambos resultados de acrilamida se calibran a las marcas a la izquierda de la gráfica. El nivel único de humedad se muestra como un punto 804 cubre la gráfica acrilamida y se calibra a las marcaciones en la izquierda de la gráfica.

Después que se completa el ensayo anterior, los trozos de papa fabricados se ensayan de forma similar, utilizando hojuelas de

papa que contienen dos niveles diferentes de azúcares reductores. Para traducir las concentraciones utilizadas en el ensayo de trazo de maíz con trozos de papa fabricados, la suma de las hojuelas de papa, almidón de papa, emulsificadores y azúcar agregado se consideran como los sólidos. Las cantidades de CaCl_2 , ácido cítrico, y cisteína se ajustan para producir la misma concentración como en los trozos de maíz sobre una base sólida. En éste ensayo, sin embargo, cuando los niveles mayores de cloruro de calcio y ácido cítrico se utilizan, también se utiliza un mayor nivel de cisteína. Adicionalmente, se hace una comparación en la porción de azúcar reductor de ensayo, con el uso de cloruro de calcio en combinación con ácido fosfórico, con y sin cisteína. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

Podemos ver a partir de esto que en las hojuelas de papa con 1.25% de azúcares reductores, la combinación de cloruro de calcio, ácido cítrico, y cisteína en el primer nivel superior reducen la formación de acrilamida de 1290 ppb a 594 ppb, menos de la mitad de la figura de control. Utilizando mayores niveles de la combinación de agentes reduce la formación de acrilamida a 306 pps, menos de la mitad de la cantidad de control.

Utilizando las mismas hojuelas de papa, ácido fosfórico y cloruro de calcio solo reducen la formación de acrilamida de la misma 1290 a 366 ppb, mientras una pequeña cantidad de cisteína agregada con el ácido fosfórico y el cloruro reduce la acrilamida todavía más, a 188 ppb.

00122

Finalmente, en las hojuelas de papa que tienen 2% de azúcares reductores, la adición de cloruro de calcio, ácido cítrico, y cisteína reduce la formación de acrilamida de 1420 a 665 ppb, menos de la mitad.

Célula		Azúcares reductores medios (1.25%)					Azúcares reductores altos (2%)	
		Cntrl (1B)	↓CC ↓Cítrico ↓Cyst (2)	↑CC ↑Cítrico ↑Cyst (3)	CC PhosA 0Cyst (4)	CC PhosA Cyst (4A)	Cntrl (6)	↓CC ↓Cítrico ↓Cys (7)
Cloruro de calcio			10.2	20.4	36	36		10.2
Ácido cítrico			8	16				8
Ácido fosfórico					4	4		
Cisteína			0.48	0.96		0.48		0.48
Acrilamida ppb		1290	594	306	366	188	1420	665
% de Humedad		1.82	2.06	2.12	2.06	2.33	2.28	2.23
Color	L	56.84	65.47	69.29	66.88	73.09	61.06	63.50
	A	10.20	6.42	4.07	4.42	1.55	9.03	7.93
	B	27.53	28.40	28.17	28.10	27.07	28.07	28.00

Tabla 19: Efecto de la Cisteína con CaCl₂/Ácido en el Nivel de Acrilamida en Trozos de papa

La Figura 9 demuestra gráficamente los resultados de éste experimento. Los resultados se muestran agrupados primero por el nivel de azúcares reductores, luego por la cantidad de agentes reductores de acrilamida agregados. Como en las gráficas anteriores, las barras 902 representan el nivel de acrilamida que se calibra de acuerdo con las marcaciones en el lado izquierdo de la gráfica, mientras que los puntos 904 representan el nivel de humedad que se calibran de acuerdo con las marcaciones en el lado derecho de la gráfica.

Los anteriores experimentos han mostrado que los agentes reductores de acrilamida no tienen que ser utilizados en forma separada, pero se pueden combinar para suministrar beneficio adicional. Este beneficio agregado se puede utilizar para lograr niveles reducidos progresivamente de acrilamida en alimentos o para lograr un nivel bajo de acrilamida sin producir cambios significativos al sabor de textura de aquellos alimentos. Aunque las modalidades específicas mostradas han descrito el cloruro de calcio combinado con ácido cítrico o ácido fosfórico y éstos con cisteína, una persona medianamente versada en la técnica podría realizar esas combinaciones que puede utilizar otras sales de calcio, las sales de otros cationes divalentes o trivalentes, otros ácidos de grado alimenticio, y cualquiera de otros aminoácidos que se han mostrado por reducir la acrilamida en un producto alimenticio terminado. Adicionalmente, aunque esto se ha demostrado en los trozos de papa y los trozos de maíz, una persona medianamente versada en la técnica entenderá que el mismo uso de combinaciones de agentes se puede utilizar en otros productos alimenticios fabricados que están sujetos a la formación de acrilamida, tal como galletas, etc.

Agentes para Reducir la Acrilamida Agregada en la Fabricación de Hojuelas de Papa

La adición de cloruro de calcio y un ácido se ha mostrado que reduce la acrilamida en alimentos pasabocas freídos y horneados formulados con hojuelas de papa. Se cree que la presencia de un ácido alcanza su efecto al reducir el pH. No se sabe si el

43.7

cloruro de calcio interfiere con la pérdida del grupo carboxilo o la posterior pérdida del grupo amina de la asparagina libre para formar acrilamida. La pérdida del grupo amina parece requerir alta temperatura, que ocurre generalmente hacia el final de la deshidratación del pasaboca. La pérdida del grupo carboxilo se cree que ocurre a temperaturas menores en la presencia de agua.

Las hojuelas de papa se pueden hacer con una serie de cocción con agua y vapor (convencional) o solo con cocción de vapor (que pierde menos de la superficie expuesta de la papa). La papa cocida luego se tritura y se seca en tambor. El análisis de las hojuelas ha revelado muy bajos niveles de acrilamida en las hojuelas (menos de 100 ppb), aunque los productos hechos a partir de estas hojuelas pueden lograr niveles mucho mayores de acrilamida.

Se ha teorizado que si la reducción del pH de la pata con ácido o agregar cloruro de calcio a la pasta interfiere con la pérdida del grupo carboxílico, luego introducir éstos aditivos durante el proceso de producción de la hojuela puede (a) reduce la pérdida de carboxilo reduciendo así la proporción de pérdida de amina durante la deshidratación del alimento pasaboca o (b) asegura que el aditivo de intervención es bien distribuido en la pasta que se deshidrata dentro del alimento pasaboca. Lo anterior, si sucede, podría ser probablemente un mayor efecto en la acrilamida que el último.

Otro posible aditivo para reducir la formación de acrilamida en productos alimenticios fabricados es la asparaginasa. La

asparaginasa se conoce por descomponer la asparagina a ácido aspártico y amonio. Aunque no es posible utilizar esta enzima en la elaboración de trozos de papas en rodajas, el proceso de elaboración de hojuelas al cocer y mole papas (un ingrediente alimenticio) vulnera las paredes celulares y suministra una oportunidad para que trabaje la asparaginasa. En una modalidad preferida, la asparaginasa se agrega al ingrediente alimenticio en una forma pura como asparaginasa de grado alimenticio.

Los inventores diseñan el siguiente conjunto de experimentos para estudiar la efectividad de varios agregados durante la producción de las hojuelas de papa en la reducción del nivel de acrilamida en productos hechos con hojuelas de papa.

I. Cloruro de Calcio y Ácido Fosfórico Utilizado en la Elaboración de Hojuelas de Papa

Se diseña esta serie de ensayos para evaluar la reducción en el nivel de acrilamida cuando se agrega CaCl_2 y/o ácido fosfórico durante la producción de hojuelas de papa. Los ensayos también están dirigidos a éstos aditivos que tienen el mismo efecto cuando ellos se agregan en la etapa posterior de la elaboración de la pasta.

Para este ensayo, las papas comprenden 20% de sólidos y 1% de azúcar reductor. Las papas se cocinan durante 16 minutos y se muelen con ingredientes agregados. Todas las tandas reciben 13.7 gm de un emulsificador y 0.4 gm de ácido cítrico. Cuatro de las seis tandas tienen ácido fosfórico agregado en uno de dos niveles

(0.2% y 0.4% de sólidos de papa) y tres de las cuatro tandas reciben CaCl_2 en uno de dos niveles (0.45% y 0.90% del peso de los sólidos de papa). Las papas se secan y se muelen en hojuelas de un tamaño dado, se desarrollan varias mediciones y cada tanda se hace en pasta. La pasta utiliza 4629 gm de hojuelas de papa y almidón de papa, 56 gm de emulsificador, 162 m de sucrosa líquida y 2300 ml de agua. Adicionalmente, de las dos tantas que no reciben ácido fosfórico o CaCl_2 durante la producción de hojuelas, ambas tandas reciben éstos aditivos en los niveles dados cuando se hace la pasta. La pasta se enrolla a un espesor de 0.64 mm, se corte en piezas, y se fríe a 350°F durante 20 segundos. La Tabla 20 adelante muestra los resultados de los ensayos para éstas varias tandas.

Tanda	0 Ca ↓phos (C) en hojuelas	↓Ca ↓phos (B) en hojuelas	↓Ca ↓phos (C) en pasta	↑Ca ↓phos (A) en hojuelas	↑Ca ↓phos (C) en pasta	↑Ca ↓phos (E) en hojuelas
Agregado a hojuelas						
Peso (gm) Cloruro de Calcio	0	24.7	0	49.4	0	49.4
Peso (gm) Ácido Fosfórico	11.0	11.0	0	11.0	0	21.9
Ensayos de Hojuelas Secas						
Humedad (%)	6.3	6.5	4.5	6.8	6.2	7.7
Índice de Absorción de Agua (WAI) (%)	8.2	8.3	9.2	8.2	8.1	8.1
En malla 20	1.5	1.8	2.0	1.0	1.7	1.6
En malla 40	26.6	30.9	32.3	27.2	28.3	24.4
En malla 60	35.3	37.1	36.1	38.4	37.5	35.3
En malla 80	14.6	13.2	12.0	14.5	14.4	16.0
En malla 100	5.7	4.8	4.5	5.4	5.4	6.5
En malla 200	11.5	8.8	8.6	10.1	9.3	12.1
A través de malla 200	4.7	3.3	4.5	3.4	3.3	4.0

Agregado a la pasta						
Dihidrato Cloruro de Calcio	0	0	23.7	0	47.4	0
Ácido Fosfórico	0	0	14.4	0	7.9	0
Resultados de prueba en trozos						
Humedad	1.87	2.04	2.04	2.07	1.97	2.05
Aceite	23.53	23.82	25.12	23.76	24.44	24.98
Color - L	54.63	62.58	67.28	66.89	69.48	66.87
Color - A	13.63	9.23	6.99	6.27	5.61	7.21
Color - B	27.32	28.59	29.54	28.85	29.26	29.37
Acrilamida	1286	344	252	129	191	141

Tabla 20: Efecto del CaCl_2 /Ácido Fosfórico agregado a Hojuelas o Pasta en el Nivel de Acrilamida

Como se ve en los resultados anteriores y en la gráfica acompañante de la Figura 10, el nivel de acrilamida es mayor en el Ensayo C cuando solo se agrega ácido fosfórico a la preparación de hojuelas y es el más bajo cuando se utiliza cloruro de calcio y ácido fosfórico en combinación.

II. Asparaginasa Utilizada en la Elaboración de Hojuelas de Papa

La asparaginasa es una enzima que descompone la asparagina en ácido aspártico y amonio. En razón que el ácido aspártico no forma acrilamida, los inventores razonan que el tratamiento con la asparaginasa debe reducir la formación de acrilamida cuando se calientan las hojuelas de papa.

Se desarrolla el siguiente ensayo. Dos gramos de hojuelas de papa estándar se mezclan con 35 ml de agua en una bandeja de secado metálica. La bandeja se cubre y se calienta a 100°C durante 60

138

minutos. Después de enfriamiento, se agrega 250 unidades de asparaginasa en 5 ml de agua, una cantidad de asparaginasa que es significativamente mayor que la cantidad calculada necesaria. Para control, se mezclan hojuelas de papa y 5 ml de agua sin enzima. Las hojuelas de papa con asparaginasa se mantienen a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del tratamiento de la enzima, la suspensión de hojuela de papa se seca a 60°C durante la noche. Las bandejas con hojuelas de papa seca se cubren y se calientan a 120°C durante 40 minutos. Se mide la acrilamida mediante cromatografía de gas, espectrometría de gas de derivado denominado. Las hojuelas de control contienen 11,036 ppb de acrilamida, mientras que las hojuelas tratadas con asparaginasa contienen 117 ppb de acrilamida, una reducción de más del 98%.

Siguiendo éste primer ensayo, se hace la investigación de si o no es necesario cocinar el agua y las hojuelas de papa para agregar asparaginasa para la enzima para ser efectiva. Para éste ensayo, se desarrolla el siguiente experimento:

Se pretratan hojuelas de papa en una de cuatro formas. En cada uno de los cuatro grupos, 2 gramos de hojuelas de papa se mezclan con 25 mililitros de agua. En el grupo de pre-tratamiento de control (a) las hojuelas de papa y agua se mezclan para formar una pasta. En el grupo (b), las hojuelas de papa se homogenizan con 25 ml de agua en un Bio Homogenizador M 133/1281-0 a alta velocidad y se mezclan con 10 ml de agua desionizada adicional. En el grupo (c) las hojuelas de papa y el agua se mezclan se cubren, y se calientan a 60°C durante 60 minutos. En el grupo

A-9

(d), las hojuelas de papa y el agua se mezclan, se cubren y se calientan a 100°C durante 60 minutos. Para cada grupo de pre-tratamiento (a), (b), (c), y (d), las hojuelas se dividen, con la mitad del grupo de pre-tratamiento que se trata con asparaginasa mientras que la otra mitad sirve como controles, sin agregar asparaginasa.

Se prepara una solución de asparaginasa al disolver 1000 unidades en 40 mililitros de agua desionizada. La asparaginasa es de *Erwinia chrysanthemi*, Sigma A-2925 EC 3.5.1.1. Se agrega cinco mililitros de solución de asparaginasa (5ml) a cada una de las suspensiones de hojuela de papa de ensayo (a), (b), (c), y (d). Cinco mililitros de agua desionizada se agregan a la suspensión de hojuelas de papa de control (a). Todas las suspensiones se dejan a temperatura ambiente durante una hora, con todos los ensayos que se desarrollan en duplicado. Las bandejas no cubiertas que contienen las suspensiones de hojuelas de papa se dejan durante la noche para secarse a 60°C. Después de cubrir las bandejas, las hojuelas de papa se calientan a 120°C durante 40 minutos. La acrilamida se mide por cromatografía de gas, espectrometría de masa de derivado denominado.

Como se muestra en la Tabla 21 adelante, el tratamiento con asparaginasa reduce la formación de acrilamida por más del 98% para todos los pre-tratamientos. Ni la homogenización ni el calentamiento de las hojuelas de papa antes de agregar la enzima incrementa la efectividad de la asparaginasa. En hojuelas de papa, la asparaginasa es accesible a asparaginasa sin tratamientos para dañar la estructura celular adicionalmente.

Notablemente, la cantidad de asparaginasa utilizada para tratar las hojuelas de papa está en exceso. Si las hojuelas de papa contienen 1% de asparagina, agregar 125 unidades de asparaginasa a 2 gramos de hojuelas de papa durante 1 hora es aproximadamente un exceso de 50 veces de enzima.

Pre-tratamiento	Acrilamida ppb		Acrilamida como % de Control
	Control - Sin Asparaginasa	Ensayo - Asparaginasa	
(a) Sin pre-tratamiento	12512	107	0.9
(b) Homogenización	12216	126	1.0
(c) Calentado a 60 C	12879	105	0.8
(d) Calentado a 100 C	12696	166	1.3

Tabla 21: Efecto de Pretratamientos de Hojuelas de Papa en la Efectividad de la Asparagina

Se diseña otro conjunto de ensayos para evaluar si la adición de asparaginasa durante la producción de hojuelas de papa suministra una reducción de acrilamida en el producto cocido hecho de hojuelas y si el amortiguador de las papas olidas utilizada para hacer las hojuelas para un pH preferido para actividad de enzima (por ejemplo, pH = 8.6) incrementa la efectividad de la asparagina. El amortiguador se hace con una solución de hidróxido de sodio, hecho con cuatro gramos de hidróxido de sodio agregados a un litro de agua para formar una solución molar.

Dos tandas de hojuelas de papa se hacen como controles, uno amortiguado y uno no amortiguado. La asparaginasa se agrega a dos

tandas adicionales de hojuelas de papa; de nuevo una se amortigua mientras que la otra no. La asparaginasa se obtiene a partir Sigma Chemical y se mezcla con agua en una proporción de 8 a 1 agua a enzima. Para las dos tandas en las que se agrega asparaginasa, la mezcla se mantiene durante 40 minutos después de agregar la enzima, en un recipiente cubierto para minimizar la deshidratación y mantenerlo aproximadamente a 36°C. La mezcla luego se procesa en un tambor secador para producir las hojuelas. Las hojuelas de papa se utilizan para hacer pasta de papa de acuerdo con los protocolos mostrados previamente. Con los resultados mostrados en la Tabla 22 adelante.

Medición	Control No Amortiguado	Asparaginasa No Amortiguada	Control Amortiguado	Asparaginasa Amortiguada
Humedad	1.56	1.53	1.68	1.61
Aceite	22.74	23.12	21.77	21.13
Color - L	61.24	60.70	57.24	57.35
Color - A	6.57	9.30	5.04	7.52
Color - B	28.95	28.29	27.12	27.41
Acrilamida ppb	768	54	1199	111

Tabla 22: Efecto de Asparaginasa y Amortiguación en el Nivel de Acrilamida en Trozos de Papa.

Como se muestra en la Tabla 22, la adición de asparaginasa sin un amortiguador reduce la producción de acrilamida en los trozos terminados de 768 a 54 ppb, una reducción del 93%. El uso de un amortiguador no parece tener el efecto deseado en la formación de acrilamida; a diferencia del uso de la solución amortiguada que

permite una mayor cantidad de acrilamida para formarse en los experimentos de control y la asparaginasa. Todavía, la asparaginasa reduce el nivel de acrilamida 1199 a 111, una reducción del 91%. La Figura 11 muestra los resultados de la Tabla 22 en una forma gráfica. Como en los dibujos anteriores, las barras 1102 representan el nivel de acrilamida para cada experimento, calibrada de acuerdo con los marcadores en el lado izquierdo de la gráfica, mientras que los puntos 1104 representan el nivel de humedad en los trozos, una calibración de acuerdo las marcaciones en el lado derecho de la gráfica.

Los ensayos también se corren en las muestras para revisar la asparagina libre para determinar si la enzima es activa. Los resultados se muestran en la Tabla 23 adelante.

	Control No Amortiguado	Asparaginasa No Amortiguada	Control Amortiguado	Asparaginasa Amortiguada
Asparagina Libre	1.71	0.061	2.55	0.027
Fructosa	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Glucosa	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Sucrosa	0.798	0.828	0.720	0.322

Tabla 23: Ensayo para Asparagina Libre en Hojuelas Tratadas con Enzima

En el grupo no amortiguado, la adición de asparaginasa reduce la asparagina libre de 1.71 a 0.061, una reducción del 96.5%. En el grupo amortiguado, la adición de asparaginasa reduce la asparagina libe de 2.55 a 0.027, una reducción del 98.9%.

Finalmente, la muestra de hojuelas de cada grupo se evalúa en un sistema modelo. En éste sistema modelo, una cantidad pequeña de hojuelas de cada muestra se mezcla con agua para formar una solución de aproximadamente 50% de hojuelas a agua. Esta solución se calienta en un tubo de ensayo durante 40 minutos a 120°C. La muestra se analiza luego para formación de acrilamida, con los resultados mostrados en la Tabla 24. Los resultados duplicados para cada categoría se muestran lado a lado. En el sistema modelo, la adición de asparaginasa a las hojuelas no amortiguadas reduce la acrilamida de un promedio de 993.5 ppb a 83 ppb, una reducción de 91.7%. La adición de asparaginasa a las hojuelas amortiguadas reduce la acrilamida de un promedio de 889.5 ppb a un promedio de 64.5, una reducción de 92.7%.

	Control No Amortiguado		Asparaginasa No Amortiguada		Control Amortiguado		Asparaginasa Amortiguada	
Acrilamida ppb	1019	968	84	82	960	819	70	59

Tabla 24: Efecto del Sistema Modelo de Asparaginasa sobre Acrilamida

Extracto de Romero Agregado a Aceite para Freír

En un en sayo separado, el efecto de agregar extracto de romero al aceite para freír para fabricar trozos de papa se examina. En éste ensayo, se frien trozos de papa fabricados idénticamente en aceite que no tiene aditivos (controles) o en aceite que tiene extracto de romero en una de cuatro niveles: 500, 750, 1.000, o

1.500 partes por millón. La Tabla 25 adelante da los resultados de éste ensayo.

Nivel de Romero ppm	0	0	500	750	1,000	1,500
% de Humedad		2.58			2.64	2.6
Acrilamida ppb	1210	1057	840	775	1211	1608

Tabla 25: Efecto de Romero sobre Acrilamida

El nivel de acrilamida promedio en los trozos de control es 1133.5 ppb. Agregar 500 partes por millón de romero al aceite para freír reduce la acrilamida a 840, una reducción del 26%, mientras que incrementar el romero a 750 partes por millón reduce la formación de acrilamida adicional, a 775, una reducción de 31.6%. Sin embargo, incrementar el romero a 1000 partes por millón no tiene efecto y el incremento del romero a 1500 partes por millón origina la formación de acrilamida para incrementarse a 1608 partes por billón, un incremento del 41.9%.

La Figura 12 demuestra los resultados del experimento del romeo gráficamente. Como en los ejemplos anteriores, las barras 1202 demuestran el nivel de acrilamida y se calibran con las divisiones en el lado izquierdo de la gráfica, mientras que los puntos 1204 demuestran la cantidad de humedad en los trozos y se calibran con las divisiones en el lado derecho de la gráfica.

Los resultados del ensayo descrito han agregado el conocimiento de los agentes reductores de acrilamida que se pueden utilizar en

alimentos fabricados procesados térmicamente. Se han mostrado cationes divalentes y trivalentes y aminoácidos por se efectivos en la reducción de la incidencia de la acrilamida en alimentos fabricados procesados térmicamente. Estos agentes se pueden utilizar individualmente, pero también se pueden utilizar en combinación con otros o con ácidos que incrementan su efectividad. La combinación de agentes se puede utilizar para controlar adicionalmente la incidencia de acrilamida en alimentos procesados térmicamente partir de aquellos obtenibles por agentes únicos o las combinaciones se pueden utilizar para lograr un nivel bajo de acrilamida sin alteraciones indebidas en el sabor y textura del producto alimenticio. La asparaginasa se ha probado como un agente reductor de acrilamida efectivo en alimentos fabricados. También se ha mostrado que éstos agentes pueden se efectivos no solo cuando se agregan a la pasta para el alimento fabricado, sino los agentes también se pueden agregar a los productos intermedios, tal como hojuelas de papas secas, u otros productos de papas secos, durante su fabricación. El beneficio de los agentes agregados a productos intermedios puede ser tan efectivo como aquellos agregados a la pasta.

Efecto del Agente Reductor de Acrilamida que Tiene un Tiol Libre sobre la Formación de Acrilamida

Otra modalidad de la invención involucra reducir la producción de acrilamida mediante la adición de un agente reductor con un compuesto tiol libre de una pasta de alimento pasaboca antes de cocción o proceso térmico. Como se utiliza aquí, el compuesto tio libre es un agente reductor de acrilamida que tiene un tiol

libre. Como se discutió previamente, se cree que el tiol libre de cisteína puede reaccionar con el enlace de carbono doble de acrilamida y actúa como un inhibidor de la reacción Maillard.

Se conduce un ensayo para confirmar que el tiol libre es probablemente responsable de la reducción de acrilamida. Se preparan cinco compuestos de tiol libres en base equimolar, cada compuesto tiene una concentración de 6.48 mmoles por litro en un amortiguador de fosfato de sodio de 0.5 molar que tiene pH de 7.0 con 0.4% de asparagina (30.3 milimolar) y 0.8% de glucosa (44.4 milimolares). Una muestra de control que no tiene compuestos de tiol libres también se prepara. Se calientan las seis soluciones a 120°C durante 40 minutos. Las soluciones luego se miden para concentración de acrilamida. Los resultados se muestran en la Tabla 26 adelante:

Compuesto	Acrilamida ppb	Como % de Control
Control (Sin Tiol Libre)	41	100
Cisteína ("L-Cisteína")	1128	27
N-Acetil-L-Cisteína	1231	30
N-Acetil-Cisteamina	1204	29
Glutathiona Reducida	1153	28
Di.tiotreitol	1462	35

Tabla 26: Efecto de los Compuestos de Tiol Libres en la Reducción de Acrilamida A Través de la Descomposición

El anterior experimento confirma que el grupo tiol libre reduce la acrilamida. El grupo amino libre de cisteína no contribuye a reducir la acrilamida debido a que la N-acetil-L-cisteína tiene

un grupo amino bloqueado que es casi tan efectivo como la cisteína. El grupo carboxilo de cisteína no contribuya a reducir la acrilamida ya que la N-acetil-cisteamina, que no tiene grupo carboxilo es casi tan efectiva como la cisteína en reducir la acrilamida. La glutatióna, un tripéptido con cisteína en la posición media, es equivalente a cisteína. Aunque el ditiotreitól tiene dos grupos tiol, la acrilamida con ditiotreitól es similar a los compuestos con un grupo tiol. Los dos grupos tiol es ditiotreitól pueden reaccionar para formar disulfuros como ditiotreitól menos efectivo en una base molar igual que los otros compuestos que contienen tiol.

Experimentación, como se ejemplifica por la Tabla 6 anterior, ha mostrado que la reducción de acrilamida es aproximadamente proporcional a la concentración de tioles libres agregados, tal como cisteína. Sin embargo, los efectos colaterales en las características, tal como color, sabor, y textura del producto final de la adición de un compuesto tiol libre como cisteína se puede considerar. Los altos niveles de cisteína, por ejemplo, pueden impartir sabores indeseables en el producto final. Por lo tanto, los aditivos que pueden incrementar o magnificar la efectividad de un compuesto de tiol libre, tal como cisteína, son deseables debido a que tales aditivos pueden permitir el mismo nivel de reducción de acrilamida con menos concentración de un compuesto tiol. Se ha descubierto que cuando un agente reductor se agrega a un compuesto de tiol libre tal como cisteína, se mejora la reducción de acrilamida. Los agentes reductores se conocen en la química de reducción-oxidación por ser compuestos

que son donantes de electrones y agentes de oxidación que se conocen por ser aceptadores de electrones.

Efecto de Cisteínas + Agente Reductor en la Descomposición de Acrilamida

Sistemas de modelo simple se pueden utilizar para probar la efectividad magnificada de los compuestos de tiol libre con la adición de un agente reductor. Una solución de muestra de control que comprende un tiol libre (1.114 milimolar de cisteína) y acrilamida (0.0352 milimolar) se prepara en un amortiguador de fosfato de sodio de 0.5 molar que tiene un pH de 7.0. La solución se calienta a 120°C durante 40 minutos. La recuperación de la acrilamida agregada es 21%. Por lo tanto, la cantidad de reducción de acrilamida para la muestra de control sin agente reductor es 79%. Aunque la proporción molar de cisteína a acrilamida es más de 30, no toda la acrilamida reacciona con cisteína.

Luego se hace un ensayo con compuestos de tiol libres y un agente reductor. Se prepara una solución que comprende 135 ppm de un compuesto de tiol libre (1.114 milimolar de cisteína), 2500 ppb de acrilamida (0.0352 milimolares), y cerca de 305 ppm de agente reductor (1.35 milimolar de dihidrato de cloruro estañoso) en un amortiguador de fosfato de sodio de 0.5 molar que tiene un pH de 7.0. Después de calentar a 120°C durante 40 minutos, la recuperación de acrilamida agregada se mide por ser menor del 4%. Por lo tanto, la cantidad de reducción de acrilamida con la

muestra que contiene un agente reductor está sobre el 96%, un 17% adicional sobre el tiol libre solo o muestra de control.

Efectos de cisteína + agente oxidante en la descomposición de acrilamida.

Se ejecuta un ensayo con la adición de un agente de oxidación en cambio de un agente reductor. Se prepara una solución 135 ppm de un tiol libre (1.114 milimolar de cisteína), 25000 ppb de acrilamida (0.0352 milimolares), y 235 ppm de un agente oxidante (1.35 milimolares de ácido de dihidroascórbico) en una solución molar de 0.5 de amortiguador de fosfato de sodio que tiene un pH de 7.0. Después de calentar a 120°C durante 40 minutos, la recuperación de la acrilamida agregada se mide por ser aproximadamente 27%. Por lo tanto, la cantidad de reducción de acrilamida con la muestra que contiene el agente oxidante es aproximadamente el 73% que es menor que la reducción alcanzada por la muestra de control de cisteína. Así, la descomposición de acrilamida se empeora con la adición del agente oxidante. Se conducen ensayos adicionales con otros agentes reductores y oxidantes con una solución de acrilamida que tiene aproximadamente de 2500 ng/ml, o 2500 ppb de acrilamida. Los resultados se suministran en la tabla 27 adelante.

compuesto	Concentración (ug/ml)	Concentración milimolar	Recuperación De acrilamida	% de recuperación de acrilamida
Muestra control (Tiol libre solamente)				
cisteína	135	1.114	534	21%
Agente reductor + 135 ppm de cisteína				
Acido ascórbico		11.4		9%

(vitamina C)				
Dihidrato de cloruro estañoso	304.6	1.350	68	3%
Sulfito de sodio	170.2	1.350	69	3%
Meta bisulfito de sodio	256.6	1.350	24	1%
Agente oxidante + 135 ppm de cisteína				
Ácido dihidroascórbico	235	1.350	673	27%
Monohidrato de ácido gálico	253.9	1.350	1111	44%
Hidrato de catequina	391.9	1.350	877	35
Epicatequina	391.9	1.350	827	33%
Hidrato de rutina	824.2	1.350	1306	52%

Tabla 27: Efecto de agentes de reducción y oxidación con cisteína en Acrilamida.

La figura 13 ilustra gráficamente los efectos teorizados de la adición de un agente de reducción u oxidación con un agente de reducción de acrilamida. Sin estar unido a la teoría, se cree que los agentes reductores 1304 incrementan o magnifican la efectividad de la cisteína al mantener la cisteína en la forma 1306 tiol reducida. Como se discutió anteriormente, se cree que el tiol libre de cisteína reacciona con el enlace doble de acrilamida. Un agente de oxidación 1302, tal como ácido deshidroascórbico, convierte similarmente el 1306-cisteína en un disulfuro de cisteína inactivo (cisteína). En una modalidad de la invención, el agente reductor que tiene un potencial de reducción estándar (E°) de entre aproximadamente + 0.2 y -2.0 voltios se utiliza.

Efecto mejorado del tiol con un agente de reducción con hojuelas de papa.

Se desarrolla un ensayo para comparar la reducción de la acrilamida con un tiol libre con y sin un agente reductor en la presencia de hojuelas de papa. Se preparan seis frascos con 3 gramos de hojuelas de papa mezclados con 3 ml de agua desionizada. La cisteína se agrega a los frascos en concentraciones (ug cisteína/de hoja de papa) de 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, y 100 ppm. La caseína, una fuente de tiol libre potencial, se agrega al frasco en el nivel 1%. Las seis muestras se calientan a 120°C por 40 minutos. Las soluciones luego se miden para concentraciones de acrilamida. Los resultados se muestran en la tabla 28 adelante.

Muestra	Cisteína agregada (ppm)	Acrilamida (ppb)	Acrilamida como % de control
Control hojuelas de papa	0	2695	100
Cisteína	800	2220	82
Cisteína	400	2179	81
Cisteína	200	2612	97
Cisteína	100	2832	105
Caseína (1%)		2808	104

Tabla 28: Efecto de Varios Niveles de Concentración en la Reducción de Acrilamida sin un Agente de Reducción.

Los datos confirman de nuevo que como la concentración de cisteína se incrementa, también se incrementa la reducción de acrilamida. El anterior ensayo también indica que 1% de caseína sin un agente reductor no reduce la acrilamida.

Como se muestra en la tabla 27 anterior, el sulfito de sodio (agente de reducción) incrementa la efectividad de cisteína en la reducción de acrilamida agregada un adicional 18% sobre el tiol libre, o muestra de control. Se conduce un ensayo para determinar el efecto del sulfito de sodio sobre la efectividad de la cisteína y la caseína en la reducción de niveles de acrilamida en hojuelas de papa. Se preparan cinco frascos que tienen 3 gramos de hojuelas de papa mezclados con 3 ml de agua desionizada. Se agrega cisteína a dos frascos en una concentración de 400 ppm (ug de cisteína/g de hojuela de papa). La caseína se agrega a un frasco en el nivel 1%. Se agrega sulfito de sodio en 483 ppm (ug de dióxido de azufre por g de hojuela de papa). Al frasco de caseína y uno de los frascos de cisteína. Las muestras se calientan cada una a 120°C durante 40 minutos. Luego se miden las soluciones para concentraciones de acrilamida. Los datos se muestran en la tabla 29 adelante:

Tiol	Agente reductor	Acrilamida (ppb)	Acrilamida como % de control
0 ppm cisteína (control)	--	3567	100
400 ppm cisteína	--	2500	70
--	483 ppm sulfito de sodio	3004	84
400 ppm cisteína	483 ppm sulfito de sodio	2351	66
1% caseína	483 ppm sulfito de sodio	2362	74

Tabla 29: Efecto de varios niveles de concentración en la reducción de acrilamida en hojuelas de papa sin un agente de reducción.

La tabla 28 indica que 1% de adición de caseína falla en reducir los niveles de acrilamida en hojuelas de papa sin un agente reductor. La tabla 29, sin embargo, revela que la adición de un agente de reducción (483 ppm de sulfito de sodio) resulta en una reducción de 10% de acrilamida sobre el sulfito de sodio solo.

El tiol y el agente de reducción es menos efectivo en reducir los niveles de acrilamida en las muestras de hojuelas de papa (tabla 28 y 29) que en soluciones de hojuelas sin papa. Existen varias razones potenciales que explican estos. Por ejemplo, la acrilamida se agrega en muestras de hojuelas sin papa pero que se forman en muestras de hojuelas de papa. Así, la formación de acrilamida es probablemente más importante que la descomposición. Adicionalmente, no se optimizan las condiciones para las hojuelas de papa. El pH de las hojuelas de papa no se ajusta al pH 7, que puede incrementar la reactividad de la cisteína con acrilamida.

En una modalidad, el compuesto libre de tiol 1306 se selecciona del grupo que consiste de cisteína, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatona reducida, ditiotreitól, caseína, y combinaciones de estos. En una modalidad, el agente reductor 1304 se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de cloruro estañoso, sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, ácido ascórbico, derivados de ácido ascórbico, ácido isoascórbico

(ácido eritórbito), sales de derivados de ácido ascórbico, hierro, zinc, iones de hierro, y combinaciones de estos.

Una ventaja de la presente invención es que la misma reducción de acrilamida se puede lograr al utilizar menos tiol libre cuando el compuesto de tiol libre se mezcla con un agente de reducción. Así, el sabor indeseable se puede reducir o eliminar. La reducción de acrilamida se puede lograr al utilizar compuesto de tiol libre y agente de reducción en cualquier alimento pasabola basado en pasta. Otro beneficio de la presente invención es el beneficio nutricional inherente asociado con algunos agentes de reducción. El ácido ascórbico, por ejemplo, también es conocido como vitamina C.

Mientras la invención se ha descrito y mostrado particularmente con referencia a varias modalidades, se entenderá por aquellos expertos en la técnica que se pueden hacer varias otras aproximaciones a la reducción de acrilamida en alimentos procesados térmicamente mediante el uso de aditivos de agente reductor y tiol libre sin apartarse del espíritu y alcance de esta invención. Por ejemplo, mientras se han descrito los procesos con respecto a los productos de papa y maíz, los procesos también se pueden utilizar en el procesamiento de productos alimenticios hechos de cebada, trigo, centeno, arroz, avena, millo, y otros granos basados en almidón, así como también otros alimentos que contienen asparagina y un azúcar reductor, tal como papas dulces, cebolla, y otros vegetales. Adicionalmente, el proceso se ha demostrado en trozos de papa y trozos de maíz, pero se puede utilizar en el procesamiento de

muchos otros productos alimenticios fabricados, tal como otros tipos de trozos de pasabola, cereales, galletas, pretzels, panes y rollos, y comidas a bases de pan.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un método para reducir la cantidad de acrilamida producida por procesamiento térmico de un alimento fabricado que contiene asparagina libre y azúcares simples, dicho método comprende las etapas de:

a) agregar un compuesto tiol libre a una pasta basada en almidón para un alimento procesado térmicamente;

b) agregar un agente reductor a dicho pasta basada en almidón; y

c) procesar térmicamente dicho producto de alimento.

2. El método de la Reivindicación 1, en donde dichas etapas de adición a) y b) agregan una cantidad de dicho compuesto de tiol libre y dicho agente de reducción que es suficiente para producir un nivel final de acrilamida en dicho alimento procesado térmicamente que es más bajo que el nivel final de acrilamida en un mismo alimento procesado térmicamente elaborado con dicho tiol libre y sin dicho agente de reducción.

3. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho tiol libre en la etapa a) comprende adicionalmente una primer concentración

156

de tiol y en donde un nivel final de acrilamida en dicho alimento procesado térmicamente que es más bajo que el nivel final de acrilamida en un mismo alimento procesado térmicamente elaborado con dicho tiol libre en dicha primera concentración sin dicho agente de reducción.

4. El método de la Reivindicación 1, en donde dichas etapas de adición a) y b) agregan una cantidad de dicho compuesto de tiol libre y dicho agente de reducción que es suficiente para producir un nivel final de acrilamida en dicho alimento procesado térmicamente que es al menos un 5 por ciento adicional menor que el nivel final de acrilamida en un mismo alimento procesado térmicamente elaborado con dicho tiol libre y sin dicho agente de reducción.

5. El método de la Reivindicación 1 en donde dicho compuesto de tiol libre se selecciona del grupo que consiste de cisteína, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatona reducida, di-tiotreitól, caseína, y combinaciones de estos.

6. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho agente de reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de cloruro estañoso, sulfito de sodio, meta-bisulfito de sodio, ácido ascórbico, derivados de ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbico), sales de derivados de ácido ascórbico, hierro, cinc, iones ferrosos, y combinaciones de estos.

7. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho compuesto de tiol libre comprende cisteína y dicho agente de reducción comprende ácido ascórbico.

8. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho agente de reducción comprende una potencial reducción estándar entre aproximadamente +0.2 y aproximadamente -2.0 voltios.

9. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho agente de reducción en dicha pasta basada en almidón en la etapa b) está presente en una concentración de menos de 2,000 partes por millón.

10. El método de la Reivindicación 1, en donde la pasta basada en almidón comprende un componente de almidón seleccionado del grupo que consiste de papas, maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, avena, y mijo.

11. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho alimento procesado térmicamente comprende trozos fabricados.

12. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho alimento procesado térmicamente comprende trozos de maíz fabricados.

13. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho alimento procesado térmicamente comprende un cereal para el desayuno.

14. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho alimento procesado térmicamente comprende un bizcocho

158

15. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho alimento procesado térmicamente comprende una galleta.

16. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho alimento procesado térmicamente comprende un pretzel.

17. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho alimento procesado térmicamente comprende un producto de pan.

18. El alimento procesado térmicamente producido por el método de la Reivindicación 1.

19. Un método para preparar trozos fabricados, dicho método comprende las etapas de:

a) preparar una pasta que comprende hojuelas de papa, agua, un compuesto tiol libre y un agente de reducción, en donde dicho compuesto de tiol libre y dicho agente de reducción se agregan en cantidades suficientes para reducir la cantidad de acrilamida producida por procesamiento térmico de dicha masa a un nivel predeterminado

b) laminar y cortar dicha mezcla para formar piezas de corte;

c) procesar térmicamente dichas piezas de corte para formar trozos de papa.

20. El método de la Reivindicación 19, en donde dicho nivel predeterminado es menor que un nivel de acrilamida que se debería producir en un trozo de papa preparado de la misma forma pero sin dicho agente de reducción.

21. El método de la Reivindicación 19, en donde dicho nivel predeterminado es al menos adicionalmente 5 por ciento menor que un nivel de acrilamida que debería ser producido en un trozo de papa preparado de la misma forma pero sin dicho agente de reducción.

22. El método de la Reivindicación 19, en donde dicho compuesto de tiol libre se selecciona del grupo que consiste de cisteína, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatona reducida, ditiotreitól, caseína, y combinaciones de estos.

23. El método de la Reivindicación 19, en donde dicho agente de reducción se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de cloruro estañoso, sulfito de sodio, meta-bisulfito de sodio, ácido ascórbico, derivados de ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbico), sales de derivados de ácido ascórbico, hierro, cinc, iones ferrosos, y combinaciones de estos.

24. El método de la Reivindicación 19, en donde dicho compuesto de tiol libre comprende cisteína y dicho agente de reducción comprende ácido ascórbico.

~~2005~~
25. El método de la Reivindicación 19, en donde dicho agente de reducción comprende una reducción estándar potencial entre aproximadamente +0.2 y aproximadamente -2.0 voltios.

26. El método de la Reivindicación 19, en donde dicho agente de reducción en dicha pasta en la etapa a) está presente en una concentración de menos de 2,000 partes por millón.

27. El método de la Reivindicación 19, en donde dicha etapa de procesamiento térmico c) comprende horneado.

28. El método de la Reivindicación 19, en donde dicha etapa de procesamiento térmico c) comprende freimiento.

29. Los trozos de papa fabricados producidos por el método de la Reivindicación 19.

30. Un método para preparar trozos de papa, dicho método comprende las etapas de:

a) se parten en rodajas papas crudas para formar rodajas de papas;

b) sumergir dichas rodajas de papas en una solución que tiene un compuesto tiol libre y un agente reductor para reducir el nivel de acrilamida en dichos trozos de papa a un nivel predeterminado;

c) procesar térmicamente dichas rodajas de papas para formar trozos de papa.

161

31. El método de la Reivindicación 30, en donde dicho nivel predeterminado es menor que un nivel de acrilamida que debería ser producido en un trozo de papa preparado en la misma forma pero sin dicho agente de reducción.

32. El método de la Reivindicación 30, en donde dicho nivel predeterminado es al menos adicionalmente 5 por ciento menor que un nivel de acrilamida que debería ser producido en un trozo de papa preparado en la misma forma pero sin dicho agente de reducción.

33. El método de la Reivindicación 30, en donde dicho compuesto de tiol libre en la etapa b) se selecciona del grupo que consiste de cisteína, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-cisteamina, glutatióna reducida, di-tiotreitól, caseína, y combinaciones de estos.

34. El método de la Reivindicación 30, en donde dicho agente de reducción en la etapa b) se selecciona del grupo que consiste de dihidrato de cloruro estañoso, sulfito de sodio, meta-bisulfito de sodio, ácido ascórbico, derivados de ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbico), sales de derivados de ácido ascórbico, hierro, cinc, iones ferrosos, y combinaciones de estos.

35. El método de la Reivindicación 30, en donde dicho agente de reducción en la etapa b) comprende una reducción estándar potencial entre aproximadamente +0.2 y aproximadamente -2.0 voltios.

~~16~~

36. El método de la Reivindicación 30, en donde dicha etapa de sumergir b) reduce un nivel final de acrilamida en dicho alimento procesado térmicamente que es más bajo que el nivel final de acrilamida en un mismo alimento procesado térmicamente made sin dicho agente de reducción.

37. El método de la Reivindicación 30, en donde dicha etapa de remojo b) reduce un nivel final de acrilamida adicionalmente 5 por ciento menor que un nivel de acrilamida que debería ser producido en un trozo de papa preparado en la misma forma pero sin dicho agente de reducción.

38. El método de la Reivindicación 30, en donde dicha etapa de procesamiento térmico c) comprende horneado.

39. El método de la Reivindicación 30, en donde dicha etapa de procesamiento térmico c) comprende freimiento.

40. Los trozos de papa producido por el método de la Reivindicación 30.

~~163~~**RESUMEN:**

Una combinación de compuesto de tiol libre y un agente reductor se agregan a un alimento fabricado antes de cocción con el fin de reducir la formación de acrilamida. El producto alimenticio fabricado puede ser un trozo de maíz o de papa. Alternativamente un producto pasabola no fabricado, tal como un trozo de papa de una rebanada de papa se puede poner en contacto con una solución que contiene un compuesto de tiol libre y un agente reductor. El agente reductor puede incluir cualquier compuesto soluble que es un donante de electrones o combinación de tales compuestos. El compuesto de tiol libre y el agente reductor se pueden agregar durante el molido, mezcla en seco, mezcla en húmedo u otra mezcla, de tal forma que los agentes están presentes a través del producto alimenticio. La combinación del agente reductor y el compuesto de tiol libre se pueden ajustar con el fin de reducir la formación de acrilamida en el producto terminado a un nivel deseado mientras que afecta mínimamente la calidad y características del producto final.

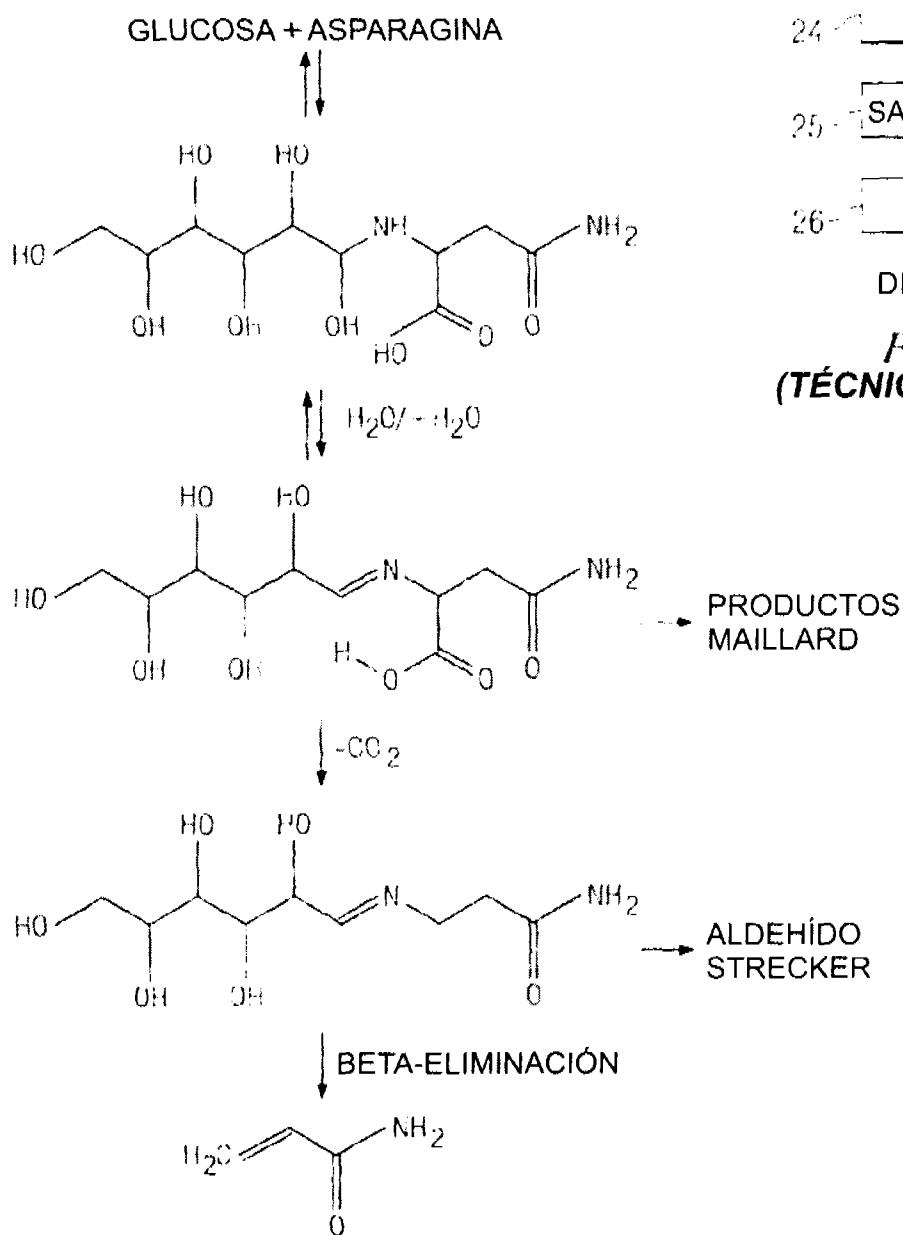


FIG. 1

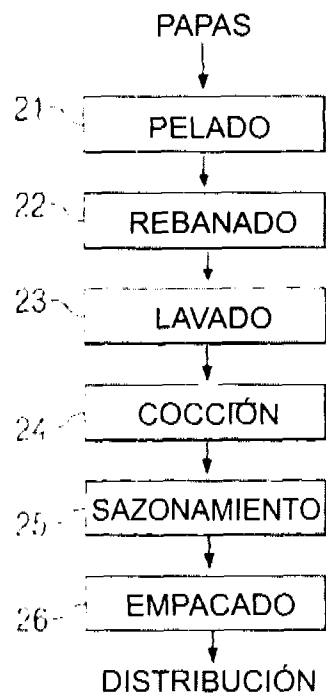


FIG. 2
(TÉCNICA ANTERIOR)

FIG. 3A

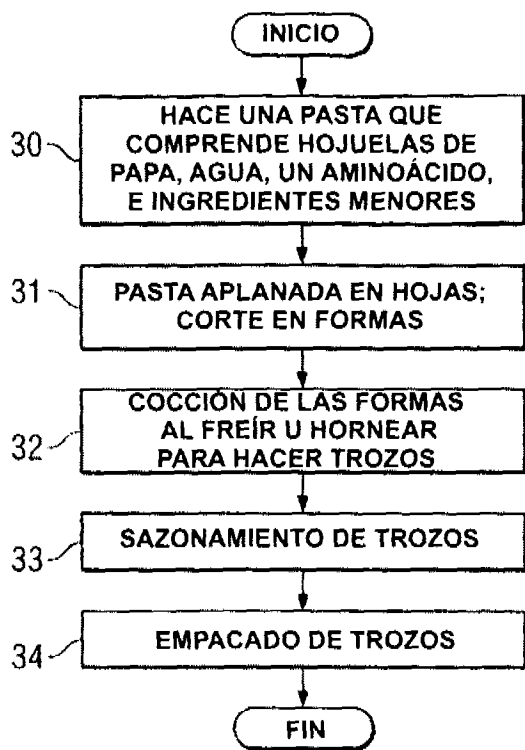
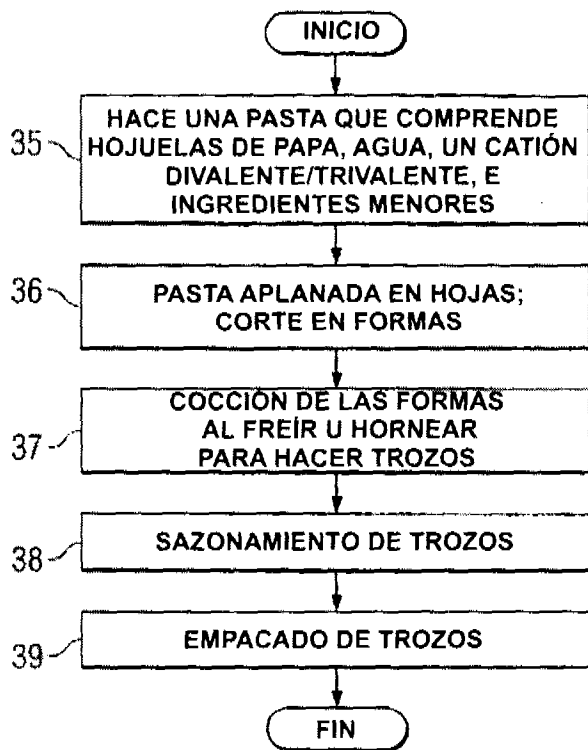


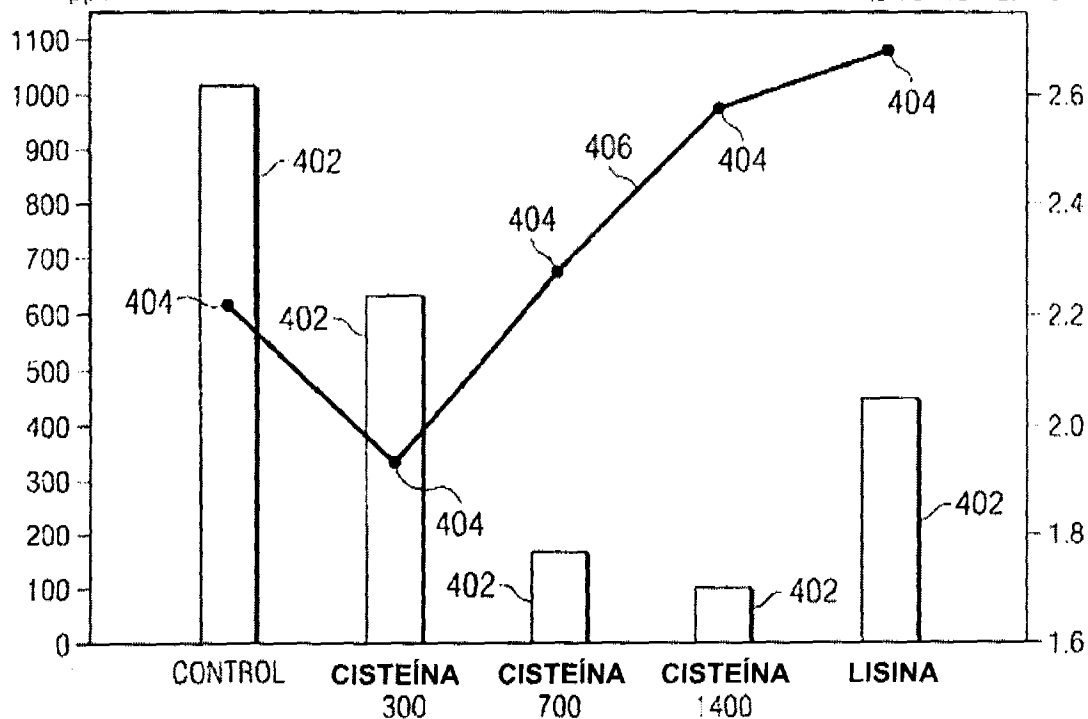
FIG. 3B



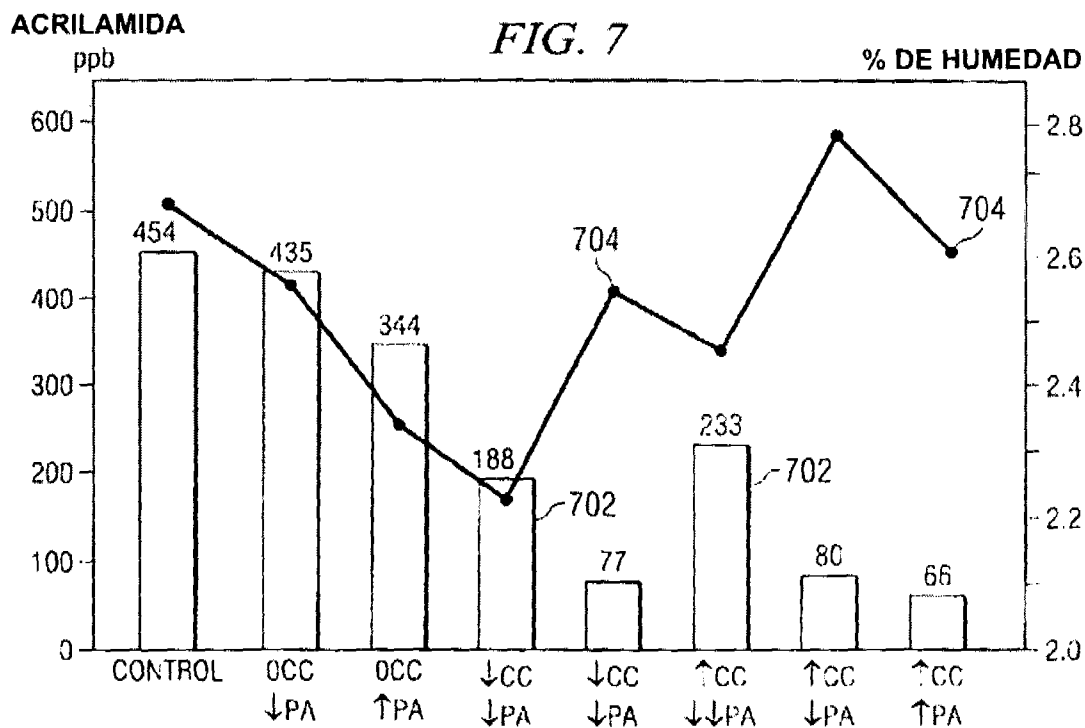
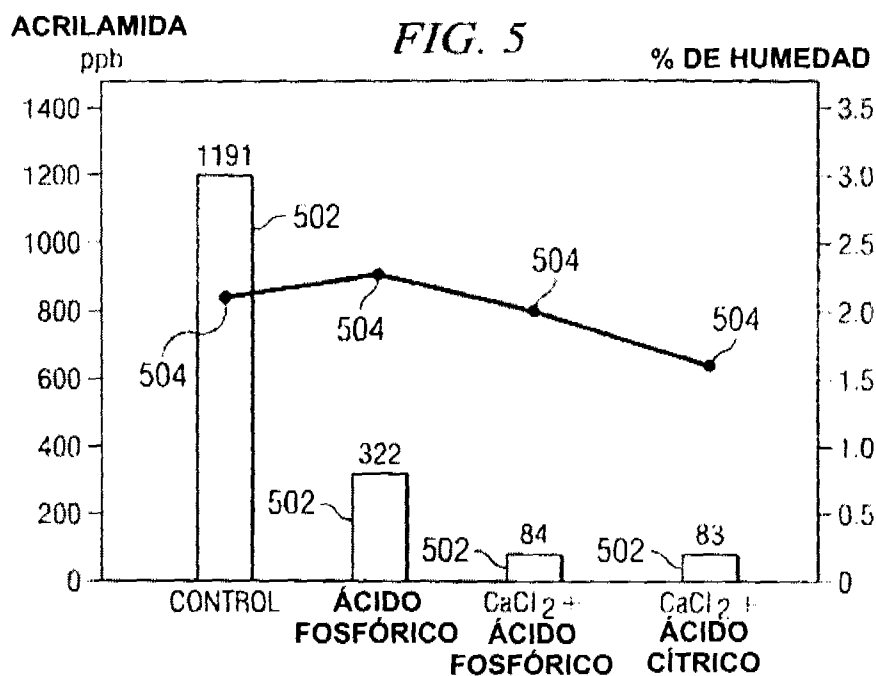
ACRILAMIDA
ppb

FIG. 4

% DE HUMEDAD



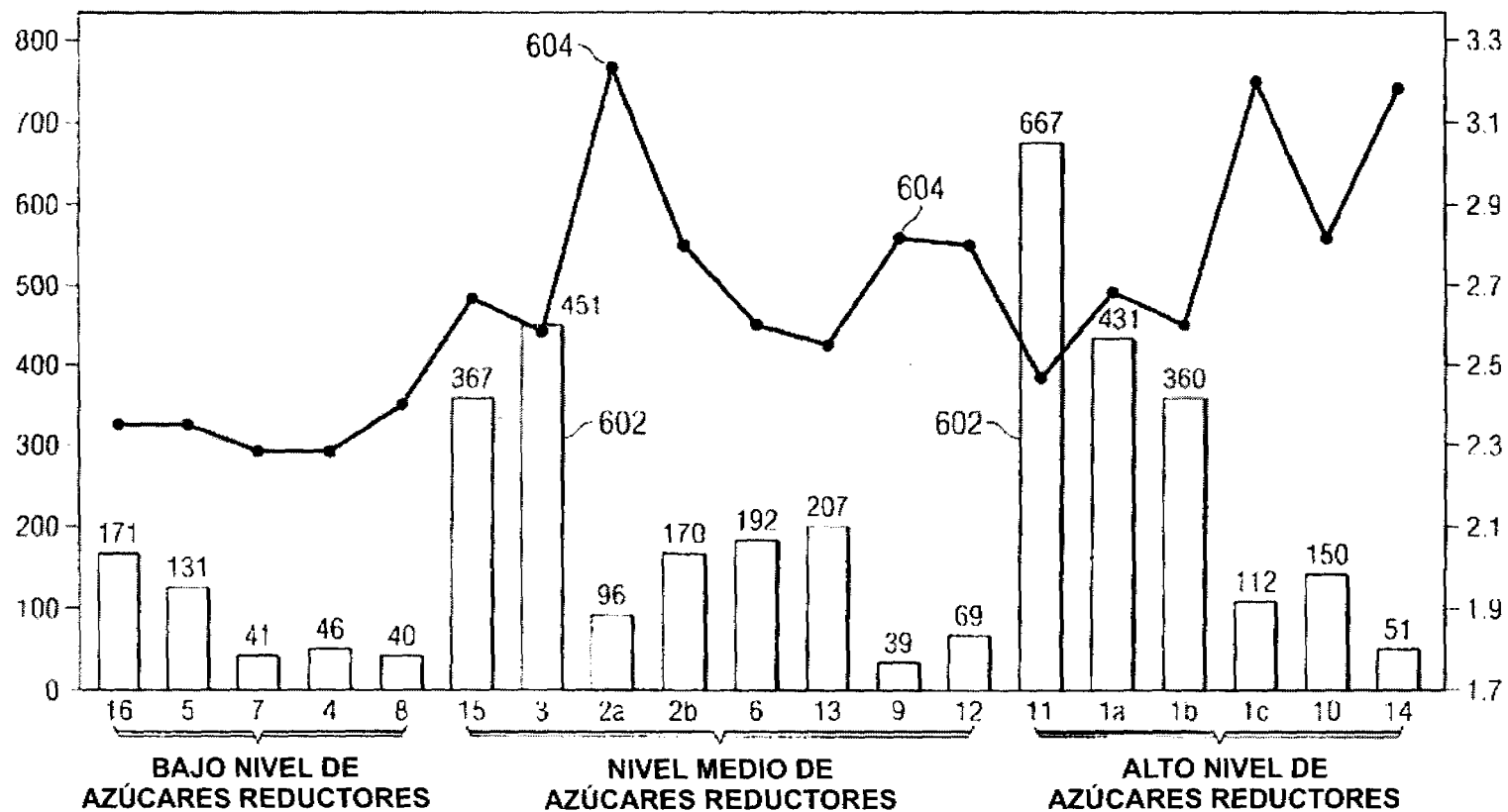
166



ACRÍLAMIDA ppb-
GRÁFICO DE BARRAS

FIG. 6

% DE HUMEDAD-
PUNTOS CONECTADOS



4/8

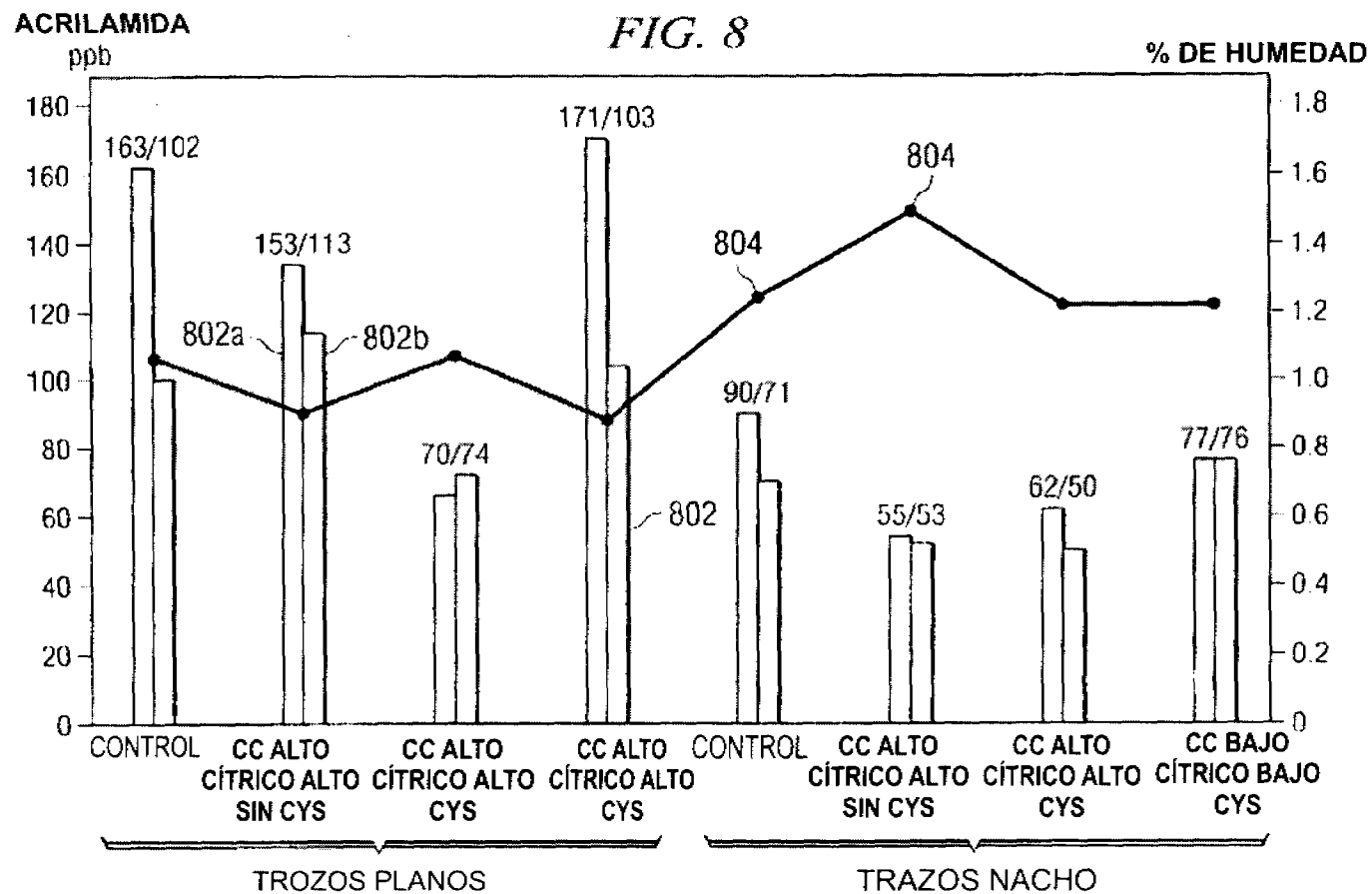
MO 2006076084

PC 11-2005043302

4/8

4/8

118



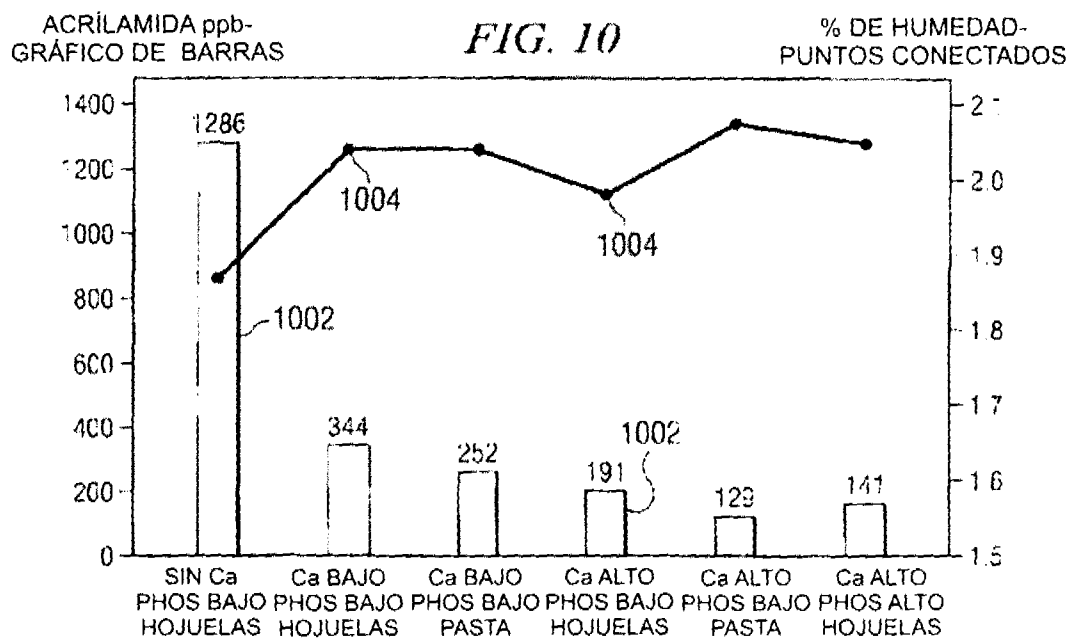
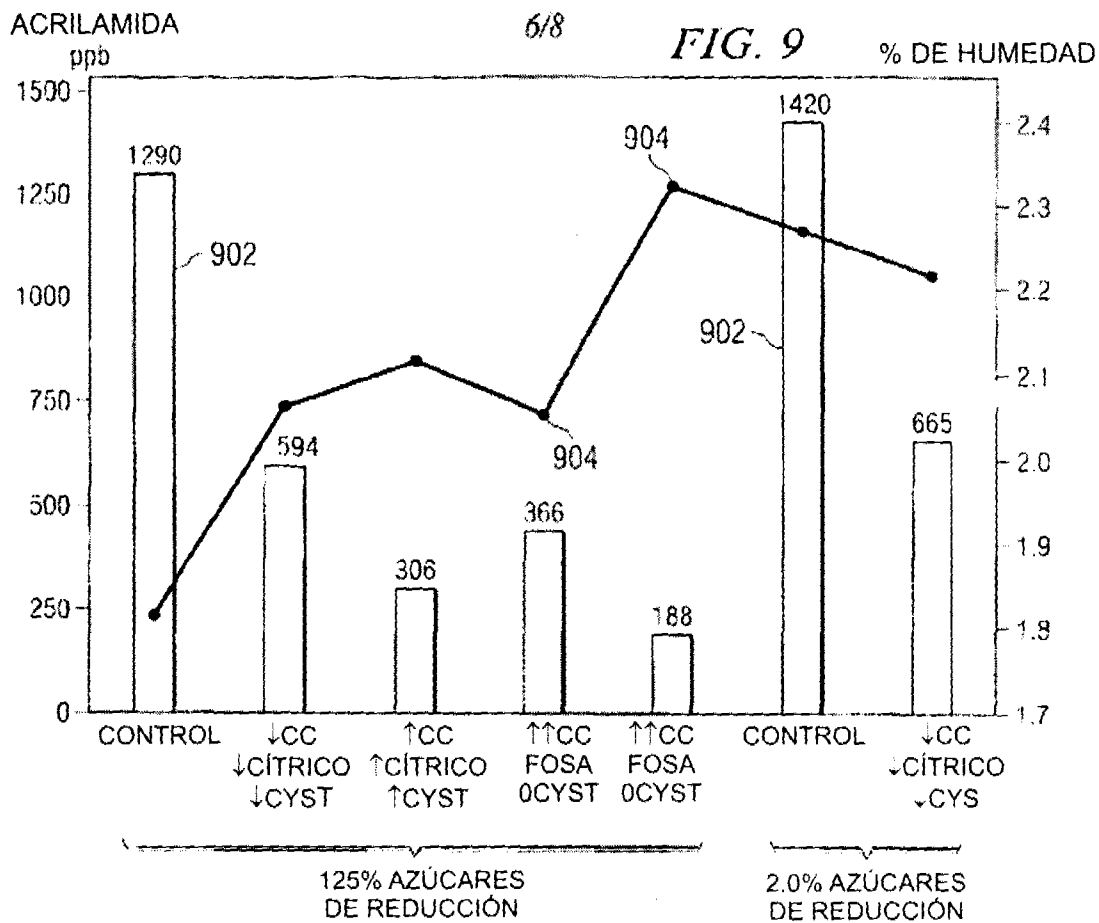
WQ 2006/076084

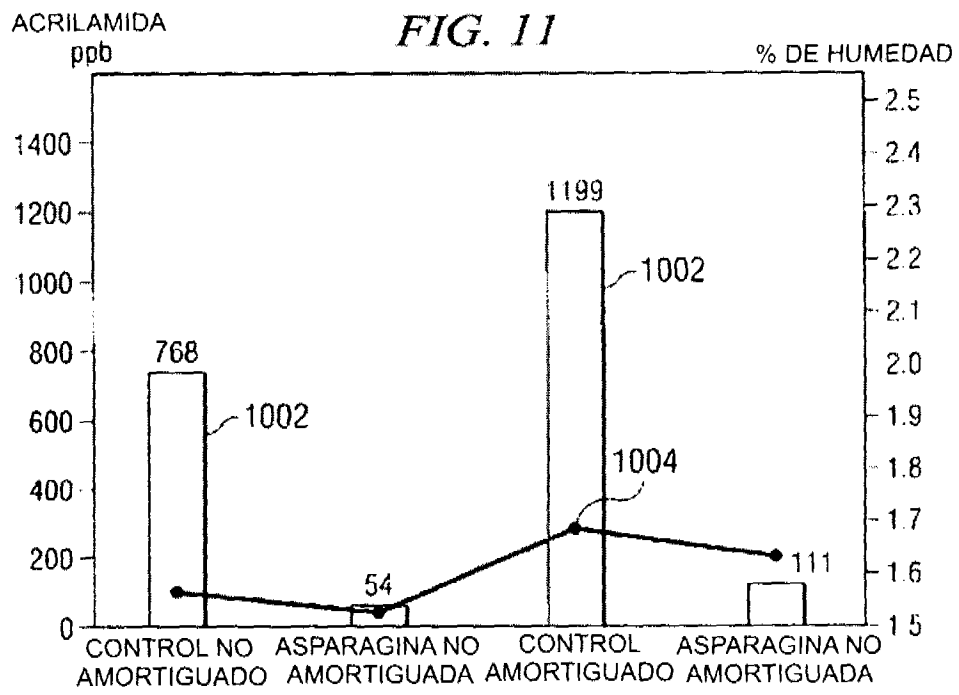
5/8

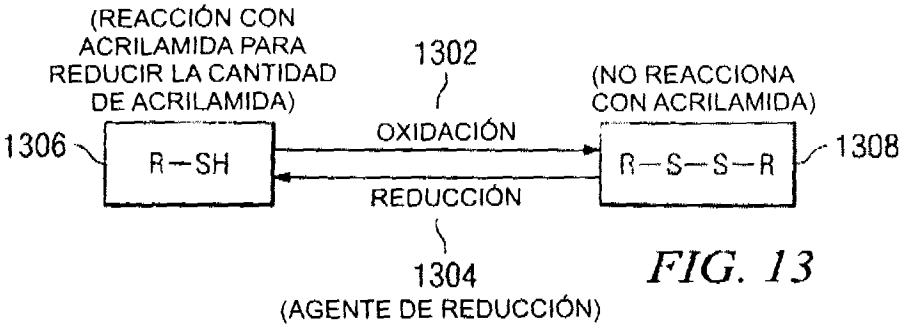
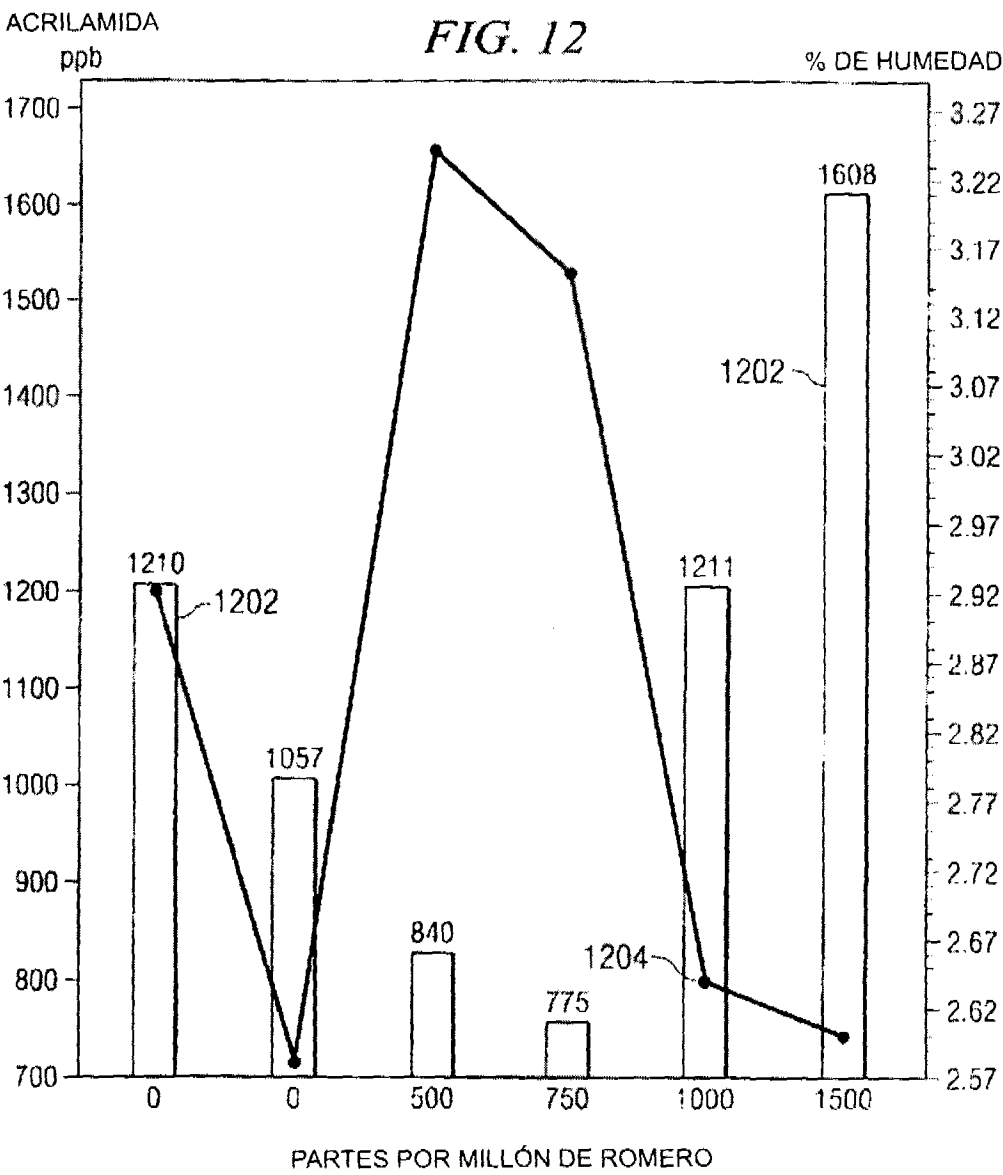
PC 1.0.2005.04.30.2

Handwritten signature

Handwritten signature







INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/43302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A21D 2/00(2006.01) USPC: 426/549 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 426/549, 531 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category *</th> <th style="width:60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;">US 5,514,387 A (ZIMMERMAN et al) 7 May 1996 (07.05.1996)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-40</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5,514,387 A (ZIMMERMAN et al) 7 May 1996 (07.05.1996)	1-40
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	US 5,514,387 A (ZIMMERMAN et al) 7 May 1996 (07.05.1996)	1-40						
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.								
<table style="width:100%;"> <tr> <td colspan="2" style="padding-bottom: 5px;"> * Special categories of cited documents: </td> </tr> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top; padding-bottom: 5px;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width:50%; vertical-align: top; padding-bottom: 5px;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
* Special categories of cited documents:								
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family							
Date of the actual completion of the international search 30 August 2006 (30.08.2006)		Date of mailing of the international search report 22 SEP 2006						
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer DEBORAH A. THOMAS Leslie Wong PARALEGAL SPECIALIST Telephone No. 571-272-0987 Jut						

173

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

CAHOON, Colin, P.
Carstens & Cahoon, LLP
P.O. Box 802334
Dallas, TX 75380
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2006 (22.03.2006)	
Applicant's or agent's file reference CFLAY.00262PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/043302	International filing date (day/month/year) 29 November 2005 (29.11.2005)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 11 January 2005 (11.01.2005)
Applicant FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC. et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
11 January 2005 (11.01.2005)	11/033,364	US	20 February 2006 (20.02.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Carlos Roy - Gijsbertus Beijer

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Telephone No. +41 22 338 95 61

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (October 2005)

CSHS91V8

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A21D 2/00	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. 11/033,364	32) Fecha 11/01/05	(33) País US
		(72) Inventor(es) ELDER, Vincent Allen	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 11/08/07		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 20/07/06
	Fecha de presentación de la solicitud: 29/11/05		N° publicación: WO/2006/076084
	No. de solicitud PCT/US2005/043302		
(54) Título: MÉTODO PARA MEJORAR LA DESCOMPOSICIÓN DE ACRILAMIDA			

Reivindicación(es):

1. Un método para reducir la cantidad de acrilamida producida por procesamiento térmico de un alimento fabricado que contiene asparagina libre y azúcares simples, dicho método comprende las etapas de:
 - a) agregar un compuesto tiol libre a una pasta basada en almidón para un alimento procesado térmicamente;
 - b) agregar un agente reductor a dicho pasta basada en almidón; y
 - c) procesar térmicamente dicho producto de alimento.