



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 431**

51 Int. Cl.:
A23J 1/20 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02745586 .4**
86 Fecha de presentación : **05.07.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1406507**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Métodos de extracción de caseína a partir de leche y caseinatos y producción de productos novedosos.**

30 Prioridad: **06.07.2001 GB 0116509**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **THE HANNAH RESEARCH INSTITUTE
Ayr, Ayrshire KA6 5HL, GB**

72 Inventor/es: **Law, Andrew y
Leaver, Jeff**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 282 431 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de extracción de fracciones de caseína a partir de leche y caseinatos y producción de productos novedosos.

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a un método novedoso para precipitar de manera selectiva fracciones de caseína a partir de leche desnatada o caseinatos mediante la adición de una sal de calcio a pH alcalino.

10 La invención se refiere en particular a la preparación de fracciones puras de α_s -caseína y β -caseína, y por primera vez una fracción altamente enriquecida en κ -caseína. Los productos son adecuados para su uso en alimentos o para preparar materiales alimenticios novedosos y el método puede usarse a una escala industrial. Las fracciones de caseína purificadas tienen propiedades distintivas y tienen una amplia variedad de usos, incluyendo la estabilización de emulsiones y espumas, la preparación de preparaciones o fórmulas para lactantes adecuadas para su uso por los que padecen trastornos metabólicos, tales como fenilcetonuria (PKU), y la fabricación de recubrimientos comestibles y plásticos biodegradables. Las fracciones también son particularmente adecuadas como materiales de partida para procesos que implican proteólisis limitada para producir nuevos sabores de queso, nutracéuticos y una amplia variedad de péptidos bioactivos. Estos incluyen fosfopéptidos y otros péptidos bioactivos con funciones antimicrobianas, antihipertensoras, inmunomoduladoras, antitrombóticas y opioides.

20 Los productos lácteos forman una parte muy importante de la dieta humana, siendo la producción mundial total de leche de vaca en 1998 de aproximadamente 57 millones de toneladas. La leche en sí es una mezcla relativamente compleja, siendo los constituyentes principales grasa, minerales, azúcar (lactosa) y proteína. Las proteínas están presentes en la leche a una concentración de aproximadamente 35 g/l, y pueden dividirse de manera conveniente en dos clases principales -las caseínas, que quedan retenidas en la cuajada, y las proteínas de suero, que se mantienen en el líquido residual durante la fabricación del queso.

30 Las caseínas representan el 80% de la proteína en la leche y se encuentran, junto con gran parte del calcio y fosfato, en partículas coloidales de tamaño submicrométrico, que se denominan micelas de caseína. La dispersión de la luz por las micelas de caseína da a la leche su apariencia blanca característica. La integridad de las micelas de caseína es crucial para la estabilidad de la leche y las propiedades de los productos preparados a partir de la leche están determinadas en parte por las propiedades de las micelas. Por ejemplo, se sabe que la firmeza de los quesos puede correlacionarse directamente con el diámetro promedio de las micelas en la leche a partir de la cual se preparan. Se estimó que la producción mundial de queso era de alrededor de 15 millones de toneladas en 1998. Cada vez se consumen más proteínas de leche, no como leche líquida, sino como ingredientes en productos que se han procesado en un grado mayor o menor. El grado de procesamiento varía desde yogurt y fabricación de queso casero, en los que se induce a las micelas para que se agreguen mediante acidificación, hasta la incorporación de fracciones de proteínas de leche en salsas y cremas para untar.

40 Cuando se acidifica la leche hasta pH 4,6, el fosfato de calcio se disuelve de las micelas de caseína y se deteriora la estructura micelar, provocando que la caseína se agregue y precipite. Este procedimiento se usa en la fabricación de caseinato de sodio, que se prepara volviendo a suspender el precipitado de caseína ácido en solución acuosa mediante la adición de hidróxido de sodio hasta aproximadamente pH 7,0, seguido por secado. Otras formas de caseinato con propiedades funcionales diferentes, tales como caseinato de calcio o caseinato de amonio, pueden obtenerse ajustando la caseína a pH 7,0 con el hidróxido de calcio o amonio apropiado. La producción mundial anual de caseína y caseinatos es alrededor de 250.000 toneladas. Los caseinatos se usan en la fabricación de una amplia variedad de alimentos procesados cuando se hace uso de sus excelentes propiedades espumantes, emulsionantes y de unión a agua.

50 La caseína de la leche de vaca se compone de cuatro proteínas diferentes, concretamente κ -, β -, α_{s1} y α_{s2} -caseína. La composición de la caseína completa, en promedio, es el 11,0% de κ ; el 35,0% de β ; el 36,0% de α_{s1} y el 10,0% de α_{s2} , siendo el resto productos de descomposición de las caseínas principales. Las caseínas individuales tienen pesos moleculares y puntos isoeléctricos bastante similares, y tienen altas afinidades por Ca^{2+} y fosfato inorgánico, pero tienen propiedades y secuencias de aminoácidos completamente diferentes.

55 Tras la biosíntesis, todas las caseínas experimentan fosforilación en residuos de aminoácido serina y ocasionalmente treonina en las secuencias de tripéptidos características -Ser/Thr-X-A, en las que X representa cualquier residuo de aminoácido y A es un residuo de aminoácido ácido tal como Asp, Glu, SerP o ThrP. Estos centros de fosfato son importantes porque están implicados en la unión de fosfato de calcio y en el mantenimiento de la estructura micelar de la caseína. De esta forma, tanto la proteína como el fosfato de calcio, que son importantes en la nutrición, se mantienen a concentraciones altas estables en la leche. Las α_{s1} y α_{s2} -caseínas son las que tienen más grupos serina fosfato en su estructura, las más altas cargas negativas netas a pH alcalino, y las mayores afinidades por Ca^{2+} . La β -caseína es intermedia en estos aspectos, mientras que la κ -caseína tiene sólo un grupo serina fosfato, la carga negativa más baja y la menor afinidad por Ca^{2+} .

65 Las caseínas como grupo son muy hidrófobas y, cuando se deteriora la estructura micelar, tienen una alta tendencia a agregarse en solución acuosa, siendo la β -caseína la más hidrófoba, las α_{s1} y α_{s2} -caseínas intermedias, y la κ -caseína la menos hidrófoba. La κ -caseína difiere también de las otras caseínas porque se encuentra en la leche como una serie de polímeros unidos por disulfuros, y contiene cadenas laterales de hidratos de carbono.

Las caseínas tienen una estructura abierta y experimentan fácilmente proteólisis, pero muestran diferentes vulnerabilidades a una amplia variedad de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, las β y α_{s2} -caseínas se atacan más fácilmente que las otras caseínas por plasmina, que está presente en la leche. La κ -caseína también experimenta fácilmente proteólisis específica con quimosina, y esto forma la base del proceso de cuajado que se produce durante la fabricación de queso. La parte hidrófila de la κ -caseína que sobresale de la superficie de las micelas y que normalmente mantiene su estabilidad, se rompe, permitiendo al resto de la caseína agregarse y formar la cuajada. El fragmento de la κ -caseína roto en el suero (el caseinomacropéptido (CMP)) tiene propiedades distintivas y, puesto que no contienen aminoácidos aromáticos, es útil como una proteína alimenticia para los sujetos que padecen el trastorno metabólico genético fenilcetonuria (PKU).

Específicamente, la fracción de κ -caseína es poco corriente porque se rompe de una forma específica por la enzima quimosina en dos partes bien definidas -para κ -caseína y CMP. Se ha notificado que CMP tiene propiedades farmacológicas útiles. En particular, no contienen aminoácidos aromáticos, y no contiene específicamente fenilalanina. Esto es particularmente significativo porque CMP es una posible fuente de proteína esencial para pacientes que padecen PKU. PKU es un estado metabólico en el que los sujetos son incapaces de metabolizar los aminoácidos aromáticos fenilalanina. El estado es tal que si se consume fenilalanina, se acumula en el torrente sanguíneo y en el tejido cerebral y puede provocar en última instancia trastornos mentales graves. El estado es grave y todos los lactantes en el Reino Unido se investigan rutinariamente poco después del nacimiento para identificar el estado, y para tomar medidas para modificar la dieta para excluir la fenilalanina. Sin embargo, se conocen pocas proteínas naturales que estén completamente libres de este aminoácido. Como resultado, los requisitos dietéticos de aquellos que padecen PKU se cumplen mediante una mezcla de aminoácidos de la cual se ha eliminado la fenilalanina mediante tratamiento enzimático específico. Estas mezclas son relativamente eficaces como nutrientes, pero son caras de fabricar y de sabor desagradable.

Sin embargo, el CMP, tal como se fabrica a partir de la fracción κ -caseína descrita en el presente documento, ofrece una fuente alternativa práctica de aminoácidos esenciales sin el peligro concomitante de ingestión de fenilalanina.

Técnicas de la técnica anterior para fraccionar caseínas

En la leche, las cuatro caseínas individuales, κ , β , α_{s1} y α_{s2} -caseínas, están estrechamente asociadas con microgránulos de fosfato de calcio en forma micelar. Con el fin de fraccionar las caseínas, es necesario deteriorar al menos parcialmente la estructura micelar mediante cierta combinación de acidificación, cuajado, enfriamiento o adición de un agente quelante. Las caseínas son de naturaleza hidrófoba y, una vez disociadas de las micelas, ha de impedirse que vuelvan a agregarse mediante la adición de un agente caotrópico o enfriamiento. Entonces pueden separarse las caseínas individuales basándose en las diferencias en su carga negativa neta, afinidad por Ca, o hidrofobicidad.

La técnica más comúnmente usada a escala de laboratorio para separar las cuatro caseínas principales es cromatografía de intercambio aniónico. La resolución de las caseínas individuales depende principalmente de las diferencias en las cargas negativas netas de las proteínas a pH alcalino, y de su afinidad por un medio de columna cargado positivamente. Todas las separaciones requieren que la caseína se disocie en concentraciones altas de un medio caotrópico tal como urea (> 3,3 M) y que se trate en presencia de un agente reductor tal como 2-mercaptoetanol para reducir los enlaces disulfuro en la serie de polímeros de κ -caseína (JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 49, 1966, páginas 792-795. Thompson, M.P. "DEAE-Cellulose-urea chromatography of casein in the presence of 2-mercaptoethanol"). Las características de resolución y flujo de los medios de columna han mejorado con los años, pero la técnica no se amplía a escala fácilmente. También, incluso con diálisis exhaustiva de las fracciones, están presentes algunos materiales tóxicos residuales, y las fracciones de caseína no son adecuadas para su uso en alimentos.

La separación de las caseínas principales a partir de la caseína completa se ha logrado también a escala de laboratorio usando cromatografía de intercambio catiónico en la que la separación se basa en la carga positiva neta de las caseínas a pH ácido y su unión a un medio de columna cargado negativamente (JOURNAL OF DAIRY RESEARCH vol. 36, 1969, páginas 259-268. Annan, W.D. y Manson, W. "A fractionation of the as-casein complex of cows' milk"; JOURNAL OF DAIRY RESEARCH vol. 59, 1992, páginas 557-561. Leaver, J. y Law, A.J.R. "Preparative-scale purification of bovine caseins on a cationexchange resin"). La cromatografía de intercambio catiónico no se amplía a escala fácilmente, y requiere la presencia de altas concentraciones de un agente de disociación tal como urea (> 3,3 M), y un tratamiento de reducción previo con un material tal como 2-mercaptoetanol. Por tanto, las fracciones de caseína no son adecuadas para consumo humano.

Otro método de laboratorio usado ocasionalmente para el fraccionamiento parcial de las caseínas implica la adición de una alta concentración de urea, como agente caotrópico, a caseína completa, para provocar la disociación de las caseínas individuales. Se obtiene entonces una separación en bruto de los componentes de α_s , β y κ -caseína basándose en la solubilidad diferencial en urea (JOURNAL OF DAIRY CHEMISTRY vol. 46, 1963, páginas 1183-1188. Zittle, CA. y Custer, J.H. "Purification and some properties of α_s -casein and κ -casein). Debido a la muy alta concentración de urea (6,6 M) requerida para disociar la caseína, no es práctico económicamente realizar estas separaciones a gran escala, y los productos no son adecuados como materiales alimenticios.

También puede obtenerse un fraccionamiento en bruto de las caseínas principales según sus solubilidades en etanol en presencia de diversas sales (JOURNAL OF DAIRY SCIENCE vol. 35, 1952, páginas 272-281. Hipp, N.J., Groves, M.L., Custer, J.H. y McMeekin, T.L. "Separation of α -, β - and γ -casein"). Se han usado los refinamientos de este procedimiento para obtener fracciones purificadas de κ -caseína a partir de mezclas que contienen α_s y β -caseínas

(BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA vol. 47, 1961, páginas 240-242. McKenzie, H.A. y Wake, R.G. "An improved method for the isolation of κ -casein"; BIOCHEMISTRY vol. 9, 1970, páginas 2807-2813. Talbot, B y Waugh, D.F. "Micelle-forming characteristics of monomeric and covalent polymeric κ -caseins"). Estos métodos requieren altas concentraciones de etanol, y la mayoría de las sales usadas son tóxicas. La β -caseína es más hidrófoba que las otras caseínas principales y tiende a disociarse a bajas temperaturas cuando las interacciones hidrófobas son más débiles, incluso en su punto isoeléctrico. Por tanto, la β -caseína puede prepararse a partir de una solución de caseinato de sodio mediante precipitación isoeléctrica de las otras caseínas a pH 4,5 y 2°C, y precipitación de la β -caseína del sobrenadante calentando a 20°C (JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY vol. 67, 1944, páginas 1725-1731. Warner, R.C. "Separation of α - and β -casein").

El enfriamiento de la leche, particularmente a pH ácido, provoca disociación de algunas de las caseínas, particularmente β -caseína, a partir de las micelas. La fase líquida enriquecida en β -caseína puede separarse después de la otra fase merma en β -caseína. Esta solubilización inducida por frío de β -caseína, comenzando por la caseína de cuajo (el sólido obtenido en la etapa inicial de la fabricación de queso), se ha notificado (patente número WO9406306, "A process for producing beta-casein enriched products". Ram, S., Loh, DW., Love, DC. y Dudley, EP.; patente número US5397577 "Method for obtaining beta casein" Le Magnen, C. y Maugas, J-J.).

La patente US5397577 describe un procedimiento para extraer β -caseína a partir de una suspensión o solución de caseína de cuajo acidificando hasta un pH de 4 a 5 y enfriando hasta de -2 a 10°C. Se forman dos fases de las cuales la fase líquida contiene β -caseína y la fase sólida una mezcla de las otras α_s y κ -caseínas y esta sustancialmente libre de β -caseína.

La patente WO9406306 describe un procedimiento para la extracción parcial de β -caseína manteniendo una suspensión de materia prima de caseína en frío a un pH de entre 3,5 y 8,0 durante un tiempo adecuado y separando dicha suspensión en dos fases para obtener una fase sólida que es β -caseína reducida y una fase líquida que es β -caseína enriquecida.

La patente FR2592769 ("Process for producing a material enriched in beta-casein, apparatus for implementing this process, and application of the products obtained by this process as foodstuffs, food supplements or additives in the food and pharmaceutical industries." Terre, E., Maubois, J-L., Brule, G. y Alice, P.) describe un procedimiento para la producción de una fracción enriquecida en β -caseína y una fracción reducida de la misma manera o bien tratando la leche con un agente complejante de calcio o bien tratando una solución de caseinato con un agente que polimeriza toda la caseína y enfriando hasta de 0 a -7°C y sometiendo al material a microfiltración sobre una membrana inorgánica en flujo tangencial. El material microfiltrado se enriquece en β -caseína y el material retenido se reduce. La microfiltración a baja temperatura es muy lenta, haciendo al procedimiento menos atractivo industrialmente.

Puede obtenerse una separación parcial de las caseínas a escala de laboratorio mediante la adición de cloruro de calcio a pH neutro a leche o caseinato (JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY vol. 78, 1956, páginas 4576-4582. Waugh, DF y von Hippel, PH. " κ -Casein and the stabilization of casein micelles"; BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA vol. 47, 1961, páginas 240-242. McKenzie, HA y Wake, RG. "An improved method for the isolation of κ -casein"). Ambos métodos dan un precipitado de α_s y β -caseínas y un sobrenadante que contiene una mezcla de κ , α_s y β -caseínas. Estos métodos tienen las desventajas de que requieren centrifugación a alta velocidad para separar el precipitado fino del sobrenadante, y diálisis para eliminar el exceso de cloruro de calcio de la fracción enriquecida en κ -caseína, y por tanto no puede ampliarse a escala fácilmente. El uso de concentraciones altas de cloruro de calcio hace difícil la recuperación de la fracción enriquecida en κ -caseína, puesto que la caseína no experimentará la precipitación isoeléctrica normal. También, la adición de oxalato de potasio, que es tóxico, para eliminar el exceso de calcio, descarta el uso de esta fracción como material alimenticio.

Por tanto, los métodos previos de fraccionamiento de caseína que implican la precipitación selectiva de calcio se han llevado a cabo a pH neutro (JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY vol. 78, 1956, páginas 4576-4582. Waugh, DF y von Hippel, PH. " κ -Casein and the stabilization of casein micelles"; BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA vol. 47, 1961, páginas 240-242. McKenzie, HA y Wake, RG. "An improved method for the isolation of κ -casein"). Estos métodos describen la separación parcial de las proteínas obtenidas mediante la adición de cloruro de calcio a leche o caseinato, respectivamente, cerca de 7,0. Ambos métodos requirieron concentraciones superiores de cloruro de calcio (0,25-0,36 M) que en la presente precipitación alcalina (0,059-0,071 M), y la precipitación de las α_s y β -caseínas no se produjo fácilmente, pero en su lugar requirió centrifugación a alta velocidad. También, la alta concentración de cloruro de calcio en el sobrenadante impidió la posterior precipitación con ácido de la fracción de κ -caseína, y se requirieron la adición de oxalato para quelar el calcio y diálisis antes de que pudiera recuperarse la proteína. Por tanto, no fue posible ampliar a escala estos métodos, y los productos no eran adecuados para consumo humano.

Debido a la hidrofobicidad de los componentes individuales de la caseína, es difícil fraccionar las caseínas a gran escala, incluso aunque cada una de las proteínas tenga propiedades funcionales específicas que pueden ser interesantes para las industrias alimentaria y farmacéutica (PROCEEDINGS OF THE 25th INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 1998, páginas 74-86. Maubois, J.L. "Fractionation of milk proteins"). En la actualidad, por tanto, las caseínas tienden a usarse como una mezcla de las cuatro proteínas en lugar que como componentes individuales. Un método barato, sencillo de fraccionamiento de esta mezcla de proteínas sería beneficioso ya que permitiría a los fabricantes de alimentos y productos farmacéuticos usar ingredientes que actualmente son tan caros como para descartar su uso

a cualquier escala mayor que la de laboratorio. El objetivo de la presente invención es proporcionar un método que puede usarse a escala industrial para la producción de fracciones de caseína individuales en una forma adecuada para su uso en alimentos o productos alimenticios novedosos o en la preparación de nutracéuticos, fosfopéptidos y otros péptidos bioactivos.

5 La presente invención implica el fraccionamiento de las caseínas mediante la adición de un cloruro de calcio a leche o caseinato a pH alcalino. Las ventajas de llevar a cabo la precipitación selectiva a pH alcalino son que las α_s y β -caseínas sensibles al calcio precipitan más fácilmente, y pueden obtenerse sin centrifugación a alta velocidad. También, se requiere una concentración inferior de sal de calcio a pH alcalino, y la fracción enriquecida en κ -caseína puede obtenerse mediante precipitación con ácido sin el uso de agentes quelantes tóxicos o diálisis. El presente procedimiento, a diferencia del de pH neutro, puede llevarse a cabo a escala industrial, y los productos son adecuados para su uso en alimentos y materiales alimenticios novedosos y como materiales de partida para preparar nutracéuticos, fosfopéptidos, y una amplia variedad de péptidos bioactivos.

15 Además, el procedimiento descrito en esta solicitud permite la separación práctica eficaz y barata de CMP a partir de mezclas de proteína de suero, caseína y proteosa peptonas encontradas en la leche y el suero. Los métodos convencionales de fabricación de CMP usan preparaciones de κ -caseína que contienen impurezas significativas. Por ejemplo, si se fabrica una preparación de κ -caseína a partir de leche desnatada, la preparación contiene β -lactoglobulina desnaturalizada en frío. Por el contrario, si se prepara una preparación de κ -caseína usando caseína completa (normalmente de sal de sodio o de potasio), la preparación contiene una pequeña proporción de α_s y β -caseína. Durante la hidrólisis de la κ -caseína mediante quimosina para formar CMP, se pueden producir contaminantes de proteólisis limitada. Como resultado, existe peligro de que la preparación final pueda contaminarse con péptidos que contienen fenilalanina, haciendo por tanto a la preparación inadecuada para la ingestión por aquellos que padecen PKU.

25 Por tanto, los objetivos de la presente invención incluyen:

- Idear un nuevo método de extracción de fracciones de caseína purificadas y β -lactoglobulina a partir de leche, produciendo no solo las fracciones de proteína sino también un suero ácido parcialmente reducido en β -lactoglobulina. El método puede usarse a escala industrial, y las fracciones de proteína y el suero ácido son adecuados para su uso en alimentos o para preparar materiales alimenticios novedosos tales como fórmulas lactantes humanizadas, sabores de queso, emulsiones, recubrimientos comestibles y nutracéuticos. Las fracciones purificadas pueden usarse también para preparar plásticos, fosfopéptidos y otros péptidos bioactivos biodegradables.

- Idear un nuevo método de extracción de fracciones de caseína purificadas a partir de caseinato. El método puede usarse a escala industrial, y las fracciones de caseína son adecuadas para su uso en alimentos, productos alimenticios novedosos, nutracéuticos y aplicaciones biomédicas tal como se mencionó anteriormente.

- Idear un nuevo método de fabricación de CMP, adecuado para su uso por sujetos que padecen el trastorno metabólico fenilcetonuria.

40 En este documento, las referencias a micelas de caseína, caseínas, caseinatos y otros componentes de la leche, deben interpretarse, a menos que el contexto requiera lo contrario, como que incluyen todas las variantes inter e intraespecie relacionadas de estos componentes. La β -caseína, por ejemplo, tendrá una estructura primaria ligeramente diferente en mamíferos diferentes; estará claro para el experto en la técnica que la invención se aplicará a todas estas variantes. El término α_s -caseína se refiere a una mezcla de α_{s1} - y α_{s2} -caseínas.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de obtención de fracciones de proteína purificadas a partir de leche que incluye las etapas de:

- 50 i) aumentar el pH de la leche hasta aproximadamente pH 11;
- ii) añadir cloruro de calcio para precipitar selectivamente las fracciones;
- 55 iii) disminuir el pH; y
- iv) llevar a cabo centrifugación o filtración para separar las fracciones.

Preferiblemente, las fracciones son α_s , β y κ -caseína.

60 Normalmente la leche es leche desnatada.

Preferiblemente, la centrifugación se lleva a cabo a baja velocidad.

El método puede comprender además la etapa de llevar a cabo precipitación a pH ácido del sobrenadante obtenido de la centrifugación o filtración llevadas a cabo en la etapa (iv), para obtener una fracción altamente enriquecida en κ -caseína.

ES 2 282 431 T3

En la etapa en la que la fracción enriquecida en κ -caseína se obtiene ajustando el sobrenadante a pH ácido, preferiblemente el pH es 3,8. Normalmente, el contenido de κ -caseína es aproximadamente del 60%, y el de β -lactoglobulina de aproximadamente el 20%.

5 El método puede comprender también las etapas de volver a disolver los componentes de α_s y β -caseína en agua, y llevar a cabo precipitación isoelectrónica selectiva repetida de la α_s -caseína a pH ácido y baja temperatura, para obtener una fracción que contiene principalmente α_s -caseína.

10 En la etapa en la que el precipitado de α_s y β -caseína se vuelve a disolver en agua, el agua está preferiblemente a pH 7,0 y 20°C.

La solución de α_s y β -caseínas puede enfriarse después de volver a disolverse en agua, preferiblemente hasta 2°C, y ajustarse hasta pH ácido, preferiblemente hasta pH 4,5.

15 El procedimiento de volver a disolver y volver a precipitar puede repetirse, preferiblemente dos veces adicionales, produciendo una fracción que contiene principalmente α_s -caseína (más del 85%) y una fracción que contiene principalmente β -caseína (más del 95%).

20 Aún adicionalmente el método también puede comprender las etapas de calentar el sobrenadante obtenido de la precipitación isoelectrónica selectiva, y llevar a cabo la precipitación con ácido para recuperar la fracción que contiene principalmente β -caseína. El suero ácido sobrenadante se reduce parcialmente en β -lactoglobulina, pero contiene todas las otras proteínas de suero en forma no desnaturalizada, y se enriquece en calcio.

25 Preferiblemente, el sobrenadante se calienta hasta 35°C.

Preferiblemente el pH de la leche se aumenta mediante la adición de una solución alcalina y se disminuye mediante la adición de una solución ácida.

30 Preferiblemente, en la etapa en la que el pH de la leche se aumenta, se añade hidróxido de sodio.

Preferiblemente, la temperatura de la leche en la adición de la solución alcalina es de 30°C.

Opcionalmente, después de añadir la solución alcalina, se deja reposar la leche durante unos pocos minutos. Preferiblemente, se deja reposar la leche durante menos de 5 minutos.

35 Preferiblemente, la concentración final de cloruro de calcio en la solución de caseinato alcalina es de 0,059 M.

El pH puede disminuirse mediante la adición de uno o varios ácidos minerales.

40 El método puede comprender también la etapa de aumentar el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína y llevar a cabo la ultrafiltración para separar el material de bajo peso molecular de las caseínas, proteínas de suero y caseinomacropéptido.

45 El pH se eleva normalmente hasta un valor neutro.

Preferiblemente, la ultrafiltración se lleva a cabo usando una membrana con un tamaño de poro inferior a 25 kD, pero superior a 12 kD.

50 Aún adicionalmente, el método puede comprender también la etapa de disminuir el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína y llevar a cabo la ultrafiltración para separar la proteína de suero del caseinomacropéptido.

El pH normalmente se baja hasta entre pH 4 y pH 5.

55 Preferiblemente, el pH se baja hasta pH 4,6.

Preferiblemente, se lleva a cabo la ultrafiltración usando una membrana con un tamaño de poro superior a 7 kD, pero inferior a 20 kD.

60 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de obtención de fracciones de proteína purificadas a partir de una solución de caseinato de sodio que incluye las etapas de:

i) aumentar el pH de la solución de caseinato hasta aproximadamente pH 11;

65 ii) añadir cloruro de calcio para precipitar de manera selectiva las fracciones;

iii) disminuir el pH; y

iv) llevar a cabo la centrifugación o filtración para separar las fracciones.

ES 2 282 431 T3

Preferiblemente, la centrifugación se lleva a cabo a baja velocidad.

5 El método puede comprender también la etapa de llevar a cabo la precipitación a pH ácido del sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación o filtración en la etapa (iv) para obtener una fracción altamente enriquecida en κ -caseína.

En la etapa en la que la fracción enriquecida en κ -caseína se obtiene ajustando el sobrenadante a pH ácido, preferiblemente el pH es 3,8. El contenido en κ -caseína de esta fracción será normalmente superior al 30%.

10 Opcionalmente, la fracción enriquecida en κ -caseína puede enriquecerse adicionalmente en κ -caseína mediante la precipitación selectiva con etanol. La fracción de κ -caseína puede volver a disolverse en agua a pH 7,0, volver a precipitarse a pH 4,6, y después precipitarse de manera selectiva con etanol al 50% a pH 7,0 y 25°C con la adición de una pequeña cantidad de NaCl 2 M en etanol al 50%. El precipitado de κ -caseína se forma fácilmente y puede extraerse por filtración o centrifugación a baja velocidad. (BIOCHEMISTRY vol. 9, 1970, páginas 2807-2813. Talbot,
15 B. y Waugh, D.F. "Micelle-forming characteristics of monomeric and covalent polymeric κ -caseins"). El contenido en κ -caseína de esta fracción será normalmente aproximadamente del 65%.

El método puede comprender además las etapas de volver a disolver los componentes de α_s - y β -caseína en agua y llevar a cabo la precipitación isoeléctrica selectiva repetida de la α_s -caseína a pH ácido y baja temperatura para obtener
20 una fracción que contienen principalmente α_s -caseína.

En la etapa en la que el precipitado de α_s - y β -caseína se vuelve a disolver en agua, preferiblemente el agua está a pH 7,0 y 20°C.

25 La solución de α_s - y β -caseína puede enfriarse, preferiblemente hasta 2°C, y ajustarse a pH ácido, preferiblemente hasta pH 4,5.

Preferiblemente, el método también comprende las etapas de calentar el sobrenadante obtenido a partir de la precipitación isoeléctrica selectiva, y llevar a cabo la precipitación con ácido para recuperar la fracción que contiene
30 principalmente β -caseína. La β -caseína puede precipitarse del sobrenadante calentando, preferiblemente hasta 35°C.

El procedimiento de volver a disolver y volver a precipitar se repite, preferiblemente dos veces más, produciendo una fracción que contiene principalmente α_s -caseína (superior al 85%) y una fracción que contienen principalmente
35 β -caseína (superior al 95%).

Preferiblemente, el pH de la solución de caseinato de sodio se aumentará mediante la adición de una solución alcalina y se disminuirá mediante la adición de una solución ácida.

40 Más preferiblemente, en la etapa en la que el pH de la solución de caseinato de sodio se aumenta, el pH puede elevarse hasta 11 mediante la adición de hidróxido de sodio.

Preferiblemente, la temperatura de la solución de caseinato de sodio en la adición de la solución alcalina es de 30°C.

45 La solución de caseinato de sodio con un aumento de pH puede dejarse reposar durante unos pocos minutos, preferiblemente menos de 5 minutos.

Preferiblemente, la concentración final de cloruro de calcio en la solución de caseinato de sodio alcalina será de 0,071 M.

50 El pH puede disminuirse hasta 7,0 mediante la adición de uno o varios ácidos minerales.

El método puede comprender también la etapa de aumentar el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína y llevar a cabo la ultrafiltración para separar el material de bajo peso molecular de las caseínas, proteínas de suero y
55 caseinomacropéptido.

El pH normalmente se elevará hasta un valor neutro.

60 Preferiblemente, se lleva a cabo la ultrafiltración usando una membrana con un tamaño de poro inferior a 25 kD, pero superior a 12 kD.

Aún adicionalmente, el método puede comprender también la etapa de disminuir el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína y llevar a cabo la ultrafiltración para separar la proteína de suero del caseinomacropéptido.

65 El pH normalmente se disminuye hasta entre pH 4 y pH 5. Preferiblemente, el pH se disminuye hasta pH 4,6.

Preferiblemente, se lleva a cabo la ultrafiltración usando una membrana con un tamaño de poro superior a 7 kD, pero inferior a 20 kD.

ES 2 282 431 T3

El caseinomacropéptido puede concentrarse y secarse. Normalmente, esto se lleva a cabo mediante liofilización por pulverización.

La invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras en las que:

La figura 1 es un diagrama que ilustra las etapas implicadas en el fraccionamiento de la caseína de leche desnatada en α_s -caseína, β -caseína, y una fracción enriquecida en κ -caseína y β -lactoglobulina (β -Lg), que contiene algo de α_s - y β -caseínas. Este procedimiento también da un suero ácido parcialmente reducido en β -lactoglobulina, tal como se detalla en el ejemplo 1;

La figura 2 es un diagrama que ilustra las etapas implicadas en el fraccionamiento de caseinato de sodio en α_s -caseína, β -caseína, y una fracción enriquecida en κ -caseína, que contiene α_s - y β -caseínas tal como se detalla en el ejemplo 2;

La figura 3 muestra los perfiles de la cromatografía líquida rápida de proteínas de intercambio aniónico de la caseína original de leche desnatada y las fracciones obtenidas a partir de la misma tal como se detalla en el ejemplo 1. El análisis se llevó a cabo tal como se explica en JOURNAL OF DAIRY RESEARCH vol. 54, 1987, páginas 369-376. Davies, D.T. y Law, A.J.R. "Quantitative fractionation of casein mixtures by fast protein liquid chromatography";

La figura 4 muestra los perfiles de permeación en gel de las proteínas de suero en la leche desnatada original (—), y en el sobrenadante obtenido después de la adición de cloruro de calcio y después de la precipitación con ácido de la fracción enriquecida en κ -caseína (---). La figura muestra la reducción de β -lactoglobulina debido a la desnaturalización alcalina y la precipitación posterior a pH ácido. El análisis se llevó a cabo tal como se explica en MILCHWISSENSCHAFT vol. 48, 1993, páginas 663-666. Law, A.J.R., Leaver, J., Banks, J.M. y Horne, D.S. "Quantitative fractionation of whey proteins by gel permeation FPLC". (Ig, inmunoglobulinas; SA/Lf, albúmina de suero y lactoferrina, b-Lg, β -lactoglobulina; a-La, a-lactalbúmina);

La figura 5 muestra los perfiles de la cromatografía líquida rápida de proteínas de intercambio aniónico del caseinato de sodio original y de las fracciones obtenidas del mismo tal como se detalla en el ejemplo 2. El análisis se lleva a cabo tal como se indica para la figura 3;

La figura 6 muestra los perfiles de la cromatografía líquida de proteína rápida de intercambio aniónico del caseinato de sodio original (---) y de la fracción de κ -caseína obtenida del mismo (—) tal como se detalla en el ejemplo 2, después de la purificación adicional mediante precipitación con etanol. El análisis se realiza tal como se indica para la figura 3;

La figura 7 muestra los perfiles de la cromatografía líquida rápida de proteínas de intercambio aniónico del caseinato de sodio original (parte superior) y del caseinato de sodio después de mantenerse a 30°C y pH 11,0 durante 5,0 min. El análisis se llevó a cabo tal como se indica para la figura 3;

La figura 8 muestra el patrón de electroforesis capilar obtenido para el caseinato de sodio original (parte superior), y para el caseinato de sodio después de mantenerse a 30°C y pH 11,0 durante 5,0 min. Análisis esencialmente según el método en JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY vol. 652, 1993, páginas 207-213. de Jong, N., Visser, S. y Olieman, C. "Determination of milk proteins by capillary electrophoresis";

La figura 9 muestra los perfiles de la cromatografía líquida rápida de proteínas de intercambio catiónico del caseinato de sodio original (parte superior), y del caseinato de sodio después de mantenerse a 30°C y pH 11,0 durante 15,0 min. El análisis se realizó según el método en JOURNAL OF DAIRY SCIENCE vol. 74, 1991, páginas 2403-2409. Hollar, C.M., Law, A.J.R., Dagleish, D.G. y Brown, R.J. "Separation of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography"; y

La figura 10 es un diagrama que ilustra los usos de las fracciones purificadas obtenidas mediante precipitación de calcio selectiva a partir de leche desnatada o caseinato tal como se explica en los ejemplos 1 y 2 (figuras 1 y 2, respectivamente).

La presente invención se refiere a un método novedoso para precipitar de manera selectiva fracciones de caseína a partir de leche desnatada o caseinatos mediante la adición de una sal de calcio a pH alcalino. La invención se refiere en particular a la preparación de fracciones puras de α_s -caseína y β -caseína, y una fracción altamente enriquecida en κ -caseína. El método puede usarse a escala industrial, y los productos son adecuados para su uso en alimentos o para preparar materiales alimenticios novedosos, plásticos biodegradables, nutracéuticos y péptidos bioactivos (figura 10).

Los métodos previos de fraccionamiento de la caseína que implican precipitación selectiva de calcio se han realizado a pH neutro y requieren centrifugación a alta velocidad, puesto que la precipitación de las α_s y β caseínas no se producían fácilmente. Las concentraciones superiores de cloruro de calcio impedían la precipitación con ácido posterior de la fracción de κ -caseína, y requerían la adición de oxalato para quelar el calcio, y la diálisis antes de que la proteína pudiese recuperarse. Por tanto, no era posible ampliar a escala estos métodos, y los productos no eran adecuados para el consumo humano.

ES 2 282 431 T3

En el presente método, el fraccionamiento de la caseína se lleva a cabo mediante precipitación selectiva de calcio a pH alcalino. Cuando el pH de la leche desnatada se aumenta hasta aproximadamente 11,0, la carga de las caseínas cargadas negativamente, particularmente en los grupos fosfato, aumenta, y las caseínas se disocian de las micelas. Las α_s -caseínas están más altamente cargadas que la β -caseína, y la κ -caseína es la menos altamente cargada. Cuando se añade una sal tal como cloruro de calcio, las α_{s1} - y β -caseínas unen más Ca^{2+} que la κ -caseína, y precipitan fácilmente dejando el sobrenadante enriquecido en κ -caseína. A pH alcalino, algo de la β -lactoglobulina de la leche experimenta desnaturalización (JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY vol. 81, 1959, páginas 4032-4036. Tanford, C., Bunville, L.G., Nozaki, Y. "The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5). La β -lactoglobulina desnaturalizada se mantiene en el sobrenadante enriquecido en κ -caseína. Cuando el pH se reduce posteriormente hasta aproximadamente 3,8, se forma fácilmente un precipitado enriquecido en κ -caseína, junto con la β -lactoglobulina desnaturalizada y algo de las α_s - y β -caseínas (figura 3). El sobrenadante ácido está parcialmente reducido en β -lactoglobulina (figura 4) pero contiene todas las otras proteínas de suero y cloruro de calcio adicional, y es adecuado para uso alimenticio.

Llevar a cabo la precipitación selectiva de calcio a pH alcalino en lugar de pH neutro tiene varias ventajas. A pH alcalino, las micelas de caseína se deterioran y las caseínas se disocian sin requerir agentes quelantes o caotrópicos tóxicos. Las caseínas también tienen cargas negativas netas superiores y, cuando se añade cloruro de calcio, unen más Ca^{2+} . Por tanto, las caseínas pueden precipitarse de manera selectiva a concentraciones inferiores de cloruro de calcio que las que se requieren a pH neutro. A pH alcalino, el precipitado de α_s - y β -caseínas sedimenta fácilmente cuando se añade cloruro de calcio, y pueden separarse fácilmente mediante filtración o centrifugación a baja velocidad. La fracción de sobrenadante enriquecida en κ -caseína precipita fácilmente de manera similar a pH ácido cuando la concentración de cloruro de calcio es baja, y se separa fácilmente mediante filtración o centrifugación a baja velocidad. Ambas fracciones pueden purificarse después adicionalmente, si es necesario a escala industrial.

Por ejemplo, puede llevarse a cabo un procesamiento adicional para separar el caseinomacropéptido (CMP) de la fracción de κ -caseína. El CMP tiene un tamaño molecular de aproximadamente 6.500 daltons en forma monomérica, sin embargo, el CMP sólo adopta una forma monomérica a valores de pH ácidos, por ejemplo, a pH 4. A pH neutro, el CMP toma una forma tetramérica y tiene un tamaño molecular eficaz de 25.000 daltons. Por tanto, manipulando el pH, puede inducirse al CMP para que se comporte como una molécula de tamaño comparable a las proteínas de suero, como β -lactoglobulina o, alternativamente, para que se comporte como un péptido pequeño. Esta característica puede utilizarse para separar eficazmente el CMP de mezclas con o bien proteínas de suero nativas (tales como preparaciones de κ -caseína preparadas a partir de leche desnatada) o bien de otros péptidos (tales como la fracción de proteosapeptona encontrada en la leche desnatada o de otros péptidos derivados mediante la ruptura no específica de otras fracciones de caseína). Las propiedades de las diversas fracciones se muestran a continuación:

Componente	Solubilidad a pH 4,6	Retención mediante la membrana de UF punto de corte 15 kD NW
α_s , β - κ -caseína	No	Si
para κ -caseína	No	No importante
Monómero de CMP	Si	No
Tetramero de CMP	Si	Si
Proteína de suero	Si	Si
Quimosina	Si	Si
Proteosa peptonas	Si	No

Las diferencias en las propiedades descritas anteriormente pueden explotarse para fabricar CMP en un estado muy puro, libre de contaminantes, incluyendo fenilalanina. Por tanto, la fracción de κ -caseína producida mediante el método descrito anteriormente puede procesarse para producir CMP muy puro. Normalmente, el pH de la fracción de κ -caseína se aumentará hasta pH neutro con el fin de convertir el CMP en su forma tetramérica. Después de esto, el tratamiento mediante ultrafiltración usando una membrana con el tamaño de poro apropiado, normalmente superior a 7 kD, pero inferior a 20 kD separará todo el material de bajo peso molecular de las caseínas, proteínas de suero y CMP.

La acidificación hasta pH 4,6 da como resultado la conversión de nuevo de CMP en la forma monomérica y la precipitación de las otras fracciones de caseína. En este caso, el tratamiento mediante ultrafiltración usando una membrana con el tamaño de poro apropiado, normalmente superior a 7 kD, pero inferior a 20 kD, da como resultado la separación de la proteína de suero de CMP. El CMP puede concentrarse y secarse convenientemente, normalmente

mediante congelación o secado por pulverización. Se apreciará que el procedimiento descrito anteriormente es sólo una de las muchas combinaciones adecuadas (algunas de las cuales pueden invertir el orden de ajuste de pH) y se da sólo a modo de ejemplo.

5 La aplicación del principio para la purificación de CMP no está restringida al material derivado de la leche desnatada, por ejemplo el procedimiento puede aplicarse igualmente para la separación y purificación de CMP de queso o suero de cuajo. En tales casos, es apropiado un tratamiento preliminar separación por centrifugación y/o mediante microfiltración (normalmente usando una membrana con un punto de corte a $1,8 \mu$) para eliminar contaminantes tales como partículas de cuajada, grasa residual y bacterias. Tras este tratamiento, los principios descritos
10 anteriormente pueden emplearse para obtener preparaciones de CMP libres de pHA y adecuadas para la nutrición de pacientes que padecen PKU.

A bajas temperaturas, la β -caseína sigue siendo soluble en su punto isoelectrico, y por tanto puede separarse de las α_s -caseína mediante su precipitación a 2°C y pH 4,6 (JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY vol. 67, páginas 1725-1731. Warner, R.C. "Separation of α - y β -casein"). Entonces se recupera la β -caseína mediante precipitación del sobrenadante a 35°C . Este precocimiento se repite hasta que se extrae toda la β -caseína de las α_s -caseínas, dando fracciones puras de α_s - y β -caseínas (figura 3).

El procedimiento de precipitación de manera selectiva de las fracciones de caseína purificadas a partir de una solución caseinato sigue básicamente los mismos principios que los descritos para la leche desnatada, excepto que en la adición de cloruro de calcio, el sobrenadante contiene sólo κ - β - y α_s -caseínas (figura 5). Tal como se mencionó anteriormente, las caseínas pueden purificarse parcialmente basándose en sus solubilidades en etanol (BIOCHEMISTRY vol. 9, 1970, páginas 2807-2813. Talbot, B. y Waugh, D.F. "Micelle-forming characteristics of monomeric and covalent polymeric κ -caseins"). Este procedimiento puede usarse para purificar la fracción de κ -caseína. La fracción de κ -caseína inicial se vuelve a precipitar para eliminar el calcio residual y se precipita de manera selectiva con solución de etanol, quedándose en el sobrenadante α_{s1} - y β -caseínas. El precipitado se forma fácilmente y puede eliminarse mediante centrifugación a baja velocidad, dando una fracción enriquecida en κ -caseína (figura 6).

Tal como se encontró para la leche desnatada, el fraccionamiento del caseinato de sodio a alto pH tiene la ventaja sobre los métodos anteriores de implicar la precipitación de calcio a pH neutro, o la separación en presencia de agentes caotrópicos, que da las tres fracciones de caseinato libres de materiales tóxicos, y por tanto adecuadas para su uso como ingredientes alimenticios. Las concentraciones de calcio más bajas requeridas a pH alcalino, facilitan la recuperación posterior de la fracción enriquecida en κ -caseína sin la necesidad de añadir un agente quelante tóxico, o de diálisis que no se lleva a cabo fácilmente a gran escala. Similarmente, la separación mejorada a pH alcalino del precipitado de α_s - y β -caseína a partir del sobrenadante de κ -caseína sin requerir una centrifugación a alta velocidad, facilita la ampliación a escala del método para producir materiales de grado alimenticio.

El tratamiento prolongado a pH alcalino, especialmente a alta temperatura, puede conducir a la desfosforilación de la caseína (JOURNAL OF DAIRY RESEARCH, vol. 39, 1972, páginas 189-194. Manson, W. y Carolan, T. "The alkali-induced elimination of phosphate from β -casein"). La deshidroalanina formada en las caseínas como resultado de la desfosforilación, y posiblemente también debido a la eliminación de grupos SH de cisteína, reacciona con grupos s-amino en los residuos de lisina para formar residuos de lisinoalanina. Esta reacción conduce a una reducción de la cantidad de lisina disponible para la nutrición y a un aumento de la reticulación y reducción en la digestibilidad de las caseínas. Se producen reacciones similares cuando se calienta leche, y existen algunas pruebas de estudios con animales de que la lisinoalanina puede ser nociva si se ingesta en grandes cantidades (JOURNAL OF NUTRITION, vol. 98, 1969, páginas 45-46. De Groot, A.P. y Slump, P. "Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value"). Se cree que el riesgo para la salud de seres humanos de comer proteínas de leche caliente o tratadas con álcali es pequeño (JOURNAL OF DAIRY RESEARCH, vol. 49, páginas 725-736. de Koning, P.J. y van Rooijen, P.J. "Aspects of the formation of lysinoalanine in milk and milk products").

Sin embargo, en el presente trabajo, se lleva a cabo un estudio cuidadoso de los efectos del tratamiento alcalino sobre las proteínas de la leche, aplicando técnicas tales como cromatografía líquida rápida de proteínas de intercambio catiónico y aniónico y electroforesis capilar. Estas técnicas se han usado previamente con éxito para detectar los cambios análogos en las proteínas inducidos mediante calor (MILCHWISSENSCHAFT, vol. 49, 1994, páginas 125-129. Law, A.J.R., Home, D.S., Banks, J.M. y Leaver, J. "Heat-induced changes in the whey proteins and caseins"); JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 652, 1993, páginas 207-213. de Jong, N., Visser, S. y Olieran, C. "determination of milk proteins by capillary electrophoresis"). Los cambios que se producen en el tratamiento alcalino riguroso, tales como la desfosforilación, eliminación de los grupos hidratos de carbono y SH (ácido siálico), conducen todos a una reducción de la carga negativa de las proteínas, y estos cambios, que se producen también en el calentamiento, pueden detectarse mediante la cromatografía líquida rápida de proteínas de intercambio aniónico (FPLC). Similarmente, la determinación de residuos de Arg y ϵ -amino Lys que se producen en el tratamiento prolongado a pH alcalino, conduce a la pérdida de carga positiva en las proteínas, y estos cambios pueden determinarse mediante la FPLC de intercambio catiónico y la electroforesis capilar a pH ácido.

Estas técnicas se usaron para examinar caseínas que se habían sometido a las condiciones alcalinas requeridas para obtener la precipitación selectiva de las fracciones de caseína a partir de leche desnatada o caseinato de sodio. Los resultados de la FPLC de intercambio aniónico (figura 7) muestran que en los tiempos cortos requeridos para realizar la disociación de las micelas de caseína en la leche (5 min.), no había cambios que pudieran medirse en los perfiles

o en las áreas de pico respectivas de las caseínas individuales. Ya que la separación se basa en la carga neta negativa, parece que no hubo cambios apreciables en las cargas de las caseínas individuales y que, en particular, no tuvo lugar la desfosforilación. Los resultados de la electroforesis capilar (figura 8) y la FPLC de intercambio catiónico (figura 9) muestran similarmente que tras el tratamiento alcalino durante 5 min., no hubo cambios que pudieran medirse en los perfiles o en las áreas de pico respectivas de las caseínas. Ambas técnicas se llevaron a cabo a pH ácido y, ya que las separaciones se basan en la carga neta positiva, muestran que el tratamiento alcalino corto no tuvo efecto sobre los grupos cargados positivamente tales como Lys y Arg de las caseínas. Los resultados en conjunto muestran que el tratamiento corto en condiciones alcalinas requerido para obtener la precipitación selectiva de las caseínas a partir de la leche desnatada o del caseinato de sodio no provocó ningún daño químico a las proteínas.

Durante el tratamiento alcalino de la leche desnatada, la β -lactoglobulina experimenta un cambio conformacional, y posteriormente se vuelve insoluble en su punto isoeléctrico (JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY vol. 81, 1959, páginas 4032-4036. Tanford, C., Bunville, L.G. y Nozaki, Y. "The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7,5"). En las condiciones alcalinas requeridas para obtener la precipitación de calcio selectiva, algunas de las β -lactoglobulinas se vuelven desnaturadas pero las otras proteínas de suero, tal como se muestra mediante la FPLC de permeación en gel (figura 4), no se desnaturaron y mantuvieron sus solubilidades en sus puntos isoeléctricos. Los resultados previos de HPLC en fase inversa, electroforesis capilar y digestiones tripticas de las proteínas a partir de la leche desnatada mantenida brevemente a pH alcalino, mostraron que no había cambios significativos en las propiedades químicas de las proteínas (SOLICITUD DE PATENTE, 2001, Leaver, J. y Law, A.J.R. "Milk and cheese extraction process, including methods of extracting β -lactoglobulin and caseins from milk and milk products, and novel products thereby produced").

Ejemplo 1

Se calentó leche desnatada hasta 30°C y se ajustó rápidamente el pH hasta 11,0 mediante la adición, con agitación, de hidróxido de sodio 5 M. Mientras se continuó agitando, se añadió una solución de cloruro de calcio 0,5 M, siendo el volumen total de cloruro de calcio añadido de 133 ml por litro de solución de leche desnatada y siendo la concentración final de 0,059 M. Entonces se añadió ácido clorhídrico (5 M), con agitación con el fin de reducir el pH de la leche desnatada hasta 7,0. Se formó un precipitado (A) que se recogió o bien mediante centrifugación o bien se dejó sedimentar y se extrajo mediante filtración. Este precipitado era rico en α_s - y β -caseínas y contenía poca κ -caseína. Se redujo el pH del sobrenadante hasta 3,8 mediante la adición, con agitación de HCl 1 M. Se formó un segundo precipitado (B) que se recogió de la misma manera que el precipitado A. El precipitado B contenía κ -caseína (60%) y β -lactoglobulina (20%) y pequeñas cantidades de α_s - y β -caseínas (figura 3). Se mermó parcialmente el sobrenadante de suero ácido en β -lactoglobulina (figura 4).

Se volvió a suspender el precipitado A en agua en aproximadamente la misma concentración tal como en el caseinato inicial, mediante agitación vigorosa a 20°C ajustándose continuamente el pH hasta 7,0 mediante la adición de HCl 1 M. Después de completarse la disolución, se enfrió la solución hasta 2°C y se ajustó el pH hasta 4,5 mediante la adición, con agitación, de HCl 1 M. Se formó un precipitado (C) y tras la agitación durante 15 minutos a 2°C, éste se recogió del sobrenadante (D) o bien mediante filtración o bien centrifugación a 2°C. Este precipitado estaba altamente enriquecido en α_s -caseína pero contenía algo de β -caseína. Se redujo la cantidad de β -caseína en esta fracción volviendo a disolver el precipitado en agua y repitiendo la precipitación a 2°C dos veces más. El análisis mostró que más del 85% de la proteína era α_s -caseína (figura 3).

Se calentó el sobrenadante D hasta 35°C y se ajustó el pH hasta 4,6 mediante la adición, con agitación de volúmenes pequeños de HCl 1 M. Se formó un precipitado (E) que se recogió mediante centrifugación o filtración de la misma manera que el precipitado A. El análisis mostró que más del 95% de la proteína era β -caseína (figura 3).

Ejemplo 2

Se disolvió caseinato de sodio en agua en una concentración de 27 g/l mediante agitación a aproximadamente 37°C durante 10 minutos (figura 4). Se enfrió la solución hasta 30°C y se ajustó rápidamente el pH hasta 11,0 mediante la adición, con agitación, de hidróxido de sodio 0,5 M. Mientras se continuó agitando, se añadió una solución de cloruro de calcio 0,5 M, siendo el volumen total de cloruro de calcio añadido de 166 ml por litro de solución de caseinato y siendo la concentración final de 0,071 M. Entonces se añadió ácido clorhídrico (5 M), con agitación, con el fin de reducir el pH de la solución de caseinato hasta 7,0. Se formó un precipitado (A) que se recogió o bien mediante centrifugación o bien se dejó depositar y se eliminó mediante filtración. Este precipitado era rico en α_s - y β -caseínas y contenía poca o ninguna κ -caseína. Se redujo el pH del sobrenadante hasta 3,8 mediante la adición, con agitación de HCl 1 M. Se formó un segundo precipitado (B) que se recogió de la misma manera que el precipitado A. El precipitado B estaba altamente enriquecido en κ -caseína y contenía cantidades aproximadamente iguales de α_s - β - y κ -caseína (figura 4). Pudo purificarse el precipitado B además disolviendo en agua a pH 7,0, y volviendo a precipitar a pH 4,6 para reducir el contenido de sal de calcio. Se volvió a disolver el precipitado a pH 7,0, y se precipitó de manera selectiva κ -caseína con solución de etanol al 50% mediante la adición de una pequeña cantidad de cloruro de sodio 2 M en etanol al 50%, manteniéndose la mayor parte de las α_s - y β -caseínas en el sobrenadante. Se formó el precipitado fácilmente y pudo separarse mediante centrifugación a baja velocidad o filtración. La fracción era de aproximadamente el 65% de κ -caseína (figura 6) y, ya que no estaban implicados materiales tóxicos, era adecuada como un ingrediente alimenticio.

ES 2 282 431 T3

Se volvió a suspender el precipitado A en agua en aproximadamente la misma concentración tal como en el caseinato inicial mediante agitación vigorosa a 20°C ajustándose continuamente el pH hasta 7,0 mediante la adición de HCl 1 M. Después de completarse la disolución, se enfrió la solución hasta 2°C y se ajustó el pH hasta 4,5 mediante la adición, con agitación, de HCl 1 M. Se formó un precipitado (C) y tras la agitación durante 15 minutos a 2°C, éste se recogió del sobrenadante (D) o bien mediante filtración o bien centrifugación a 2°C. Este precipitado estaba altamente enriquecido en α_s -caseína pero contenía algo de β -caseína. Se redujo la cantidad de β -caseína en esta fracción volviendo a disolver el precipitado en agua y repitiendo la precipitación a 2°C dos veces más. El análisis mostró que más del 85% de la proteína era α_s -caseína (figura 5).

Se calentó el sobrenadante D hasta 35°C y se ajustó el pH hasta 4,6 mediante la adición, con agitación de volúmenes pequeños de HCl 1 M. Se formó un precipitado (E) que se recogió mediante centrifugación o filtración de la misma manera que el precipitado A. El análisis mostró que más del 95% de la proteína era β -caseína (figura 5).

Aplicaciones de las fracciones de caseína purificada

Las fracciones de caseína purificadas pueden prepararse a gran escala, libres de materiales tóxicos, y pueden añadirse a los alimentos o usarse para preparar nuevos productos alimenticios. Las caseínas individuales tienen estructuras y propiedades diferentes y pueden seleccionarse por tanto para dar propiedades funcionales óptimas para obtener un fin particular. La β -caseína, por ejemplo, es más hidrófoba y más soluble en etanol que las otras caseínas, mientras que la κ -caseína es hidrófila y precipita fácilmente con soluciones de etanol. Similarmente, las α_s -caseínas, que son ricas en grupos fosfato, se unen fácilmente a iones divalentes y son mucho más sensibles a concentraciones de calcio que la κ -caseína, que tiene sólo un único grupo fosfato. También, la κ -caseína tiene propiedades especiales debido a su existencia como una serie de polímeros unidos a disulfuros, la presencia de cadenas laterales de hidratos de carbono hidrófilos, y su capacidad de estabilizar a las otras caseínas en soluciones acuosas. Las fracciones de caseína también muestran diferentes susceptibilidades hacia diferentes enzimas, y son materiales de partida adecuados para preparar una amplia variedad de péptidos tal como se describe a continuación.

Durante la maduración del queso, las caseínas experimentan proteólisis y los péptidos y aminoácidos resultantes producen una contribución importante para el sabor de los quesos curados. En las etapas tempranas de la maduración, quimosina y plasmina producen la proteólisis de péptidos de tamaño grande e intermedio, mientras que en las últimas etapas otras enzimas proteolíticas producen péptidos cortos y por último aminoácidos. Sin embargo, la curación es un proceso lento, y existe un potencial considerable para desarrollar sabores de queso mediante proteólisis rápida de caseínas aisladas. Durante este proceso pueden producirse péptidos hidrófobos, especialmente de β -caseína, que tienen un sabor amargo. Las fracciones de caseína purificadas descritas en el presente documento pueden usarse como materiales de partida que permiten más control sobre el tipo de péptidos formados y los sabores desarrollados.

La hidrólisis controlada de las caseínas mediante condiciones ácidas o alcalinas o mediante la proteólisis enzimática limitada da péptidos que tienen capacidad de formación de espuma mejorada, pudiendo difundirse las moléculas pequeñas más rápido que las caseínas originales hacia las superficies de contacto. Los péptidos de las caseínas tienen las ventajas de ser estable frente al calor, tener baja alergenicidad y facilitar la unión al calcio. Los hidrolizados específicos también se usan para optimizar la tasa de fermentación y aumentar el recuento celular de ciertas cepas de bacterias bioactivas en el procesamiento del yogurt. La disponibilidad de las fracciones purificadas obtenidas mediante el presente procedimiento facilita la producción de una amplia variedad de péptidos que tienen las propiedades requeridas.

Aunque la mayor parte de los alimentos de sustitución de lactantes se basan en leche de vaca, la concentración de la proteína total en la leche humana es inferior, y las proporciones respectivas de las proteínas individuales difieren considerablemente de las de la leche de vaca. En particular, la leche humana no contiene β -lactoglobulina, y la proporción respectiva de α_s -caseínas es muy baja. En contraste, las proporciones respectivas de α -lactoalbumina, lactoferrina y de κ - y β -caseínas son superiores en la leche humana. También, la β -caseína que representa aproximadamente el 60% de la caseína total en la leche humana, se produce como una serie de polipéptidos fosforilados de manera diferente, siendo el grado global de fosforilación inferior que en la leche de vaca. Se cree que las diferencias en la composición pueden explicar algunos de los problemas asociados con la ingesta de leche de vaca por lactantes. Por ejemplo, la alergenicidad de la leche de vaca se ha relacionado en parte a la presencia de β -lactoglobulina. Similarmente, las dificultades en la digestión pueden deberse a la textura más dura de la cuajada formada en el estómago a pH ácido, cuando la leche tiene menos de la β -caseína poco fosforilada y más de las α_s -caseínas altamente fosforilada. En los años recientes, ha existido un cambio gradual en la fabricación de fórmulas de lactantes hacia la obtención de un producto que se parezca estrechamente a la leche humana. La preparación a gran escala de fracciones de caseína individuales y suero que esté parcialmente reducido en β -lactoglobulina, tal como se describe en el presente documento, puede ayudar a conseguir esto. La β -caseína purificada puede desfosforilarse parcialmente mediante la acción de la fosfatasa, y recombinarse con κ -caseína y el suero para dar leche que se parece estrechamente a la leche humana en la composición de proteína.

En común con muchas moléculas sintéticas o naturales de cadena larga, las caseínas pueden reticularse para formar polímeros, normalmente mediante la aplicación de calor y alta presión, seguido de tratamiento con formalina (en CASEIN AND ITS INDUSTRIAL APPLICATIONS, 1939, páginas 181-232, Reinhold Publishing Corporation, Nueva Cork, Brothel, G.H. "Casein Plastics"). El proceso se usó comúnmente una vez para producir una amplia variedad de plásticos que tenían textura y color satisfactorios pero, debido al coste de los materiales de partida y el peligro de la formalina, se ha sustituido por métodos que utilizan polímeros sintéticos. Sin embargo, hay un mercado

de recubrimientos de alimentos comestibles y plásticos biodegradables y, usando técnicas de reticulación más suaves que implican la adición de calcio a pH alcalino, es posible usar las fracciones de caseína individuales descritas en el presente documento para producir un intervalo de plásticos blandos que tienen propiedades adecuadas.

5 En los años recientes se ha establecido que la ruptura proteolítica de las caseínas en la leche, o durante la digestión, da un aumento de péptidos bioactivos que tienen funciones fisiológicas especiales. Los péptidos bioactivos incluyen fosfopéptidos, y péptidos con funciones antimicrobianas, antihipertensoras, inmunomoduladoras, antitrombóticas y opioides (JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 83, 2000, páginas 1187-1195. Clare, D.A. y Swaisgood, H.E. "Bioactive milk peptides: A prospectus").

10 Los fosfopéptidos de caseína se han identificado tras la liberación de tripsina a partir de caseínas individuales y, debido a las características de grupo de los residuos de fosfoserina y alta carga negativa de los centros de fosfato, se cree que funcionan como vehículos de diferentes minerales, especialmente calcio (PROCEEDINGS OF 25th INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 1998, páginas 200-208. Holt, C. "Casein structure and casein-calcium phosphate interactions"). Los fosfopéptidos de caseína son en su mayor parte resistentes a la proteólisis enzimática en el intestino y normalmente se encuentran formando complejos con fosfato de calcio. Esta formación de complejos da como resultado un aumento de la solubilidad y una absorción potenciada de calcio requerido para la calcificación ósea. También, los fosfopéptidos de caseína inhiben lesiones de caries ayudando a recalcificar el esmalte dental, y se está promoviendo su aplicación en el tratamiento de enfermedades dentales. Las caseínas individuales dan un aumento de fosfopéptidos diferentes, algunos de los que ya han encontrado aplicaciones como complementos dietéticos y medicinas debido a sus capacidades de unir Fe, Zn y Cu, y la disponibilidad de las fracciones de caseína purificadas descritas en el presente documento facilita su preparación.

25 Se han identificado diversos péptidos de caseína con propiedades microbianas en la leche, incluyendo casosidina I de α_{s2} -caseína e isracidina de α_{s1} -caseína B. La isracidina previene eficazmente la mastitis en ovejas y cabras, y existe un potencial considerable para desarrollar adicionalmente los antibióticos específicos de este tipo.

30 Diversos péptidos de las caseínas inhiben la enzima de conversión de la angiotensina y por tanto, actúan para reducir la tensión arterial. De estos péptidos bioactivos, uno es un fragmento de α_{s1} -caseína (α_{s1} -casoquinina-5) y dos se obtienen de β -caseína (β -casoquinina-7 y péptido antihipertensor).

También se ha establecido que los fragmentos de caseína afectan al sistema inmunitario y las repuestas de proliferación celular relacionadas. De estos péptidos bioactivos, un tripéptido de κ -caseína y un péptido de β -caseína han mostrado aumentar la proliferación de los linfocitos de sangre periférica.

35 Varios péptidos de las caseínas tienen propiedades antitrombóticas y actúan bloqueando los receptores específicos de las plaquetas durante la coagulación sanguínea. Estos péptidos incluyen los glucomacropéptidos, y dos fragmentos más pequeños de κ -caseína que dan casoplatelina y péptido inhibidor de la trombina, respectivamente.

40 Varios estudios han mostrado que algunos fragmentos de las caseínas, los péptidos opioides, tienen propiedades similares a la morfina. Los principales péptidos opioides son fragmentos de β -caseína, pero también pueden obtenerse mediante la hidrólisis de pepsina de α_{s1} -caseína. Las β -casomorfina son resistentes a las enzimas digestivas y en adultos sus influencias fisiológicas se limitan al aparato gastrointestinal, con efectos importantes sobre el tiempo del tránsito intestinal, la absorción de aminoácidos y el equilibrio de agua. Sin embargo, en recién nacidos las β -casomorfina pueden entrar en la circulación sanguínea promoviendo calma y sueño en los lactantes. Algunos péptidos, antagonistas opioides, ejercen los efectos opuestos de las β -casomorfina, y actúan suprimiendo la actividad de la encefalina. Tres de estos, las casoxinas, son péptidos de κ -caseína. El caseinomacropéptido de κ -caseína también tiene un efecto directo sobre el aparato gastrointestinal, e inhibe las secreciones del ácido gástrico. El papel de los péptidos bioactivos de las caseínas es un área de investigación de expansión, especialmente ahora que existe un mejor entendimiento de los procesos biológicos a nivel molecular. La preparación de caseínas purificadas mediante el presente método facilita la producción de los diversos péptidos en forma pura.

55 El método novedoso de la presente invención permite fraccionar la caseína para dar material de pureza hasta ahora no alcanzada con costes marcadamente reducidos y libre de reactivos potencialmente nocivos. En particular, la presente invención permite, por primera vez, la preparación de material altamente enriquecido en κ -caseína.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de fracciones de proteínas purificadas de leche, que incluye las etapas de:

- i) aumentar el pH de la leche hasta aproximadamente pH 11;
- ii) añadir cloruro de calcio para precipitar de manera selectiva las fracciones;
- iii) disminuir el pH; y
- iv) separar las fracciones.

2. Método según la reivindicación 1, en el que las fracciones son α_s -, β -, y κ -caseína.

3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que las fracciones se separan mediante centrifugación.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que las fracciones se separan mediante filtración.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la leche es leche desnatada.

6. Método según la reivindicación 3, en el que la centrifugación se lleva a cabo a baja velocidad.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de llevar a cabo la precipitación a pH ácido del sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación o filtración, para obtener una fracción altamente enriquecida en κ -caseína.

8. Método según la reivindicación 7, en el que el pH es 3,8.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende también las etapas de volver a disolver los componentes de α_s -, β -caseína en agua, y llevar a cabo la precipitación isoelectrónica selectiva repetida a pH ácido y baja temperatura, para obtener una fracción que principalmente contiene α_s -caseína.

10. Método según la reivindicación 9, en el que el agua está a pH 7,0 y 20°C.

11. Método según las reivindicaciones 9 a 10, en el que se enfría la solución de las α_s -, β -caseínas tras volver a disolverse en agua, y ajustarse hasta pH ácido.

12. Método según la reivindicación 11, en el que se enfría la solución de las α_s -, β -caseínas hasta 2°C, y se ajusta hasta pH 4,5.

13. Método según las reivindicaciones 9 a 12, en el que se repite el procedimiento de volver a disolver y de volver a precipitar, dando una fracción que contiene principalmente α_s -caseína y una fracción que contiene principalmente β -caseína.

14. Método según la reivindicación 13, en el que se calienta el sobrenadante obtenido a partir de la precipitación isoelectrónica selectiva, y se trata mediante precipitación con ácido para recuperar la fracción que contiene principalmente β -caseína.

15. Método según la reivindicación 14, en el que se calienta el sobrenadante hasta 35°C.

16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se aumenta el pH de la leche mediante la adición de una solución alcalina, y se disminuye mediante la adición de una solución ácida.

17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se aumenta el pH de la leche mediante la adición de hidróxido de sodio.

18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de la leche en la adición de la solución alcalina es de 30°C.

19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que tras la etapa de aumentar el pH de la leche, se deja reposar la solución durante un periodo de hasta 5 minutos.

20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración final de cloruro de calcio en la solución es de 0,059 M.

21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se disminuye el pH mediante la adición de uno o varios ácidos minerales.

ES 2 282 431 T3

22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende también la etapa de aumentar el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína, y llevar a cabo la ultrafiltración para separar el material de bajo peso molecular de las caseínas, proteínas de suero y caseinomacropéptido en la leche.

5 23. Método según la reivindicación 22, en el que se aumenta el pH hasta un valor neutro.

24. Método según las reivindicaciones 22 a 23, en el que se lleva a cabo la ultrafiltración usando una membrana con un tamaño de poro inferior a 25 kD, pero superior a 12 kD.

10 25. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende también la etapa de disminuir el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína y llevar a cabo la ultrafiltración para separar la proteína de suero del caseinomacropéptido.

15 26. Método según la reivindicación 25, en el que se disminuye el pH hasta entre pH 4 y pH 5.

27. Método según las reivindicaciones 25 a 26, en el que se lleva a cabo la ultrafiltración usando una membrana con un tamaño de poro superior a 7 kD, pero inferior a 20 kD.

20 28. Método de obtención de fracciones de proteínas purificadas a partir de una solución de caseinato de sodio que incluye las etapas de:

i) aumentar el pH de la solución de caseinato de sodio hasta aproximadamente pH 11;

25 ii) añadir cloruro de calcio para precipitar de manera selectiva las fracciones;

iii) disminuir el pH; y

iv) separar las fracciones.

30 29. Método según la reivindicación 28, en el que las fracciones son α_s -, β -, κ -caseínas.

30. Método según las reivindicaciones 28 a 29, en el que las fracciones se separan mediante centrifugación.

35 31. Método según las reivindicaciones 28 a 30, en el que las fracciones se separan mediante filtración.

32. Método según la reivindicación 31, en el que la centrifugación se lleva a cabo a baja velocidad.

33. Método según las reivindicaciones 28 a 32, que comprende también la etapa de llevar a cabo la precipitación a pH ácido del sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación o filtración, para obtener una fracción altamente enriquecida en κ -caseína.

34. Método según la reivindicación 33, en el que el pH es 3,8.

45 35. Método según las reivindicaciones 28 a 34, en el que la fracción altamente enriquecida en κ -caseína se precipita de manera selectiva con etanol para enriquecerla adicionalmente en κ -caseína.

36. Método según la reivindicación 35, en el que la fracción altamente enriquecida en κ -caseína se vuelve a disolver en agua a pH 7, se vuelve a precipitar a pH 4,6, y entonces se precipita de manera selectiva con etanol al 50% a pH 7 y a 25°C con la adición de una pequeña cantidad de 2NaCl en etanol al 50%.

50 37. Método según las reivindicaciones 28 a 36, que comprende además las etapas de volver a disolver los componentes de α_s - y β -caseína en agua, y llevar a cabo la precipitación isoeléctrica selectiva repetida a pH ácido y baja temperatura para obtener una fracción que contiene principalmente α_s -caseína.

55 38. Método según la reivindicación 37, en el que el agua está a pH 7,0 y 20°C.

39. Método según las reivindicaciones 37 a 38, en el que se enfría la solución de α_s - y β -caseína hasta 2°C, y se ajusta hasta pH ácido.

60 40. Método según la reivindicación 39, en el que se enfría la solución de α_s - y β -caseína hasta 2°C, y se ajusta hasta pH 4,5.

65 41. Método según las reivindicaciones 37 a 39, en el que se calienta el sobrenadante obtenido a partir de la precipitación isoeléctrica selectiva, y se trata mediante precipitación con ácido para recuperar la fracción que contiene principalmente β -caseína.

ES 2 282 431 T3

42. Método según las reivindicaciones 37 a 41, en el que se repite el proceso de volver a disolver y volver a precipitar, dando una fracción que contiene principalmente α_s -caseína, y una fracción que contiene principalmente β -caseína.
- 5 43. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 42, en el que se aumenta el pH de la solución de caseinato de sodio mediante la adición de una solución alcalina, y se disminuye mediante la adición de una solución ácida.
- 10 44. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 43, en el que se aumenta el pH de la solución caseinato de sodio hasta pH 11 mediante la adición de hidróxido de sodio.
45. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 44, en el que la temperatura de la solución de caseinato de sodio en la adición de la solución alcalina es de 30°C.
- 15 46. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 45, en el que tras la etapa de aumentar el pH de la solución de caseinato de sodio, se deja reposar la solución durante un periodo de hasta 5 minutos.
- 20 47. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 46, en el que la concentración final del cloruro de calcio en la solución alcalina de caseinato de sodio será de 0,071 M.
48. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 47, en el que se disminuye el pH hasta pH 7,0 mediante la adición de uno o varios ácidos minerales.
- 25 49. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 48, que comprende también la etapa de aumentar el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína, y llevar a cabo la ultrafiltración para separar el material de bajo peso molecular de las caseínas, proteínas de suero y caseinomacropéptido en la solución de caseinato de sodio.
50. Método según la reivindicación 49, en el que se aumenta el pH hasta un valor neutro.
- 30 51. Método según las reivindicaciones 49 a 50, en el que se lleva a cabo la ultrafiltración usando una membrana con un tamaño de poro inferior a 25 kD, pero superior a 12 kD.
52. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 51, que comprende también la etapa de disminuir el pH de la fracción altamente enriquecida en κ -caseína, y llevar a cabo la ultrafiltración para separar la proteína de suero del caseinomacropéptido.
- 35 53. Método según la reivindicación 52, en el que se disminuye el pH hasta entre pH 4 y pH 5.
54. Método según las reivindicaciones 52 a 53, en el que se lleva a cabo la ultrafiltración usando una membrana con un tamaño de poro superior a 7 kD, pero inferior a 20 kD.
- 40

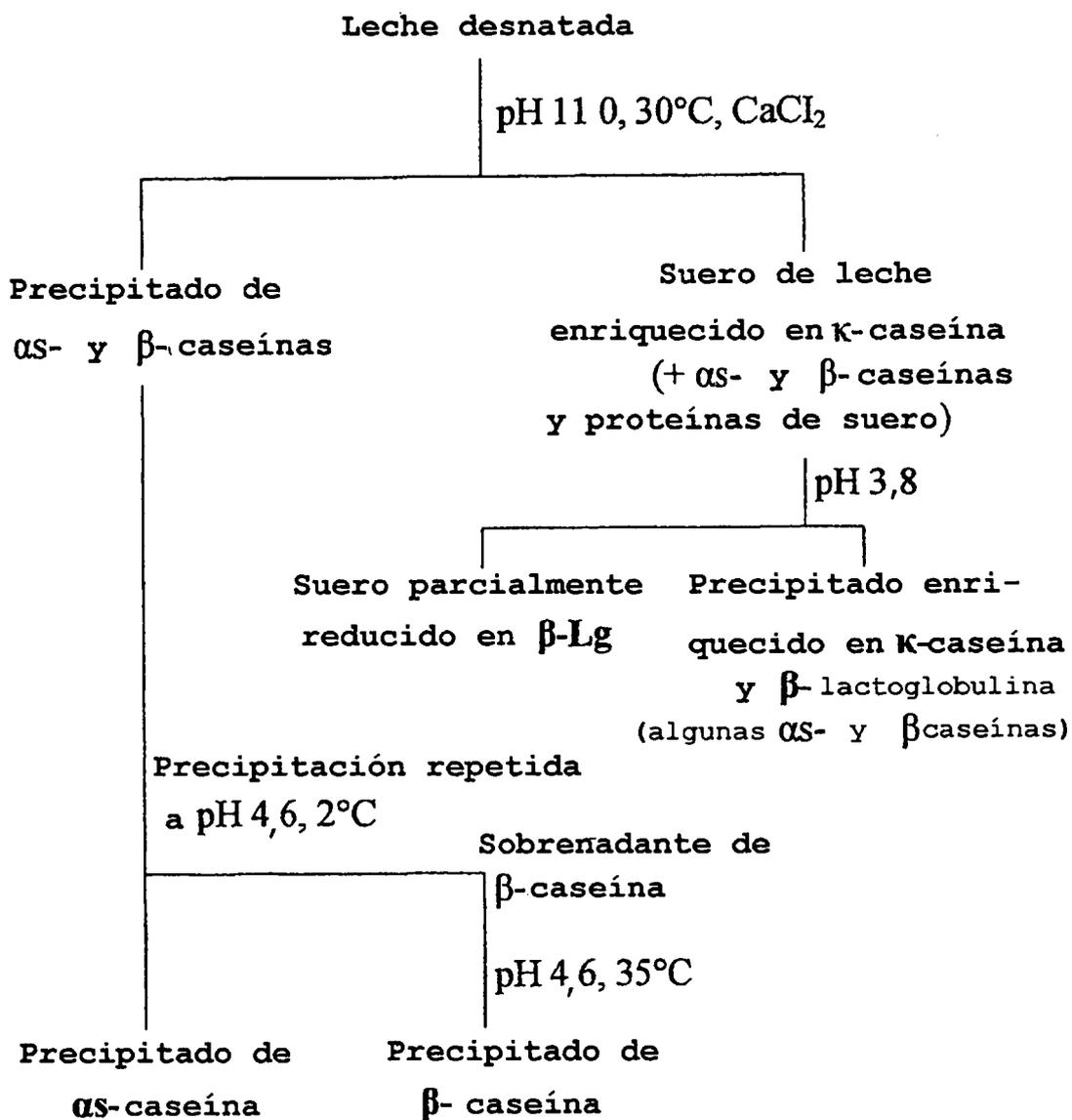
45

50

55

60

65



FIE.1

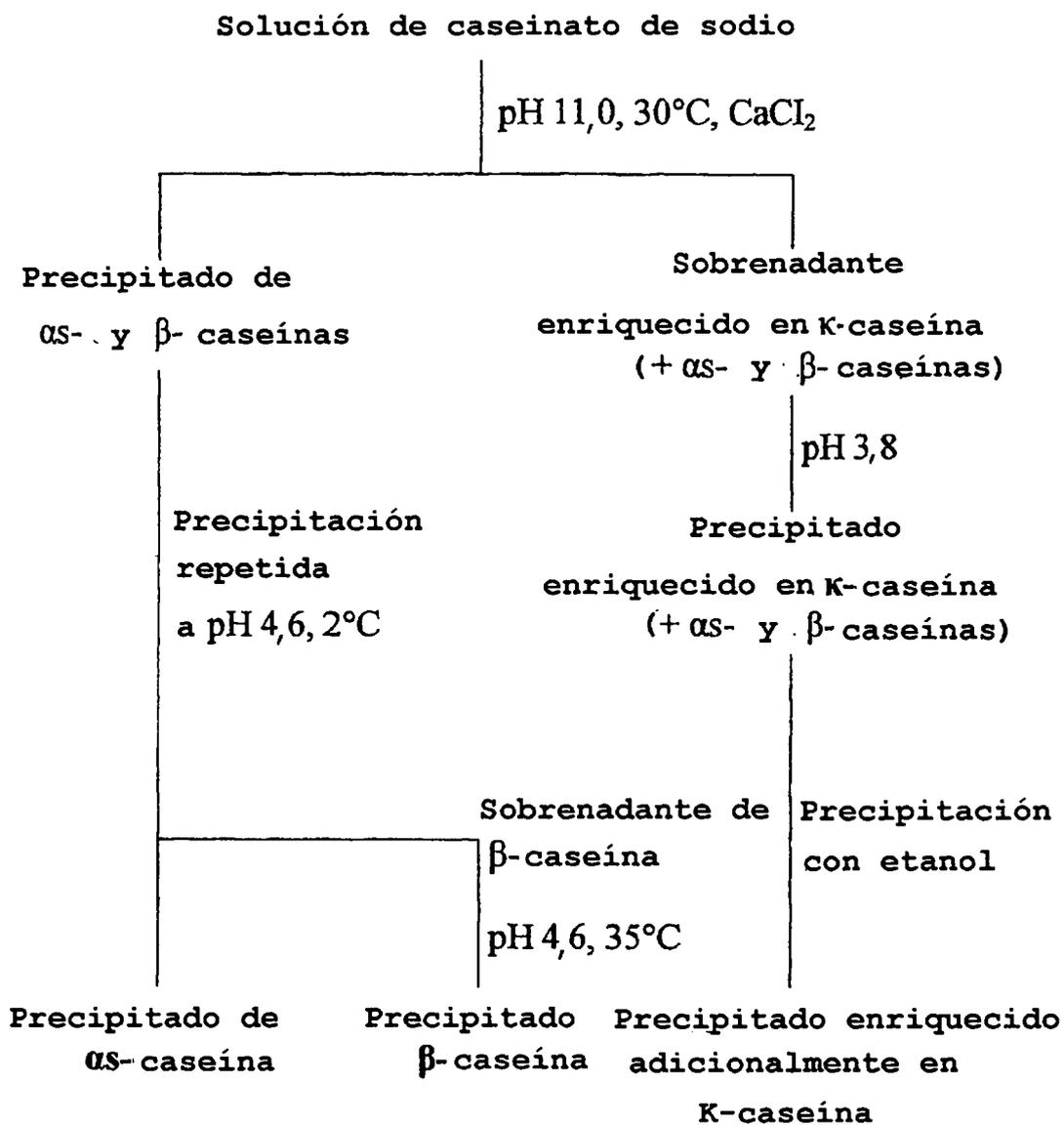


Fig. 2

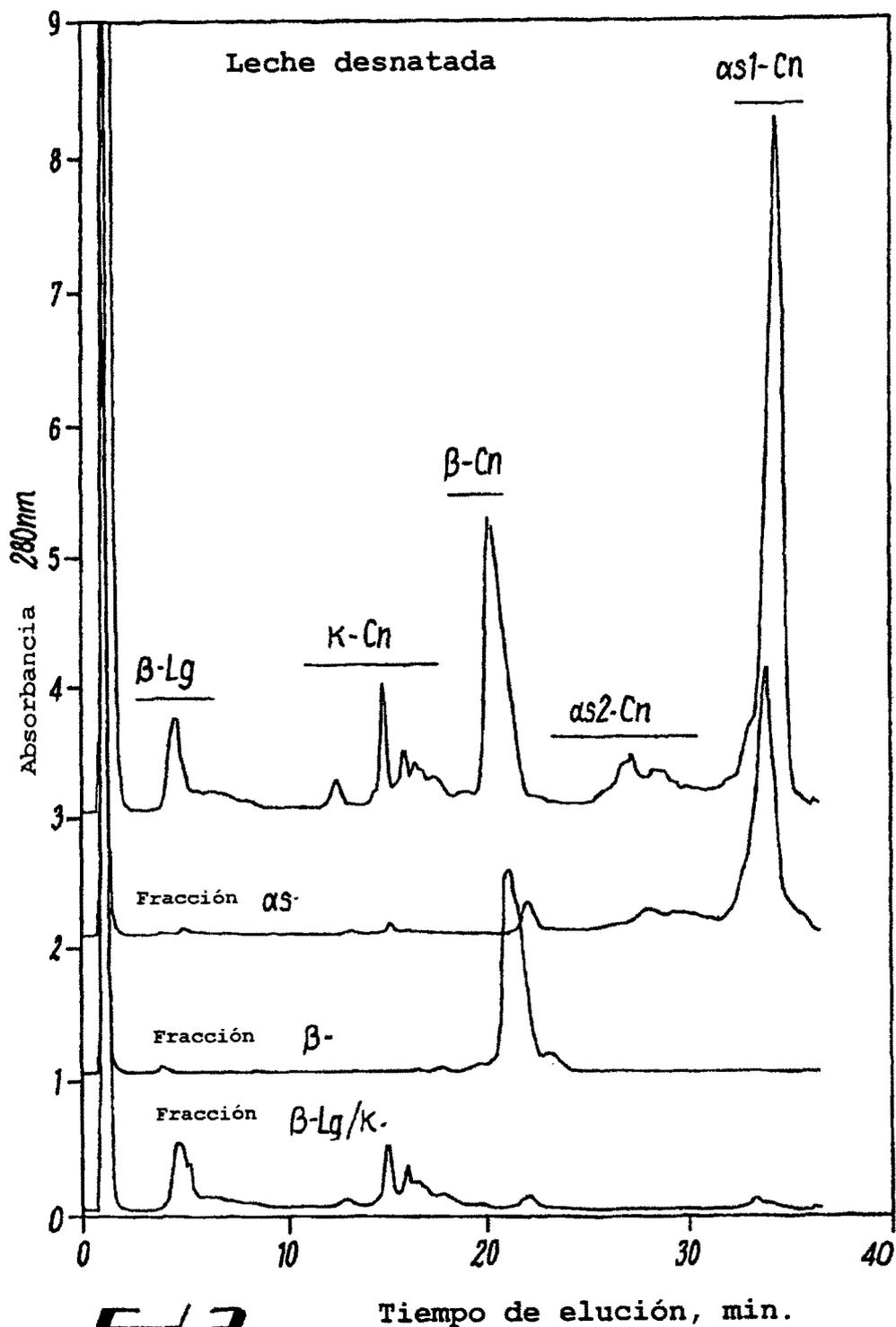


Fig. 3

Tiempo de elución, min.

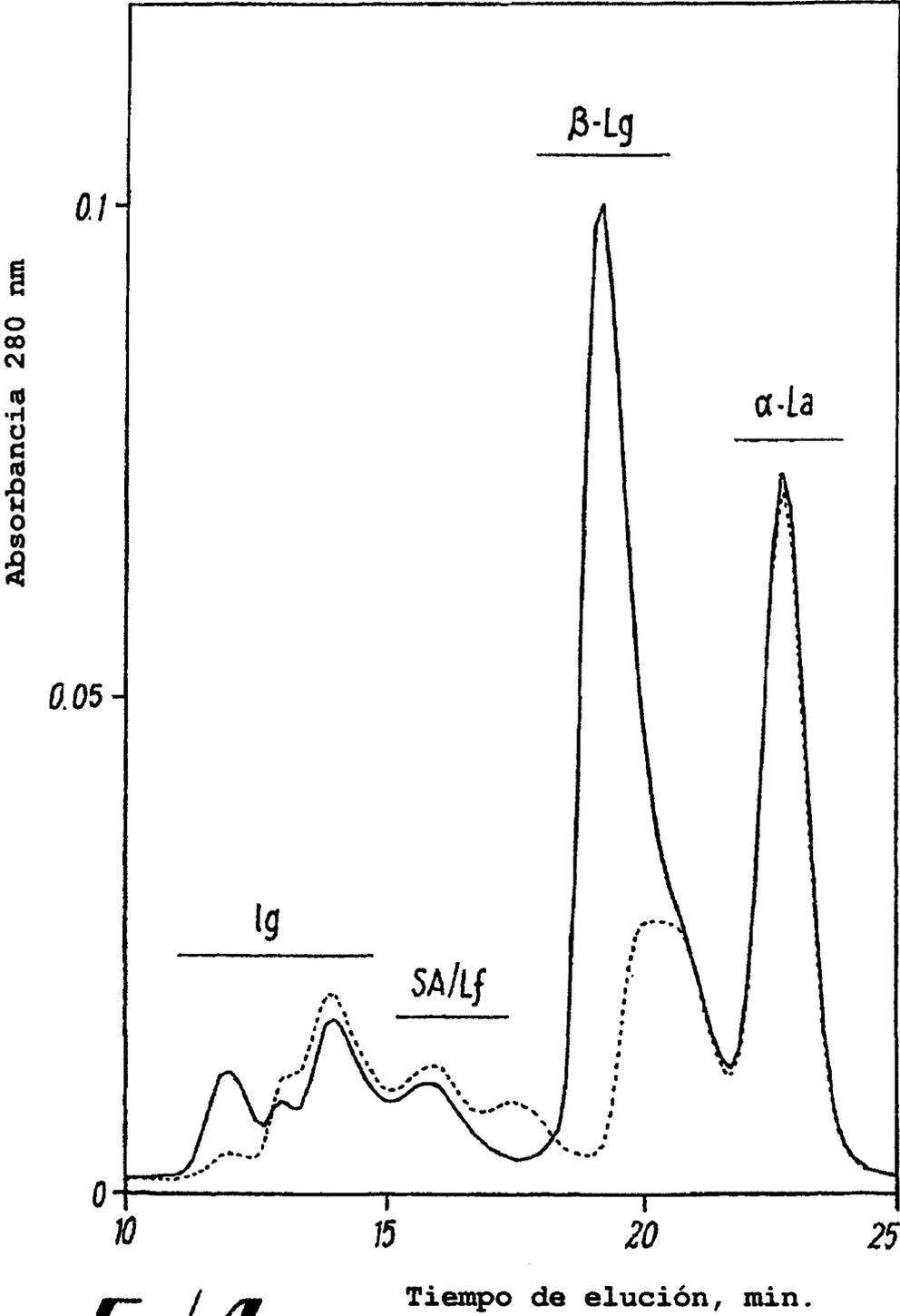
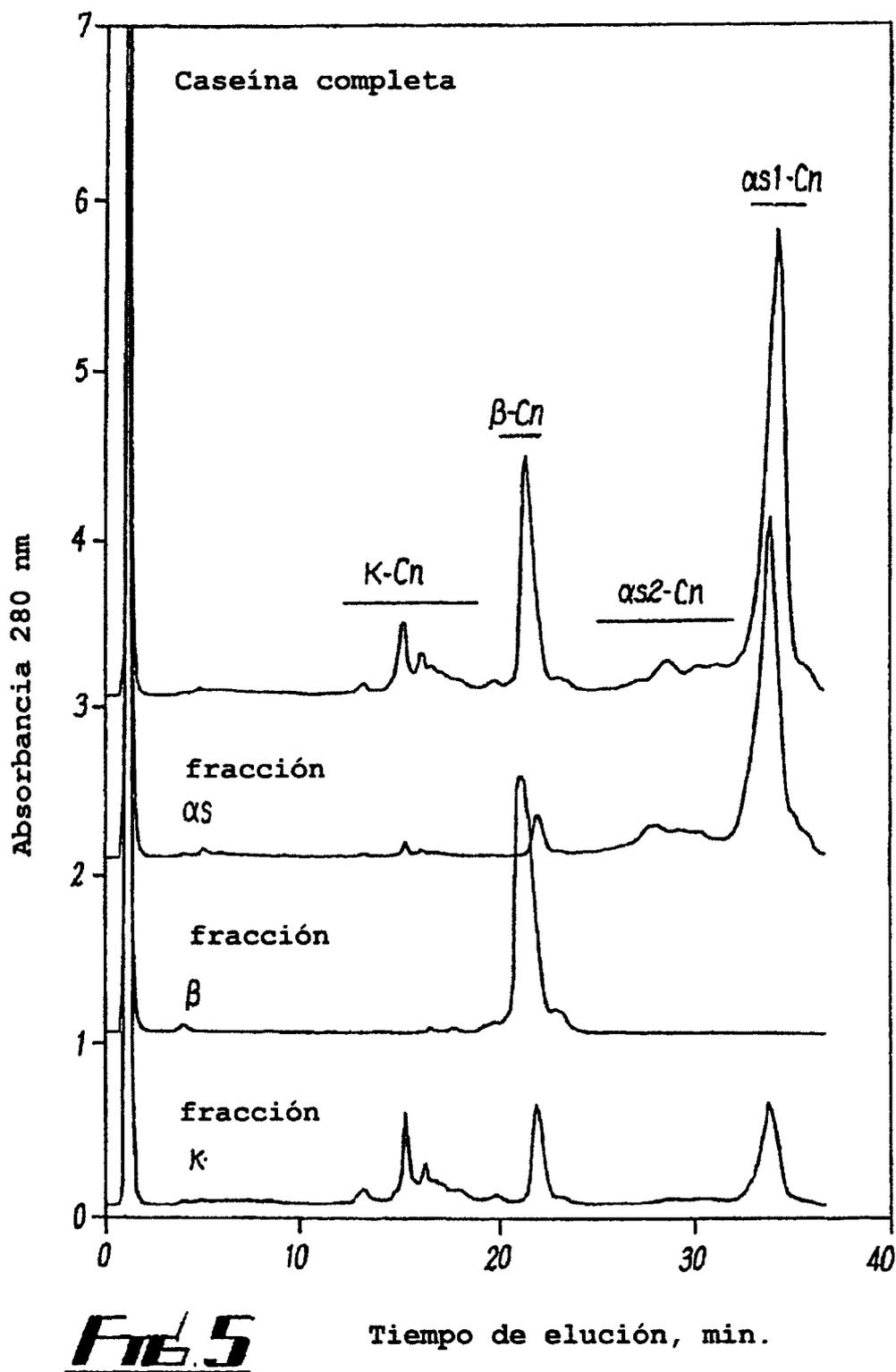
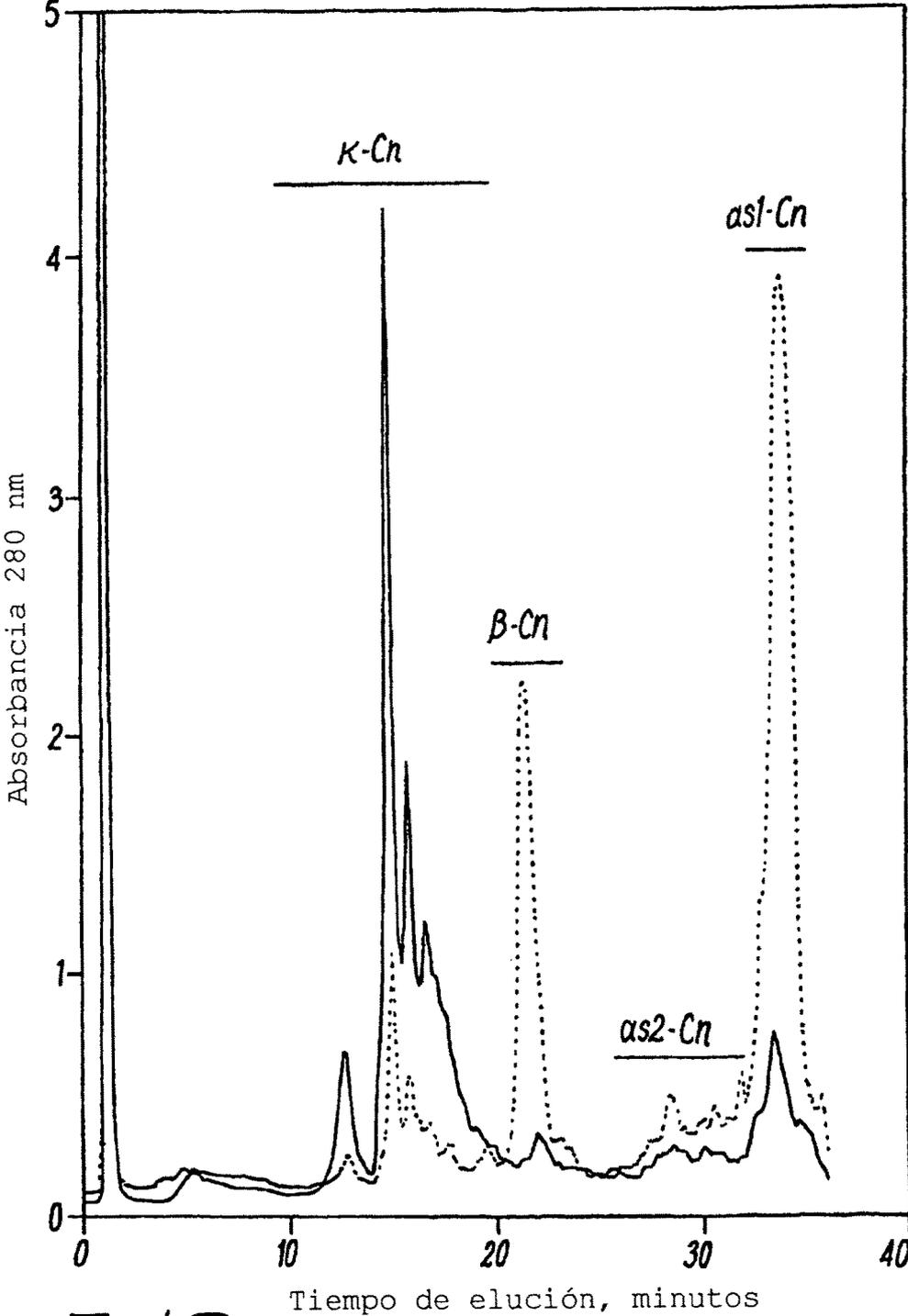


Fig. 4





FTEG

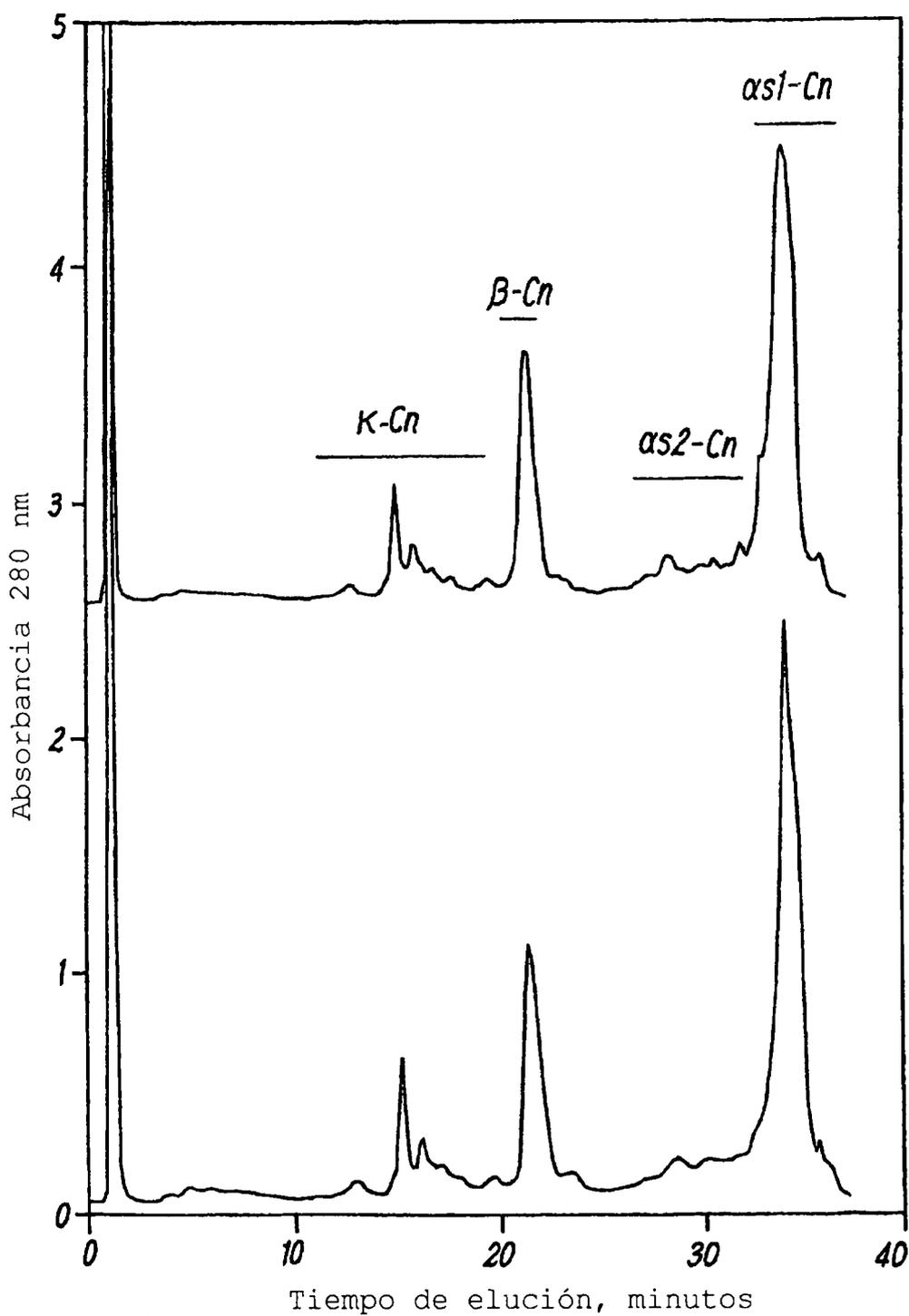


Fig. 7

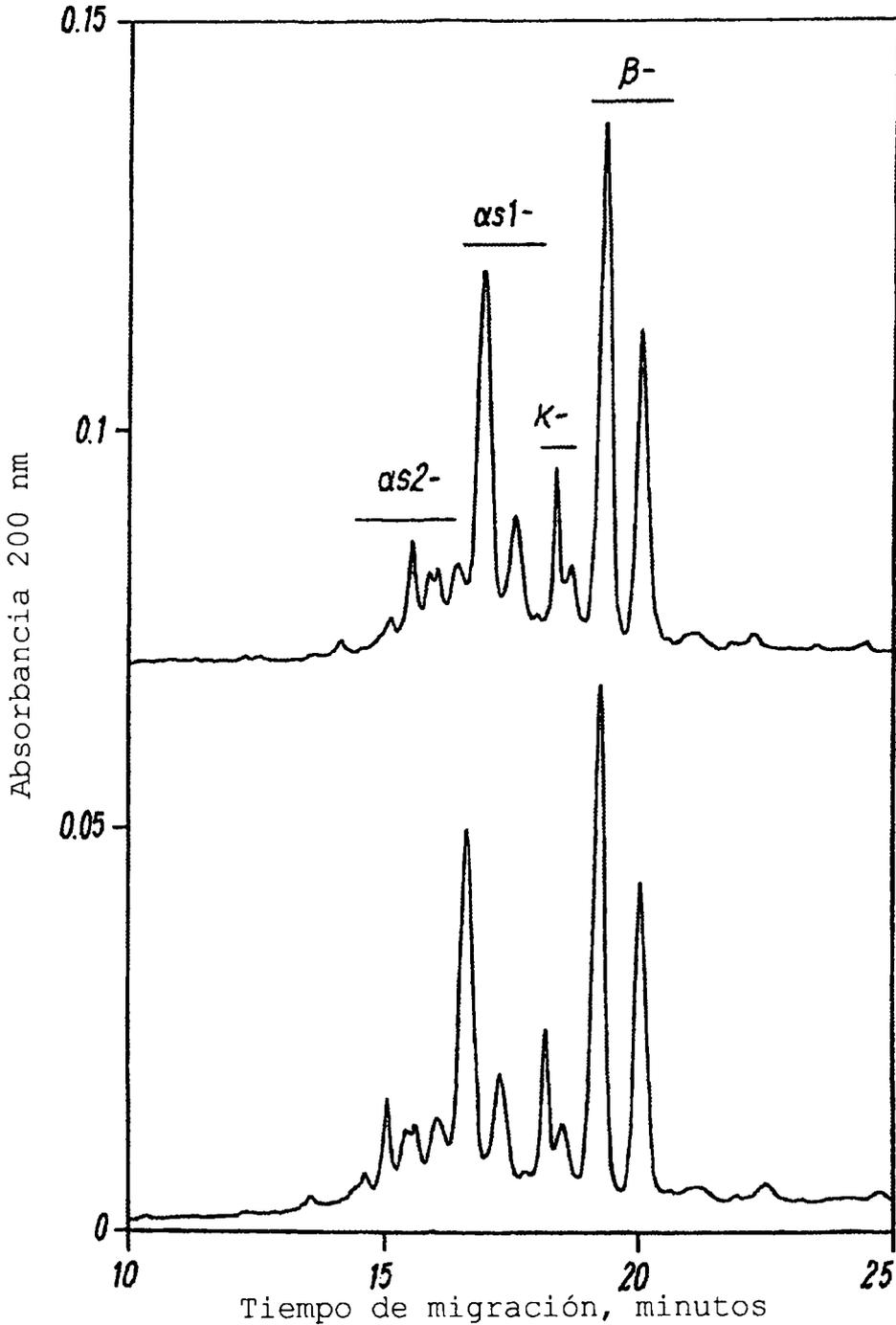


Fig. 8

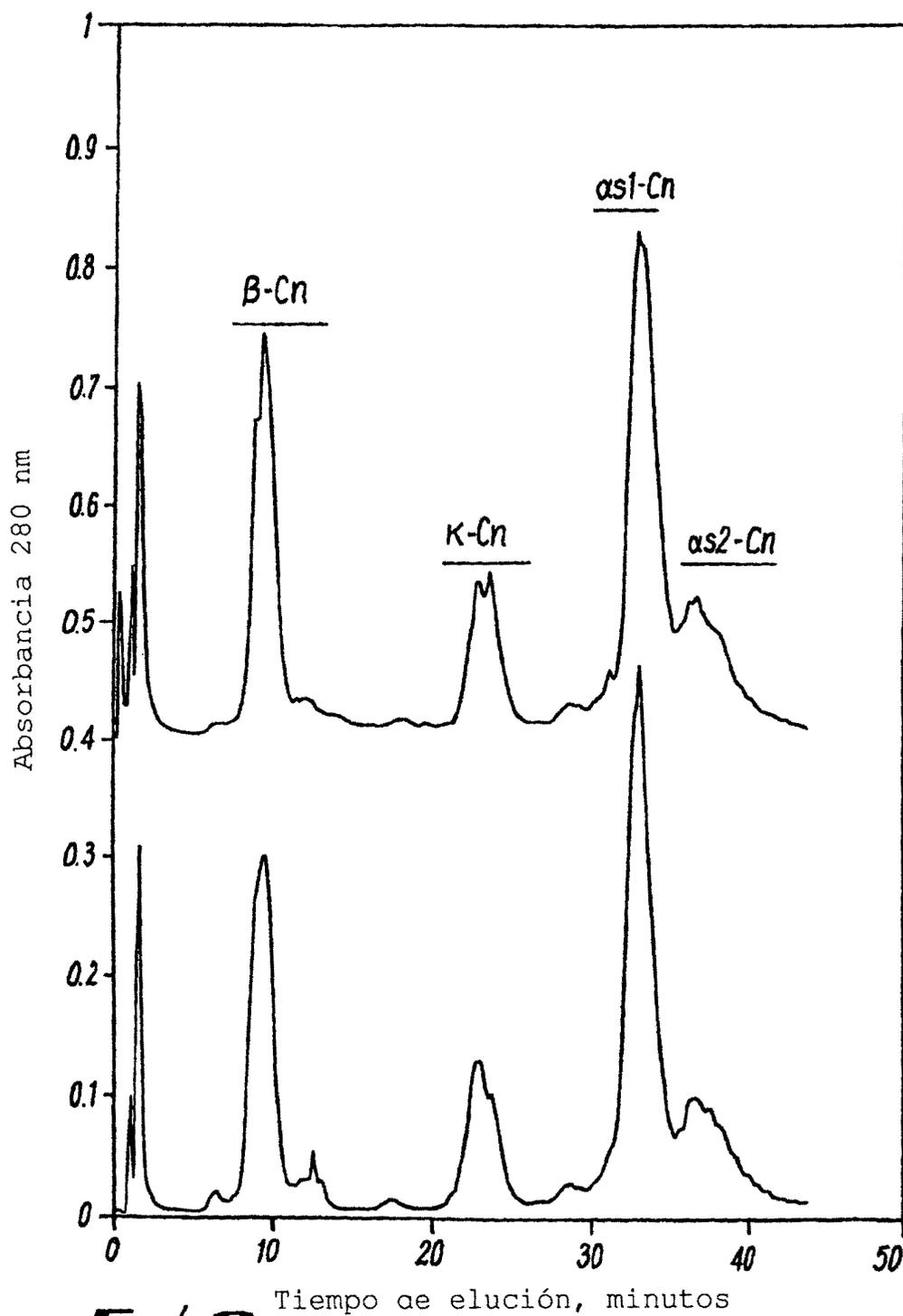


Fig. 9

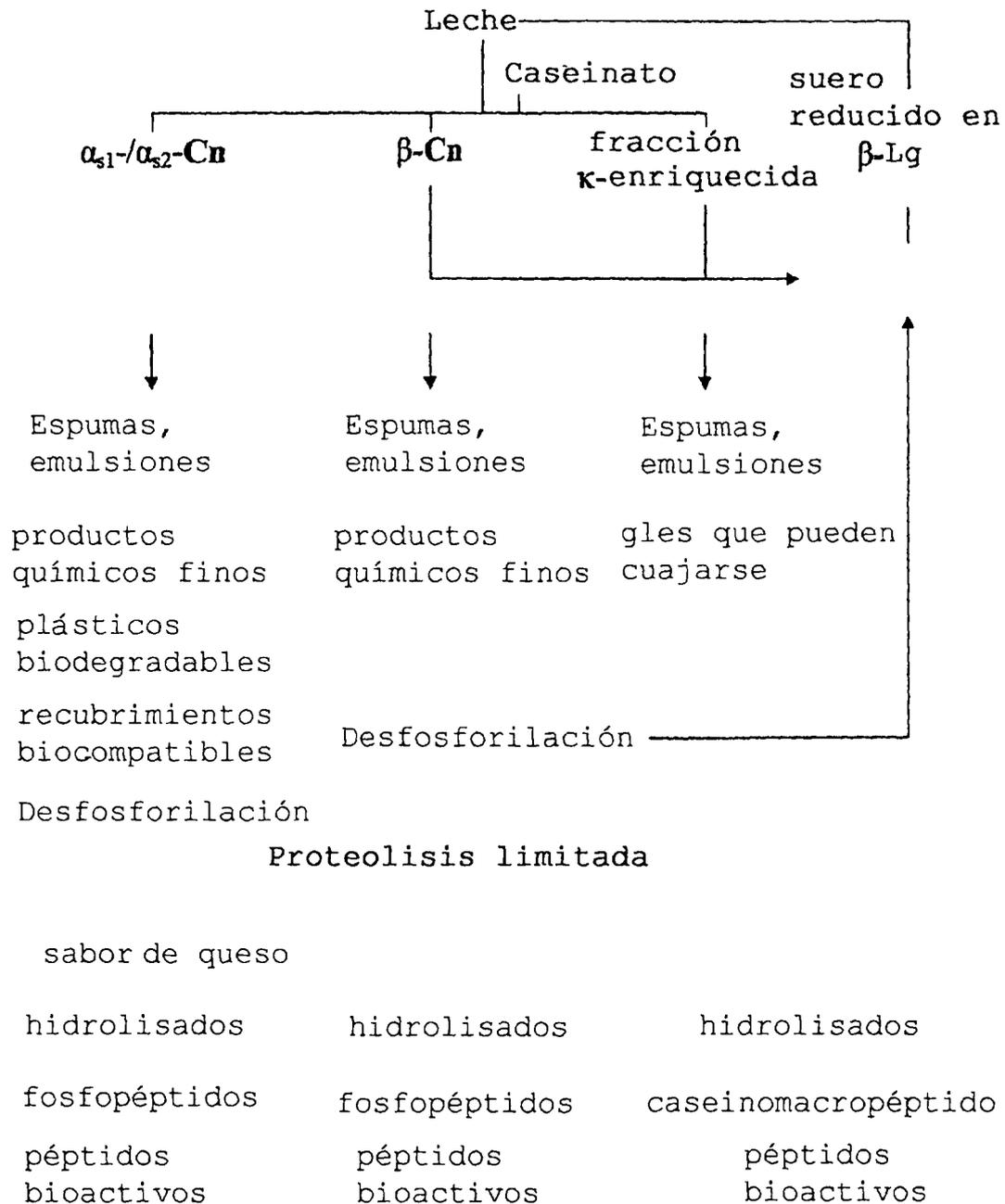


Fig. 10