



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 255**

51 Int. Cl.:  
**A23G 9/38** (2006.01)  
**A23C 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06006298 .1**  
96 Fecha de presentación : **27.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1839495**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **Postre congelado enriquecido con proteínas.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.05.2011**

73 Titular/es: **NESTEC S.A.**  
**avenue Nestlé 55**  
**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es: **Bovetto, Lionel Jean René;**  
**Schmitt, Christophe Joseph Etienne y**  
**Panyam, Dinakar**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 359 255 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

Postre congelado enriquecido con proteínas

## 5 Campo de la invención

10 La presente invención está relacionada con postres congelados, en particular postres congelados pasteurizados con un alto contenido de proteínas, y con un método para la elaboración de estos. La presente invención también está relacionada con el uso de micelas de proteínas del suero de leche, concentrados de éstas y/o polvos de las mismas en la elaboración de postres congelados.

Antecedentes

15 Se han realizado varios intentos de mejorar la calidad nutricional de los sorbetes congelados, especialmente de los helados que contienen grasa.

20 Los helados bajos en grasa han estado en el mercado durante décadas. Estas recetas, generalmente, tienen un mayor contenido en carbohidratos, utilizan edulcorantes artificiales o tienen un contenido de proteínas mayor. Los productos de alimentación congelados con un elevado contenido de proteínas se describen en la patente US 2006/0008557, por ejemplo.

Ciertamente, cada vez más las proteínas, en particular las proteínas del suero de leche, se utilizan como sustituto parcial de la grasa y también como emulsionantes en la industria alimentaria.

25 La patente US 6767575 B1 describe la preparación de un producto de agregados de proteína del suero de leche, mediante la cual la proteína del suero de leche se desnaturaliza mediante acidificación y calentamiento. Los agregados de proteínas obtenidos de este modo se utilizan en la industria alimentaria.

30 La patente GB 1079604 describe mejoras en la elaboración de queso, mediante la cual las proteínas del suero de leche son sometidas a un tratamiento térmico a un valor de pH óptimo, para así obtener proteínas del suero de leche insolubles que se añaden después a la leche cruda.

35 La patente WO 93/07761 está relacionada con proporcionar un producto proteico seco microparticulado que puede utilizarse como sustituto de la grasa.

La patente US 5750183 describe un proceso para producir micropartículas proteicas útiles como sustitutos de grasa que no contienen grasa.

40 Un sustituto proteico de grasa también se describe en la patente WO 91/17665 en la que las proteínas se presentan en forma de proteína de suero de leche desnaturalizada, microparticulada y soluble en agua.

45 Sin embargo, uno de los problemas que se dan en la producción de productos que contienen, en general, proteínas globulares, y en particular proteínas del suero de leche, es su limitada procesabilidad. Además, cuando se calientan las moléculas de proteína, cuando se someten a condiciones ácidas o básicas o en presencia de sales, éstas tienden a perder su estructura nativa y se reensamblan en varias estructuras aleatorias tales como geles, por ejemplo.

El tema de la patente EP 1281322 es la preparación de compuestos acuosos gelificados de proteínas del suero de leche.

50 Elofsson et al. en el International Dairy Journal, 1997, págs. 601-608 describen la gelificación fría de concentrados de proteína del suero de leche.

55 De un modo similar, Kilara et al. en el Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1998, págs. 1830-1835 describen el efecto del pH en la agregación de las proteínas del suero de leche y su gelificación.

60 El efecto gel no sólo presenta limitaciones en relación a la procesabilidad (por ejemplo, la obstrucción de las máquinas utilizadas en la elaboración de productos que contienen proteínas) sino también en relación con la textura que de este modo se obtiene, la cual puede no ser idónea para su aplicación en postres congelados. Por lo tanto, es deseable una desnaturalización controlada de las proteínas a fin de ampliar la utilización de las proteínas.

Erdman describe en el Journal of American College of Nutrition, 1990, págs. 398-409 que la calidad de las proteínas microparticuladas no se ve afectada a pesar de la utilización de un mayor cizallamiento y calor.

65 La patente EP 0603981 también describe una emulsión termoestable de aceite en agua que contiene proteínas.

La patente DE 199 06 379 A1 explica un proceso para la producción de un producto de agregados de proteína del suero de leche y sus aplicaciones en helados con, por ejemplo, un contenido de proteínas del 3,8%.

5 La patente WO 2006/034857, que se ha publicado después de la fecha de registro de esta aplicación, muestra en el ejemplo 9 la producción de helados enriquecidos con proteínas del suero de leche con un contenido de grasa reducido.

10 Un problema adicional que se deriva del uso de proteínas del suero de leche es su impacto en el perfil de sabor del producto final, por ejemplo, puede que éstas dejen una sensación astringente.

Por lo tanto, uno de los objetivos de la invención es proporcionar una técnica para mejorar el impacto de los postres congelados en el consumidor, como por ejemplo, el perfil nutricional de los postres congelados, y/o mejorar el perfil organoléptico de los postres congelados que contienen proteínas.

15 Resumen de la invención

De acuerdo con lo expuesto, este objetivo se logra mediante las características de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes desarrollan aún más la idea central de la presente invención.

20 Para lograr este propósito, de acuerdo con la reivindicación 1 se proporciona un postre congelado pasteurizado que contiene micelas de proteína del suero de leche, según un primer aspecto de la invención.

25 La utilización de micelas de proteínas del suero de leche en postres congelados de acuerdo con la reivindicación 16 constituye otro aspecto de la presente invención.

Finalmente, la presente invención proporciona, de acuerdo con un aspecto adicional, un proceso para la elaboración de un postre congelado según la reivindicación 17.

30 Figuras

La Fig. 1 muestra el resultado de un experimento que demuestra el efecto del pH y del tratamiento térmico en la micelización de la  $\beta$ -lactoglobulina.

35 La Fig. 2 muestra un medio para determinar el pH de micelización para un preparado comercial (Bipro®, lote JE032-1-420) utilizando mediciones de turbidez a 500 nm.

La Fig. 3 es una micrografía tomada con microscopio electrónico de transmisión de micelas de proteína del suero de leche (2% en peso, WPI 95, Lactalis) a pH 7,4. La barra de escala es de 200 nm.

40 La Fig. 4 muestra el resultado de un experimento que evalúa el impacto de la fuerza iónica (Arginina HCl) en la formación de micelas de proteínas a pH 7,0 constante.

45 La Fig. 5 muestra la estabilidad del volumen de la espuma (FVS, del inglés *foam volume stability*) estabilizada mediante micelas de  $\beta$ -lactoglobulina (Davigco) al 1% en peso a pH 7,0, en presencia de Arginina HCl 60 mM comparado con la  $\beta$ -lactoglobulina no micelizada.

50 La Fig. 6 muestra el diámetro hidrodinámico equivalente, basado en la intensidad, de una proteína del suero de leche obtenida mediante tratamiento térmico de una dispersión de  $\beta$ -lactoglobulina al 1% en peso durante 15 min. a 85°C, a un pH que oscila entre 2 y 8. Las micelas de proteína del suero de leche se obtienen a pH 4,25 (cargadas positivamente con un potencial zeta de unos +25 mV) y a pH 6,0 (cargadas negativamente con un potencial zeta de unos -30 mV). El diámetro hidrodinámico Z-promediado de las micelas fue de 229,3 nm a pH 4,25 y de 227,2 nm a pH 6,0. Se muestran las micrografías correspondientes a las micelas obtenidas mediante MET tras su tinción negativa. Las barras de escala son de 1  $\mu$ m.

55 La Fig. 7 muestra una estructura altamente esquemática de una micela de proteína del suero de leche.

La Fig. 8 muestra una micrografía de MEB (microscopio electrónico de barrido) de polvo de micelas de proteínas del suero de leche obtenido tras un secado por pulverización de una dispersión con un contenido de proteínas del 20% tras su microfiltración.

60 La Fig. 9 es una micrografía de MET con tinción negativa de una dispersión de micelas de proteínas del suero de leche obtenida con un contenido de proteínas del 4%.

65 La Fig. 10 es una micrografía de MET con tinción negativa de una dispersión de micelas de proteínas del suero de leche obtenida con un contenido de proteínas del 20% tras su microfiltración.

- La Fig. 11 muestra la termoestabilidad de una dispersión de micelas de proteínas del suero de leche obtenida con un contenido proteico del 10%, tras su microfiltración, a pH 7,0 en presencia de NaCl y después de calentarla a 85°C durante 15 min.
- 5 La Fig. 12 muestra la termoestabilidad de una dispersión de proteína del suero de leche obtenida con un contenido proteico del 4% a pH 7,0, en presencia de NaCl y después de calentarla a 85°C durante 15 min.
- La Fig. 13 es una micrografía de MET con tinción negativa de una dispersión de micelas de proteínas del suero de leche al 4% basada en polvo puro secado por pulverización de micelas de proteínas del suero de leche, tras su dispersión a 50°C en agua desionizada.
- 10 La Fig. 14 es un gráfico que muestra la distribución de tamaño de las micelas obtenidas mediante el proceso de la invención, utilizando un aislamiento de proteína del suero de leche Prolacta 90 al 4% a pH 5,9.
- 15 La Fig. 15 es una micrografía de MEB que muestra la estructura interna tras el corte de un gránulo de polvo secado por pulverización que se presenta en la Figura 8.
- La Fig. 16 es una micrografía de MET con tinción negativa de una dispersión de micelas de proteínas del suero de leche al 4% basada en polvo puro liofilizado de micelas de proteína del suero de leche tras su dispersión a temperatura ambiente en agua desionizada. La barra de escala es de 0,5 micrómetros.
- 20 La Fig. 17 es una visión esquemática del recubrimiento de las WPM (del inglés, micelas de proteína del suero de leche) con SBO (oleato de butilo sulfatado) bajo el aumento de la proporción de mezclado a pH 3,0.  
Círculo gris: WPM con cargas en superficie positivas. Punto negro + cola: cabeza cargada negativamente y cola hidrofóbica del SBO.
- 25 La Fig. 18 es una fotografía de un concentrado de micelas de proteína del suero de leche al 20% obtenido tras evaporización, al que se ha añadido NaCl al 4%.
- 30 Descripción detallada de la invención
- La presente invención, en un aspecto, está relacionada con postres congelados que incluyen micelas de proteína del suero de leche
- 35 La Figura 7 es una representación esquemática de las micelas de proteína del suero de leche en la que las proteínas del suero de leche están organizadas de tal manera que las partes hidrófilas de las proteínas están orientadas hacia la parte externa del aglomerado y las partes hidrofobas de las proteínas están orientadas hacia el núcleo interior de la micela. Esta configuración energéticamente favorable ofrece una buena estabilidad a estas estructuras en un ambiente hidrófilo.
- 40 La estructura específica de la micela puede verse en las figuras, en concreto las figuras 3, 9, 10, 13 y 15. Las micelas utilizadas en la presente invención consisten esencialmente en aglomerados esféricos de proteína del suero de leche desnaturalizada.
- 45 Debido a su carácter dual (hidrófilo e hidrófobo), este estado desnaturalizado de la proteína parece permitir la interacción con una fase hidrófoba, por ejemplo aire o una gota de agua, y con una fase hidrófila. Por consiguiente, las micelas de proteína del suero de leche tienen unas propiedades emulsionantes y de espumado perfectas.
- 50 Además, las micelas pueden producirse de tal manera que tengan una distribución de tamaño bien definida (ver Fig. 14), de forma que más del 80% de las micelas producidas tienen un tamaño menor a 1 micra, preferiblemente entre 100 nm y 900 nm, más preferiblemente entre 100-770 nm, y lo más preferible entre 200 y 400 nm.
- 55 El diámetro medio de las micelas puede determinarse utilizando un microscopio electrónico de transmisión (MET). Para llevar a cabo esta tarea, las muestras líquidas de las micelas se encapsulan en tubos de gel de agar. La fijación se logra mediante la inmersión en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M, a pH 7,4 y una post-fijación mediante tetraóxido de osmio al 2% en el mismo tampón, conteniendo ambas soluciones rojo de Rutenio al 0,04%. Tras la deshidratación en una serie creciente de etanol (etanol 70, 80, 90, 96, 100%), las muestras se incluyen en resina Spurr (Spurr/ etanol 1:1, 2:1, 100%). Después de la polimerización de la resina (70°C, 48 horas), se cortan secciones ultrafinas y semifinas con un ultramicrotomo Leica ultracut UCT. Las secciones ultrafinas, teñidas con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo, se examinan entonces mediante microscopía electrónica de transmisión (Philips CM12, 80 kV).
- 60 Sin intención de unirse a la teoría, se cree que durante la formación de la micela, ésta alcanza un tamaño "máximo", debido a la carga electrostática global de la micela que repele cualquier molécula proteica adicional, de forma que la micela ya no puede crecer más en tamaño. Esto puede explicar la estrecha distribución de tamaño que se observa (véase la Fig. 14).
- 65

Las micelas de proteína del suero de leche que se utilizan en la presente invención se obtienen mediante el ajuste del pH de una solución desmineralizada de proteína del suero de leche nativa, que tiene un contenido en proteínas del 0,1% en peso al 12% en peso en base al peso total de la solución, a un valor entre 5,8 y 6,6 y el calentamiento de la solución a una temperatura de 82 a 89°C durante entre 10 segundos y 2 horas.

En la elaboración de las micelas puede utilizarse como proteína del suero de leche cualquiera de los aislamientos o concentrados de proteína del suero de leche disponibles en el mercado, es decir, proteína del suero de leche obtenida mediante cualquier proceso para la preparación de proteína del suero de la leche conocido en la materia, así como fracciones de proteína del suero de leche preparadas a partir de éstos o proteínas tales como  $\beta$ -lactoglobulina (BLG),  $\alpha$ -lactalbúmina y seroalbúmina. En particular, el lactosuero dulce obtenido como subproducto en la elaboración del queso, el lactosuero ácido obtenido como subproducto en la elaboración de caseína ácida, el suero de leche nativo obtenido mediante microfiltración de leche o el suero de cuajo de leche obtenido como subproducto en la elaboración de caseína de cuajo pueden utilizarse como proteínas del suero de leche. La proteína del suero de leche puede que provenga de una sola fuente o de una mezcla de cualquiera de las fuentes.

La fuente de la proteína del suero de leche nativa no se limita a los aislamientos de suero de leche de origen bovino, sino que incluye aislamientos de suero de leche de todas las especies de animales mamíferos, tales como ovejas, cabras, caballos y camellos. Además, puede aplicarse un proceso aquí descrito a preparados de suero de leche mineralizados, desmineralizados o débilmente mineralizados. Se entiende como "débilmente mineralizado" cualquier preparado de suero de leche tras la eliminación de los minerales libres que son dializables y diafiltrables, pero que mantiene minerales asociados a éste mediante mineralización natural tras la preparación del concentrado o aislamiento de la proteína del suero de leche, por ejemplo. Estos preparados "débilmente mineralizados" no han tenido ningún enriquecimiento mineral específico.

Las proteínas del suero de leche tienen una mejor relación de eficiencia proteica (PER = 118) en comparación con, por ejemplo, la caseína (PER = 100). La PER es una medida de la calidad proteica que se evalúa determinando en qué medida esta proteína aporta un aumento de peso. Se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

**PER = aumento de peso corporal (g) / ingesta de peso de proteínas**

Ejemplos	PER	% caseína
Caseína	3,2	100
Huevo	3,8	118
Suero de leche	3,8	118
Soja entera	2,5	78
Gluten de trigo	0,3	9

Para producir micelas de proteína del suero de leche, las proteínas del suero de leche están presentes en una solución acuosa en una cantidad del 0,1% en peso al 12% en peso, preferiblemente en una cantidad del 0,1% en peso al 8% en peso, más preferiblemente en una cantidad del 0,2% en peso al 7% en peso, aún más preferiblemente en una cantidad del 0,5% en peso al 6% en peso, lo más preferible en una cantidad del 1% en peso al 4% en peso en base al peso total de la solución.

La solución acuosa del preparado de proteína del suero de leche, tal y como se presenta antes del paso de micelización, también puede contener componentes adicionales, así como subproductos de los respectivos procesos de producción de suero de leche, otras proteínas, gomas o carbohidratos. La solución también puede contener otros ingredientes alimenticios (grasa, carbohidratos, extractos vegetales, etc.). La cantidad de dichos componentes adicionales preferiblemente no excede el 50% en peso, preferiblemente el 20% en peso, más preferiblemente no excede el 10% en peso del peso total de la solución.

La proteína del suero de leche, así como las fracciones y/o proteínas principales procedentes de la misma pueden utilizarse tanto en su forma purificada como en forma de producto bruto. El contenido de cationes divalentes en la proteína del suero de leche para la preparación de micelas de proteína del suero de leche puede ser menor al 2,5%, más preferiblemente menor al 2%, aún más preferiblemente menor al 0,2%. Lo más preferible es que las proteínas del suero de leche estén completamente desmineralizadas.

El pH y la fuerza iónica son factores importantes en la elaboración de micelas de proteína del suero de leche. De este modo, se ha descubierto que, de las muestras extensamente dializadas que están prácticamente desprovistas o carentes de cationes libres, tales como Ca, K, Na y Mg, se obtiene cuajada cuando se realiza un tratamiento térmico durante un periodo de tiempo de entre 10 s y 2 horas a un pH inferior a 5,4, mientras que a un pH superior a 6,8 se produce proteína del suero de leche soluble (ver Figura 1). Así pues, sólo se obtendrán micelas de proteína del suero de leche que tengan un diámetro de menos de 1  $\mu$ m dentro de esta ventana bastante estrecha de pH. Estas micelas tendrán una carga global negativa. También se puede obtener la misma forma de micela de forma simétrica por

debajo del pH isoeléctrico, es decir, de 3,5 a 5,0, más preferiblemente de 3,8 a 4,5, dando como resultado micelas que están cargadas positivamente (ver Figura 6).

5 Por lo tanto, con tal de obtener micelas cargadas positivamente, la micelización de las proteínas del suero de leche puede llevarse a cabo en una solución sin sales a un valor de pH ajustado entre 3,8 y 4,5 dependiendo del contenido mineral de la fuente de proteína.

10 Preferiblemente, las micelas utilizadas en la presente invención tendrán una carga global negativa. El pH de la solución acuosa previa al calentamiento puede ajustarse a un rango que va de 6,3 a 9,0, para un contenido de cationes divalentes comprendido entre el 0,2% y el 2,5% en el polvo de proteína del suero de leche.

15 Más específicamente, para obtener micelas negativamente cargadas, el pH se ajusta a un rango de entre 5,6 y 6,4, más preferiblemente de entre 5,8 y 6,0 para un contenido bajo en cationes divalentes (por ejemplo, menos del 0,2% del polvo inicial de proteína del suero de leche). El pH puede incrementarse hasta 8,4 dependiendo del contenido mineral de la fuente de proteína del suero de leche (concentrado o aislamiento). En particular, el pH puede estar entre 7,5 y 8,4, preferiblemente entre 7,6 y 8,0 para obtener micelas cargadas negativamente en presencia de grandes cantidades de minerales libres, y el pH puede estar entre 6,4 y 7,4, preferiblemente entre 6,6 y 7,2 para obtener micelas cargadas negativamente en presencia de cantidades moderadas de minerales libres. Como regla general, cuanto más alto sea el contenido de calcio y/o magnesio en el polvo inicial de proteína del suero de leche, mayor será el pH de micelización.

25 Para estandarizar las condiciones de formación de micelas de proteína del suero de leche, lo más preferible es desmineralizar mediante cualquiera de las técnicas conocidas de desmineralización (diálisis, ultrafiltración, osmosis inversa, cromatografía de intercambio iónico...) cualquier fuente líquida de proteínas del suero de leche nativas con una concentración proteica que oscile entre la del lactosuero dulce, la del permeado de microfiltración de leche o la del lactosuero ácido (0,9% de contenido proteico), hasta la de un concentrado con un 30% de contenido proteico. La diálisis puede llevarse a cabo frente a agua (destilada, desionizada o blanda), pero como esto sólo permitirá la eliminación de los iones unidos débilmente a las proteínas del suero de leche, es más preferible dializar contra un ácido a un pH inferior a 4,0 (orgánico o inorgánico) para un mejor control de la composición iónica de las proteínas del suero de leche. Haciendo esto, el pH de la formación de micelas de proteína del suero de leche estará por debajo de pH 7,0, más preferiblemente estará comprendido entre 5,8 y 6,6.

35 Con anterioridad al calentamiento de la solución acuosa de proteína del suero de leche, el pH generalmente se ajusta mediante la adición de ácido, el cual es preferiblemente de calidad alimentaria, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido glucónico o ácido láctico. Cuando el contenido mineral es alto, el pH generalmente se ajusta mediante la adición de una solución básica, la cual es preferiblemente de calidad alimentaria, tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico o hidróxido amónico.

40 Alternativamente, si no se desea realizar el paso de ajuste de pH, es posible ajustar la fuerza iónica del preparado de proteína del suero de leche manteniendo el pH constante. Entonces, la fuerza iónica puede ajustarse mediante iones orgánicos o inorgánicos de tal forma que permita la micelización a un valor de pH constante de 7. La Figura 4 muestra que las micelas pueden formarse a un valor de pH constante de 7 mientras la fuerza iónica varía mediante la adición de 70-80mM de arginina HCl.

45 Además, se puede añadir un tampón a la solución acuosa de proteína del suero de leche con el fin de evitar un cambio sustancial en el valor de pH durante el tratamiento térmico de la proteína del suero de leche.

50 En principio, el tampón puede seleccionarse de un sistema de tamponado de calidad alimentaria, es decir, ácido acético y sus sales, tales como, por ejemplo, acetato sódico o acetato potásico, ácido fosfórico y las sales del mismo, por ejemplo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , o ácido cítrico y las sales del mismo, etc.

55 El ajuste del pH y/o la fuerza iónica de la solución acuosa da como resultado un proceso controlado que produce micelas que tienen un tamaño de entre 100 nm - 900 nm, preferiblemente entre 100 - 700 nm, lo más preferible entre 200 - 400 nm. Preferiblemente, la distribución de las micelas que tienen dimensiones de entre 100 - 700 nm es mayor al 80% cuando se lleva a cabo el proceso de micelización descrito en este apartado (ver Figura 14).

60 En un segundo paso del proceso para la formación de micelas de proteína del suero de leche, la solución acuosa inicial de proteína del suero de leche se somete a tratamiento térmico. En este sentido, se ha encontrado que para obtener micelas de proteína del suero de leche es importante tener una temperatura en un rango de entre 82 y 89°C, más preferiblemente de entre 84 y 87°C, lo más preferible a unos 85°C.

65 Una vez se alcanza la temperatura deseada, se mantiene la solución acuosa de proteína del suero de leche a esta temperatura durante un mínimo de 10 segundos y un máximo de 2 horas. Preferiblemente, el periodo de tiempo durante el cual se mantiene la solución acuosa de proteína del suero de leche a la temperatura deseada oscila entre 12 y 25 minutos, más preferiblemente entre 12 y 20 minutos, o lo más preferible alrededor de 15 minutos.

El tratamiento térmico también puede llevarse a cabo en un horno microondas o cualquier aparato similar que permita el calentamiento mediante microondas con una proporción tiempo/ cantidad de 10 s/ 10 mL para una solución proteica al 4% en peso calentada en un aparato de 1500 W hasta la temperatura de ebullición (98°C a una altura de 833 m). También puede utilizarse un proceso continuo mediante adición de 8 o más magnetrones alrededor de un tubo de vidrio potencialmente prolongado por un tubo de retención para aumentar el tiempo de incubación.

Tal y como se muestra en la Figura 2, las mediciones de turbidez son una indicación de la formación de micelas. La turbidez medida mediante absorbancia a 500 nm puede ser al menos de 3 unidades de absorbancia para la solución proteica al 1%, pero puede alcanzar 16 unidades de absorbancia cuando el rendimiento de la micelización está por encima del 80% (ver Figura 2).

Para ilustrar aún más el efecto de la formación de micelas desde un punto de vista fisicoquímico, una dispersión de Bipro® al 1% en peso se calentó durante 15 minutos a 85°C a pH 6,0 y 6,8 en agua Milli-Q. El diámetro hidrodinámico de los agregados obtenidos tras el tratamiento térmico fue medido mediante dispersión dinámica de la luz. El peso molecular aparente de los agregados fue determinado mediante dispersión estática de la luz utilizando la denominada representación Debye. La hidrofobicidad de superficie fue analizada utilizando la sonda hidrófoba ANS y los grupos tiol libres accesibles mediante el método DTNB, utilizando cisteína como el aminoácido estándar. Finalmente, la morfología de los agregados fue estudiada mediante tinción negativa en el MET. Los resultados se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de los agregados solubles de proteína del suero de leche obtenidos mediante el tratamiento térmico (85°C, 15 min.) de una dispersión de proteínas al 1% m/m en presencia o ausencia de NaCl.**

pH	Diámetro hidrodinámico (nm)	Peso molecular $M_w$ ( $\times 10^6$ g.mol <sup>-1</sup> )	Morfología	$\zeta$ -potencial	Hidrofobicidad de superficie proteica ( $\mu\text{g.mmol}^{-1}$ ANS)	Grupos SH accesibles (nmol SH.mg <sup>-1</sup> prot.)
6,0	120,3 $\pm$ 9,1	27,02 $\pm$ 8,09	Agregados lineales	-31,8 $\pm$ 0,8	105,4	3,5 $\pm$ 0,4
6,8	56,2 $\pm$ 4,6	0,64 $\pm$ 0,01	de micelas esféricas	-27,9 $\pm$ 1,2	200,8	6,8 $\pm$ 0,5

A partir de la tabla 1, queda claro que las micelas de proteína del suero de leche que fueron formadas a pH 6,0 permiten que la proteína disminuya su hidrofobicidad de superficie ANS específica en un factor de 2, en comparación con la proteína del suero de leche no micelizada, calentada en las mismas condiciones, pero a pH 6,8. La formación de la micela también puede observarse mediante el gran peso molecular de  $27 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>, en comparación con  $0,64 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> para las proteínas no micelizadas, indicando un estado de la materia muy condensado en el interior de la micela (poca cantidad de agua). Curiosamente, el potencial  $\zeta$  de las micelas es incluso más negativo que el de las proteínas no micelizadas, aún cuando estas últimas han sido formadas a un pH más básico que las micelas. Esto es resultado de la superficie más hidrófila de las micelas que está expuesta al disolvente. Finalmente, debe observarse que la reactividad del tiol de las micelas es mucho menor que la de las proteínas no micelizadas a causa de la diferencia de pH en el tratamiento térmico.

Se ha encontrado que el rendimiento de la conversión de proteína del suero de leche nativa a micelas disminuye cuando la concentración inicial de proteína se aumenta antes del ajuste de pH y del tratamiento térmico. Por ejemplo, cuando se comienza con un aislamiento de proteína del suero de leche Prolacta 90 (lote 673 de Lactalis), el rendimiento de la formación de micelas de proteína del suero de leche desciende desde el 85% (cuando se comienza con un 4% de proteínas) al 50% (cuando se comienza con un 12% de proteínas). Con tal de maximizar la formación de micelas de proteína del suero de leche (> 85% del contenido inicial de proteína), puede que sea mejor comenzar con una solución acuosa de proteína del suero de leche que tenga una concentración de proteínas inferior al 12%, preferiblemente inferior al 4%. Dependiendo de las aplicaciones finales que se deseen, la concentración de proteína puede ajustarse antes del tratamiento térmico para lograr el rendimiento óptimo de micelas de proteína del suero de leche.

Las micelas de proteína del suero de leche obtenibles de acuerdo con el proceso descrito en este apartado deberán tener un tamaño con un diámetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 100 a 990 nm, más preferiblemente de 100 a 700 nm, lo más preferible de 200-400 nm.

Dependiendo de la aplicación deseada, el rendimiento de micelas puede ser de al menos un 50%, preferiblemente al menos un 80%, y los agregados solubles residuales o contenido de proteína soluble serán preferiblemente inferiores al 20%. El tamaño medio de las micelas se caracteriza por un índice de polidispersión por debajo de 0,200. Como consecuencia, las micelas pueden observarse como una suspensión blanca que es estable y que tiene una apariencia láctea en un gran rango de pH 2-8. Se ha observado que las micelas de proteína del suero de leche podrían for-

mar agregados alrededor de un pH de 4,5, pero sin ninguna señal de separación de fases macroscópica tras al menos 12 horas a 4°C.

5 La pureza de las micelas de proteína del suero de leche puede obtenerse mediante la determinación de la cantidad de proteína soluble residual. Se eliminan las micelas mediante centrifugación a 20°C y 26.900 g durante 15 min. El sobrenadante se utiliza para determinar la cantidad de proteína en cubetas de cuarzo a 280 nm (paso de luz de 1 cm). Los valores se expresan como un porcentaje del valor inicial anterior al tratamiento térmico.

10 **Proporción de micelas = (Cantidad inicial de proteínas – cantidad de proteínas solubles) / Cantidad inicial de proteínas**

15 Las micelas de proteína del suero de leche obtenidas según el proceso de micelización aquí descrito no han sido sometidas a estrés mecánico alguno que llevase a la reducción del tamaño de las partículas durante su formación. Este método induce la micelización espontánea de las proteínas del suero de leche durante el tratamiento térmico en ausencia de cizallamiento.

Las micelas de proteína del suero de leche utilizadas en la presente invención pueden producirse de acuerdo con el proceso descrito en este apartado aunque no se limitan a éste.

20 Las micelas de proteína del suero de leche pueden utilizarse como tal en el postre congelado de la presente invención. Éstas también pueden utilizarse en forma de concentrado de micelas de proteína del suero de leche o un polvo de las mismas. Además las micelas de proteína del suero de leche pueden rellenarse con un componente activo. Adicionalmente, las micelas de proteína del suero de leche (puras o rellenadas con un componente activo) pueden recubrirse con un emulsionante tal como, por ejemplo, fosfolípidos u otros agentes de recubrimiento tales como la goma de acacia, con tal de modular la funcionalidad y el gusto de las micelas de proteína del suero de leche. Preferiblemente, el recubrimiento es un emulsionante seleccionado de entre oleato de butilo sulfatado, ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos, ésteres del ácido cítrico de monoglicéridos, lactilatos de estearoilo y mezclas de los mismos. La Fig. 17 es una representación esquemática de dicho recubrimiento con oleato de butilo sulfatado.

25 Así, la dispersión de micelas de proteína del suero de leche obtenida tras el tratamiento térmico puede concentrarse para producir un concentrado de micelas de proteína del suero de leche.

La concentración de las micelas de proteína del suero de leche puede llevarse a cabo por ejemplo mediante evaporación, centrifugación, sedimentación o microfiltración.

35 La evaporación puede llevarse a cabo en las micelas mediante la introducción de las micelas de proteína del suero de leche, obtenidas tras el tratamiento térmico, en un evaporador al vacío, a una temperatura de entre 50°C y 85°C. Generalmente, el producto resultante tendrá el aspecto de un gel o una crema, tal y como se muestra en la Figura 18. El concentrado de proteína obtenido mediante la evaporación tiene una textura cremosa y semisólida, y puede ser texturizado en una textura untable mediante acidificación utilizando ácido láctico. Esta textura líquida, cremosa y pastosa puede utilizarse para preparar postres congelados ácidos, dulces, salados, aromáticos y ricos en proteínas.

40 La centrifugación puede llevarse a cabo con una tasa de aceleración alta (más de 2000 g) o una tasa de aceleración baja (menos de 500 g) tras la acidificación de la dispersión de micelas de proteína del suero de leche a un pH inferior a 5, preferiblemente 4,5.

La sedimentación espontánea puede también llevarse a cabo sobre la dispersión de micelas de proteína del suero de leche mediante acidificación. Preferiblemente, el pH será de 4,5 y el tiempo de sedimentación superior a 12 horas.

50 Preferiblemente, la concentración de las micelas de proteína del suero de leche puede lograrse mediante microfiltración de la dispersión de micelas. Esta técnica de enriquecimiento no sólo permite concentrar las micelas de proteína del suero de leche mediante la eliminación del disolvente, sino que también permite la eliminación de la proteína no micelizada (como proteínas naturales o agregados solubles). De este modo, el producto final solamente consiste en micelas (tal y como se comprueba mediante microscopía electrónica de transmisión – véanse las figuras 9 y 10). En este caso, el factor de concentración que se puede alcanzar se obtiene después de que la tasa de flujo inicial de permeado a través de la membrana ha caído hasta el 20% de su valor inicial.

60 El concentrado de proteína del suero de leche así obtenido puede tener una concentración de, al menos, un 12%. Más aún, el concentrado puede contener al menos un 50% de la proteína en forma de micelas. Preferiblemente, al menos un 90% de la proteína estará en forma de micelas.

65 Es interesante tener en cuenta que si el concentrado se ajusta a un contenido de proteína del 10%, éste tiene la capacidad de soportar un tratamiento térmico subsiguiente a 85°C durante 15 min. a pH 7,0 en presencia de, por ejemplo, hasta 0,15 M de cloruro sódico, tal y como se muestra en la Figura 11. A modo de comparación, una dispersión de proteína nativa del suero de leche (Prolacta90, lote 500658 de Lactalis) forma un gel en presencia de 0,1

M de cloruro sódico a una concentración proteica de tan sólo el 4% (véase la Figura 12). La elevada estabilidad de la estructura de la micela se preserva así durante el paso de concentración.

El concentrado puede utilizarse tal cual o diluido, dependiendo del postre congelado de que se trate.

Por ejemplo, el concentrado de micelas de proteína del suero de leche, en sus formas líquida o desecada, puede diluirse hasta un contenido de proteína del 9%, como en la leche condensada y dulce. Pueden añadirse minerales de la leche, lactosa y sacarosa a fin de que el producto final tenga un perfil nutricional similar al de la leche, pero con sólo proteína del suero de leche como fuente proteica. Esta mezcla a base de proteína del suero de leche es más estable que la leche condensada dulce frente a la reacción de Maillard (basada en la velocidad de desarrollo de un color marrón) cuando se incuba durante 2 horas a 98°C (temperatura de ebullición del agua a una altura de 833m).

La forma de polvo desecado de micelas de proteína del suero de leche puede obtenerse mediante cualquiera de las técnicas conocidas, tales como el secado por pulverización, la liofilización, los rodillos de secado, etc. De este modo, las micelas de proteína del suero de leche pueden secarse por pulverización o por liofilización con o sin la adición de más ingredientes, y pueden utilizarse como sistema de liberación o como componente para emplearse en la elaboración del postre congelado de la presente invención.

La Figura 8 muestra un polvo obtenido mediante secado por pulverización, sin adición de ningún otro ingrediente, que tiene un tamaño medio de diámetro de partícula mayor a 1 micra, debido a la agregación de las micelas que ocurre durante el secado por pulverización. Tal polvo de proteína del suero de leche con un tamaño medio mayor a 1 micra puede utilizarse en el postre congelado de la presente invención. El diámetro de la mediana del volumen (D43) promedio típico de este polvo se encuentra entre las 45 y las 55 micras, preferiblemente 51 micras. El diámetro de la mediana de la superficie (D32) del polvo de micelas de proteína del suero de leche está preferiblemente entre 3 y 4 micras, y más preferiblemente es de 3,8 micras.

El contenido de humedad del polvo obtenidos tras el secado por pulverización preferiblemente es inferior al 10% y más preferiblemente menor al 4%.

Un polvo de micelas de proteína del suero de leche producido mediante secado por pulverización, con o sin adición de más ingredientes, puede contener al menos un 35% de micelas de proteína del suero de leche, y hasta al menos un 80% de micelas de proteína del suero de leche.

El polvo de micelas de proteína del suero de leche tiene una elevada capacidad de unión con disolventes tales como agua, glicerol, etanol, aceites etc. La capacidad de unión del polvo al agua es de al menos un 50%, preferiblemente de al menos un 90%, lo más preferible de al menos un 100%. Para los disolventes como el glicerol y el etanol, la capacidad de unión es de al menos un 50%. Para los aceites, es de al menos un 30%. Esta propiedad permite que los polvos puedan ser pulverizados o rellenados con agentes activos adicionales, y puedan utilizarse en los postres congelados de la presente invención.

Dichos agentes activos pueden ser seleccionados de entre vitaminas, minerales, antioxidantes, ácidos grasos poli-insaturados, péptidos, extractos vegetales, hidrolizados de proteínas, bioactivos, aromas, edulcorantes, azúcares, polisacáridos, sacarosa, suplementos, productos farmacéuticos, fármacos, componentes cosméticos, componentes sensibles al calor, la radiación UV, la luz, el oxígeno, los metales, la humedad, la temperatura, etc. Los agentes activos pueden ser componentes inestables tales como los polifenoles (procedentes del café, té verde, etc.), licopeno y otros carotenoides. Estos pueden incluir componentes tales como la cafeína, hesperidinas, sales solubles o insolubles, bacterias probióticas, colorantes, maltodextrinas, grasas, emulsionantes, ligandos etc.

Los agentes activos pueden estar incluidos en el polvo en una cantidad de entre 0,1 - 50%. De este modo, el polvo puede actuar como transportador para esos ingredientes funcionales. Esto presenta la ventaja que, por ejemplo, la percepción de la amargura de la cafeína se reduce cuando los polvos de micelas de proteína del suero de leche se rellenan con cafeína como agente activo y se utilizan en, por ejemplo, un postre congelado cafeinado.

Pueden mezclarse ingredientes adicionales con el concentrado de micelas de proteína del suero de leche con anterioridad al secado por pulverización. Estos incluyen sales solubles o insolubles, bacterias probióticas, colorantes, azúcares, maltodextrinas, grasas, emulsionantes, edulcorantes, aromas, extractos vegetales, ligandos o bioactivos (cafeína, vitaminas, minerales, fármacos...) y cualquier mezcla de los mismos. Los polvos de micelas de proteína del suero de leche resultantes incluyen micelas de proteína del suero de leche e ingredientes adicionales en una proporción de peso de entre 1:1 y 1:1000. En este caso, el polvo de micelas de proteína del suero de leche obtenido puede también actuar como transportador de agentes activos en el postre congelado de la invención.

Dicho polvo se caracteriza por tener una fluidez muy alta. Por ejemplo, este polvo se comporta casi como un líquido y presentan la ventaja de poder utilizarse y transferirse fácilmente. El ángulo de reposo de este polvo es preferiblemente inferior a 35°, más preferiblemente inferior a 30°. Dicho bajo ángulo de reposo permite que el polvo de la presente invención se utilicen como agentes fluidificantes en la industria alimentaria, por ejemplo.

- Una característica importante de estos polvos de micelas de proteína del suero de leche es que se conserva la estructura micelar básica de las proteínas del suero de leche. La Figura 15 muestra un grano de polvo de proteína del suero de leche que ha sido seccionado, y en el que se pueden observar micelas individuales de proteína del suero de leche. Además, la estructura de la micela puede reconstituirse fácilmente en disolventes. Se ha demostrado que el polvo obtenido de concentrado de micelas de proteína del suero de leche puede volver a dispersarse en agua a temperatura ambiente o 50°C. El tamaño y la estructura de las micelas de proteína del suero de leche están completamente conservados en comparación con el concentrado inicial. Por ejemplo, en la Figura 13, el concentrado de proteína del suero de leche que se secó por pulverización a una concentración de proteína del 20% se ha vuelto a dispersar en agua desionizada a 50°C a una concentración de proteína del 50%. La estructura de las micelas se ha demostrado mediante MET y se puede comparar en la Figura 10. Se obtuvieron unas micelas con una forma similar. Se encontró que el diámetro de las micelas era de 315 nm mediante dispersión dinámica de la luz con un índice de polidispersión de 0,2. La Figura 16 también muestra la dispersión de un polvo de micelas de proteína del suero de leche liofilizado, en el que las micelas están reconstituidas.
- El hecho de que, tras la reconstitución del polvo secado por pulverización o liofilizado, se observaran en solución micelas de proteína del suero de leche y tan sólo una pequeña fracción agregada confirma que las micelas de proteína del suero de leche son físicamente estables en relación al secado por pulverización, el liofilizado, etc.
- Las micelas de proteína del suero de leche utilizadas en la presente invención, en cualquiera de las formas expuestas en este apartado, han demostrado ser ideales para su utilización como emulsionante, sustituto de grasa, sustituto de caseína micelar o agente espumante, ya que son capaces de estabilizar la grasa y/o el aire en un sistema acuoso durante un periodo prolongado de tiempo.
- La estabilidad de la espuma se muestra en la Figura 5, la cual compara la utilización de proteína del suero de leche no micelar frente a proteína del suero de leche micelar.
- De este modo, las micelas de proteína del suero de leche pueden utilizarse como agente emulsionante, para lo que este material es ideal, ya que posee un gusto neutral y no se crea un sabor desagradable mediante la utilización de dicho material. También pueden utilizarse como sustitutos de caseína micelar.
- Además, las micelas de proteína del suero de leche están en una condición en la que sirven como agente blanqueador, de forma que se pueden cumplir varias tareas con un solo compuesto. El poder blanqueador del concentrado se incrementa en gran medida en comparación con los polvos de proteína nativa. Por ejemplo, el poder blanqueador de 4 mL de un concentrado de micelas de proteína del suero de leche al 15% equivale a 0,3% de óxido de titanio en 100 mL de una taza de café soluble al 2%.
- Del mismo modo que aumenta el poder blanqueador de sistemas lácteos con un mismo contenido de proteína total, también puede reducir el contenido de grasa en una matriz alimentaria. Esta característica representa una ventaja particular de la utilización de micelas de proteína del suero de leche, ya que permite que se produzcan postres congelados con un bajo contenido de grasas.
- Además, las micelas de proteína del suero de leche pueden utilizarse o bien solas o junto a otros materiales activos, tales como polisacáridos (por ejemplo, goma de acacia o carragenanos) para estabilizar las matrices y, por ejemplo, matrices de espuma láctea. Debido a su sabor natural, su poder blanqueador y su estabilidad tras el tratamiento térmico, las micelas de proteína del suero de leche pueden utilizarse para incrementar la blancura de la leche descremada y la sensación que produce en la boca.
- Como el suero de leche es un material disponible en abundancia, su uso reduce el coste de los productos que requieran un agente emulsionante, de relleno, blanqueador o espumante, a la vez que añade valor nutricional. Es más, las micelas utilizadas en la presente invención tienen una proporción de eficiencia proteica de al menos 100, preferiblemente de al menos 110, lo que las convierte en ingredientes nutricionales importantes.
- En consecuencia, las micelas de proteína del suero de leche pueden utilizarse en cualquiera de las formas descritas en este apartado para la preparación de cualquier tipo de postre congelado de acuerdo con la presente invención, tales como, por ejemplo, helados, batidos de leche, batidos de frutas, sorbetes, helados de hielo, mellorine, helado cremoso, etc.
- Las micelas de proteína del suero de leche además ofrecen la ventaja excepcional de poder obtener productos pasteurizados enriquecidos con proteínas a concentraciones que previamente no podían alcanzarse. De este modo, se pueden obtener postres congelados que contengan más de un 6% de proteína, preferiblemente más de un 10% de proteína. Adicionalmente, se puede obtener una variedad más amplia de productos bajos en grasas, ya que las micelas de proteína del suero de leche pueden actuar como sustitutos de grasa mientras se mantiene la estructura, textura y propiedades organolépticas deseadas.
- De acuerdo con esto, las micelas de proteína del suero de leche pueden estar incluidas en el postre congelado pasteurizado de la presente invención. Un postre congelado pasteurizado, según la presente invención, tiene un conte-

nido alto en proteínas, preferiblemente de más del 6%. Debido a la presencia de micelas de proteína del suero de leche, que en comparación con las proteínas nativas son muy estables durante su procesado, se pueden obtener postres congelados pasteurizados altos en proteínas, los cuales no pueden realizarse utilizando las fuentes de proteína descritos anteriormente.

De este modo, de acuerdo con otras realizaciones, la invención proporciona un postre congelado que tiene un contenido de proteína mayor al 8%, del que al menos una parte de las proteínas están presentes en forma de micelas de proteína del suero de leche. Preferiblemente, el contenido de proteína es superior al 10% del peso, más preferiblemente superior al 12%, aún más preferiblemente superior al 14%, lo más preferible superior al 16%.

En los postres congelados de la invención, las proteínas proporcionan al menos del 15% al 30% de la energía, las grasas proporcionan entre un 0% y un 45% de la energía, y los carbohidratos proporcionan entre un 25% y un 85% de la energía. Preferiblemente el valor calórico de las grasas es menor al 35%, más preferiblemente inferior al 25%, aún más preferiblemente inferior al 20%, lo más preferible inferior al 10%. Al menos un 50% del contenido total de proteínas es proporcionado por micelas de proteína del suero de leche.

Las micelas de proteína del suero de leche utilizadas en los postres congelados de la presente invención pueden proporcionarse en forma de suspensión, de concentrado o de polvo, habiéndose descrito todas estas formas con anterioridad. Las micelas de proteína del suero de leche pueden tener un tamaño medio menor a 1 micra, preferiblemente entre 100 - 900 nm. Si se utiliza polvo de micelas de proteína del suero de leche, este puede tener un tamaño medio mayor a 1 micra. Además, el polvo de micelas de proteína del suero de leche puede actuar como transportador o vehículo de liberación de agentes activos.

Las micelas de proteína del suero de leche o los polvos de las mismas pueden además estar recubiertos con un emulsionante tal como, por ejemplo, los fosfolípidos u otros agentes de recubrimiento tales como la goma de acacia, a fin de modular la funcionalidad y el sabor de las micelas de proteína del suero de leche. Preferiblemente, el recubrimiento es un emulsionante seleccionado de entre oleato de butilo sulfatado, ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos, ésteres del ácido cítrico de monoglicéridos, lactilatos de estearoilo y mezclas de los mismos. La Fig. 17 es una representación esquemática de dicho recubrimiento con oleato de butilo sulfatado.

Los postres congelados de la presente invención pueden ser cualquiera de los postres congelados seleccionados de entre helados, batidos de leche, sorbetes, mellorine, batidos de fruta, helados de hielo, helados cremosos, etc. Estos pueden estar aireados. Cuando se airean, pueden experimentar un crecimiento del 20% al 200%, preferiblemente del 70% al 150%, dependiendo del postre congelado deseado.

El postre congelado puede contener grasa de leche, uno o más tipos de grasa vegetal o mezclas de las mismas. Alternativamente, puede no contener grasa.

De acuerdo con la realización de la presente invención, se proporciona un postre congelado pasteurizado que tiene más de un 6%, preferiblemente más de un 8%, lo más preferible más de un 10% de contenido de proteínas y un valor de pH esencialmente neutro, preferiblemente entre 6 y 8, en el que el valor calórico de las grasas es menor al 45%. Preferiblemente, el contenido de proteínas está compuesto esencialmente de proteínas del suero de leche. Las proteínas del suero de leche están, al menos parcialmente, presentes en forma de micelas de proteína del suero de leche.

De acuerdo con una realización preferible, el valor calórico de las grasas del postre congelado es inferior al 35%, preferiblemente inferior al 25%, aún más preferible inferior al 15%, lo más preferible inferior al 10%. Preferiblemente, el postre congelado incluye algunas grasas.

El contenido de proteína del suero de leche es preferiblemente superior al 12%, más preferible superior al 14%, aún más preferible superior al 16%, y lo más preferible superior al 18%.

Un helado pasteurizado congelado de la invención tiene al menos un 8% de su peso en proteínas, de un 15% a un 28% en carbohidratos, y de un 3% a un 7% en grasa.

Preferiblemente, el helado tiene un contenido en proteínas superior al 10%, preferiblemente superior al 12%, un contenido en carbohidratos del 10% al 26% y un contenido en grasas del 4% al 6%.

Al menos, una parte del contenido de proteínas en el helado de la presente invención está presente en forma de micelas de proteína del suero de leche.

De acuerdo con esto, la utilización de micelas de proteína del suero de leche en un postre congelado forma parte de la presente invención. Preferiblemente, dichas micelas de proteína del suero de leche constituyen al menos un 50% de contenido total de proteínas del postre congelado.

El perfil nutricional de los postres congelados de la presente invención puede compararse con el de un vaso de leche (cuando se expresa en números absolutos y/o en porcentajes).

5 De este modo, la invención proporciona nuevos postres congelados que son nutritivos y que pueden consumirse como un aperitivo saludable de forma diaria.

Debido a la presencia de las micelas de proteína del suero de leche, el postre congelado de la presente invención tendrá unas buenas cualidades organolépticas, una textura cremosa, a la vez que será nutricionalmente equilibrado. Puede además contener otros agentes beneficiosos para la salud, tales como vitaminas, minerales, probióticos, etc.

10 En la elaboración de los postres congelados de la presente invención, se lleva a cabo un primer paso consistente en mezclar una combinación de ingredientes incluyendo micelas de proteína del suero de leche, concentrados de las mismas o polvo de las mismas. Las micelas de proteína del suero de leche preferiblemente tienen un tamaño medio de entre 100 nm - 900 nm. Si se utiliza polvo de micelas de proteína del suero de leche, el tamaño medio de dicho polvo es preferiblemente mayor a 1 micra.

15 Preferiblemente, el contenido de micelas de proteína del suero de leche en la mezcla, basándose en la materia seca, será de entre el 10-40%, preferiblemente, entre el 15-35%, más preferiblemente del 30%. De este modo, el postre congelado producido puede tener un contenido de proteínas mayor al 6%, y preferiblemente mayor al 8%.

20 Los otros ingredientes de la mezcla pueden ser cualquiera de los ingredientes utilizados en la elaboración de postres congelados, tales como sólidos no grasos lácteos (SNGL), emulsionantes, azúcares, fuentes de grasa, aromas, estabilizadores, inclusiones, etc.

25 Luego se pasteuriza la mezcla a una temperatura de entre 80°C y 87°C durante un periodo de tiempo de al menos 10 s. Preferiblemente, la pasteurización se lleva a cabo a un valor de pH esencialmente neutro, por ejemplo, de entre 6 y 8. La pasteurización también puede llevarse a cabo a un pH moderadamente ácido, por ejemplo, de entre 4 y 6 si se añade fruta nativa (pulpa o zumo) a la mezcla. Opcionalmente, se puede añadir una mezcla ácida a base de fruta tras la pasteurización.

30 La mezcla pasteurizada puede entonces homogenizarse anteriormente a la congelación a una temperatura de 50°C. Tras la homogenización, la mezcla también puede dejarse madurar o "envejecer" hasta durante 24 horas previas a la congelación.

35 El postre congelado basado en micelas de proteína del suero de leche puede entonces asociarse a una capa a base de fruta, en un postre congelado de dos capas, o puede incluir un recubrimiento a base de fruta.

40 De este modo, el postre congelado producido tendrá preferiblemente un contenido de proteínas mayor al 6%, más preferiblemente mayor al 8%.

Mediante el proceso de la invención, se obtendrán postres congelados que tienen un alto contenido en proteínas, excelentes cualidades organolépticas y un perfil nutricional equilibrado.

45 En la presente invención, cualquier descripción de lista de ingredientes pretende describir cualquiera de las posibles combinaciones de dichos ingredientes, en cualquier proporción posible.

Los ejemplos siguientes describen la presente invención sin ser limitantes para ésta.

### 50 Ejemplos

Los ejemplos siguientes describen la preparación de micelas que pueden utilizarse opcionalmente en el contexto de la presente invención.

55 Ejemplo 1: Micelización de la  $\beta$ -lactoglobulina

La  $\beta$ -lactoglobulina (lote JE002-8-922, 13-12-2000) se obtuvo de Davisco (Le Sueur, MN, EEUU). La proteína se purificó a partir de lactosuero dulce mediante ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico. La composición del polvo es de un 89,7% de proteínas, un 8,85% de humedad, un 1,36% de ceniza (0,079% de  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,013% de  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,097% de  $\text{K}^+$ , 0,576% de  $\text{Na}^+$ , 0,050% de  $\text{Cl}^-$ ). El resto de reactivos utilizados eran de calidad analítica (Merck Darmstadt, Alemania).

60 La solución de proteínas se preparó a una concentración del 0,2% mediante disolución de  $\beta$ -lactoglobulina en agua MilliQ® (Millipore), y agitación a 20°C durante 2 h. Entonces se ajustó el pH de las alícuotas a 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0 mediante la adición de HCl. Se llenaron frascos de vidrio de 20 mL (Agilent Technologies) con las soluciones y se sellaron con cápsulas de aluminio que contenían un sellado de silicona/ PTFE. Se calentaron

las soluciones a 85°C durante 15 min. (tiempo en que se alcanza la temperatura, 2,30 - 3,00 min.). Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en agua helada hasta los 20°C.

El aspecto visual de los productos (Figura 1) indica que el pH óptimo de micelización es de 5,8.

Ejemplo 2: Micelización de un aislamiento de proteína del suero de leche

El aislamiento de proteína del suero de leche (WPI, del inglés *whey protein isolate*) (Bipro®, lote JE032-1-420) se obtuvo de Davisco (Le Sueur, MN, EEUU). La composición del polvo se describe en la Tabla 2.

La solución de proteínas se preparó al 3,4% de proteínas mediante disolución del polvo de proteína del suero de leche en agua MilliQ® (Millipore), y agitación a 20° C durante 2 h. El pH inicial fue de 7,2. Entonces se ajustó el pH de las alícuotas a 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4 y 6,6 mediante la adición de HCl 0,1N.

Se llenaron frascos de vidrio de 20 mL (Agilent Technologies) con las soluciones y se sellaron con cápsulas de aluminio que contienen un sellado de silicona/ PTFE. Se calentaron las soluciones a 85°C durante 15 min. (tiempo en que se alcanza la temperatura, 2,30 - 2,50 min.). Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en agua helada hasta los 20°C.

La turbidez de las proteínas del suero de leche calentadas se ha determinado a 500 nm y 25°C, las muestras se diluyeron para permitir la medición en el rango de 0,1 - 3 unidades de absorbancia (Espectrofotómetro Uvikon 810, Kontron Instrument). Los valores se calcularon para una concentración inicial de proteínas del 3,4%.

Se consideró que tras la estabilización de la absorbancia se había alcanzado el pH de micelización (menos de un 5% de variación respecto al valor inicial), medida a 500 nm durante un intervalo de 10 minutos para la misma muestra, tal y como se ilustra en la Figura 2. Para este producto, el pH óptimo de micelización fue de 6,0 a 6,2. Para este pH, ajustado antes del tratamiento térmico, la turbidez estable fue de 21 y las proteínas residuales solubles, evaluadas mediante absorbancia a 280 nm tras la centrifugación, fueron un 1,9%. Podemos concluir que el 45% de las proteínas iniciales se transformaron en micelas a pH 6,0.

Tabla 2: Composición de los WPI y características de la muestra tras la micelización

Proveedor	Davisco
Nombre del producto	Bipro
Número de lote	JE 032-1-420
Composición (mg/ 100 g)	
Sodio	650
Potasio	44
Cloruro*10 si ≤ 40	10
Calcio	82
Fósforo	49
Magnesio	6
pH inicial	7,2
pH de micelización	6,0
Turbidez (500 nm) para un 3,4% de proteína en solución	21
Proteína soluble residual (%) mediante absorbancia a 280 nm	1,9

Ejemplo 3: Observación microscópica de las micelas

Producción de las micelas:

La solución de proteínas se preparó a un 2% de proteínas mediante disolución del polvo de proteína del suero de leche (WPI 90 lote 989/2, Lactalis, Retier, Francia) en agua MilliQ® (Millipore), y agitación a 20°C durante 2h. Entonces se ajustaron los pH de las alícuotas utilizando HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N.

Se llenaron frascos de vidrio de 20 mL (Agilent Technologies) con las soluciones y se sellaron con cápsulas de aluminio que contenían un sellado de silicona/ PTFE. Se calentaron las soluciones a 85°C durante 15 min. (tiempo en que se alcanza la temperatura, 2,30 - 2,50 min.). Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en agua helada hasta los 20°C. Para este producto, el pH óptimo de micelización fue de 7,4.

5

Observaciones microscópicas:

Se encapsularon las muestras líquidas de micelas en tubos con gel de agar. La fijación se logró mediante la inmersión en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M a un pH de 7,4, y la post-fijación se llevó a cabo mediante tetraóxido de osmio al 2% en el mismo tampón, ambas soluciones conteniendo rojo de Rutenio al 0,04%. Tras la deshidratación en una serie creciente de etanol (etanol 70, 80, 90, 96, 100%), se incluyeron las muestras en resina Spurr (Spurr/ etanol 1:1, 2:1, 100%). Tras la polimerización de la resina (70°C, 48 horas), se cortaron secciones ultrafinas y semifinas con un ultramicrotomo Leica ultracut UCT. Las secciones ultrafinas, teñidas con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo, se examinaron entonces mediante microscopia electrónica de transmisión (Philips CM12, 80 kV).

10

15

La micrografía de MET se presenta en la Figura 3. Las micelas obtenidas presentan una forma esférica con un diámetro de 200 nm.

20

Distribución del tamaño de las partículas

Se midieron las distribuciones del tamaño de las micelas basadas en la intensidad de aquellas micelas obtenidas mediante el tratamiento térmico de una dispersión de  $\beta$ -lactoglobulina al 1% en peso durante 15min. a 85°C y pH 4,25 (cargadas positivamente con un potencial zeta de unos +25 mV), y a pH 6,0 (cargadas negativamente con un potencial zeta de unos -30 mV). El diámetro hidrodinámico Z-promediado de las micelas fue de 229,3 nm a pH 4,25 y de 227,2 nm a pH 6,0. Los agregados de la  $\beta$ -LG y la proteína del suero de leche se siguieron mediante el uso de dispersión dinámica de la luz. Se utilizó un aparato Nanosizer ZS (Malvern Instruments, GB) equipado con un láser que emite a 633 nm y que tiene una energía de 4,0 mW. El instrumento se utilizó en la configuración de retrodispersión, donde la detección se realiza a un ángulo de dispersión de 173°. Esto permite una reducción considerable de las múltiples señales de dispersión que se encuentran en las muestras turbias. Las muestras se colocaron en una celda de cuarzo cuadrada (Hellma, paso de luz 1cm). La longitud del paso del haz de luz se ajusta automáticamente en el aparato, dependiendo de la turbidez de la muestra (atenuación). La función de autocorrelación se calculó a partir de la fluctuación de la intensidad dispersada. Los resultados se presentan en la Figura 6. Ésta muestra que la partícula promedio se caracteriza por un índice de polidispersión muy estrecho ( $< 0,200$ ). En consecuencia, la suspensión blanca que se obtiene mediante la presente invención es estable y tiene una apariencia láctea en el rango de pH 3-8.

25

30

35

Ejemplo 4: Micelización de la  $\beta$ -lactoglobulina a pH constante (no forma parte de la invención)

40

El método descrito en el ejemplo 1 se repitió con la salvedad de la utilización de una solución acuosa de  $\beta$ -lactoglobulina al 2%. El pH de esta solución se ajustó a 7,0 tras la adición de soluciones de Arginina HCl para obtener una concentración final de sales que iban de 5 a 200 mM y una concentración final de  $\beta$ -lactoglobulina del 1%. Se llevó a cabo un posterior tratamiento térmico (80°C, 10 min., unos 2 min. calentándose) para producir micelas.

45

Los resultados se muestran en la Fig. 4 e indican claramente que, tan sólo en el rango de fuerza iónica entre alrededor de 50 y 70 mM, se puede observar una turbidez sustancial, indicando la presencia de micelas de proteína del suero de leche.

50

Ejemplo 5: Preparación de un agente blanqueador (ilustrativo)

Las proteínas del suero de leche nativas (WPI 95 lote 848, Lactalis; solución acuosa al 8% en peso) se trataron de acuerdo con el ejemplo 2. La claridad (L) del producto resultante se midió en modo de trans-reflectancia utilizando un aparato MacBeth CE-XTH D65 10° SCE equipado con una celda de medición de 2 mm. La claridad resultante fue de  $L = 74,8$ , que podría compararse con el valor de  $L = 74,5$  de la leche entera.

55

Ejemplo 6: Preparación de una espuma acuosa (no forma parte de la invención)

La  $\beta$ -lactoglobulina nativa (Biopure, Davisco, lote JE 002-8-922, solución acuosa al 2% en peso) se mezcló con una solución de Arginina HCl de 120 mM a fin de que la concentración final de  $\beta$ -lactoglobulina fuese del 1% en peso y la de Arginina HCl de 60 mM. Entonces, se ajustó el pH a 7,0 mediante la adición de HCl 1 N. Se aplicó, entonces, un tratamiento térmico sobre la mezcla a 80°C durante 10 minutos a fin de que el 90% de la  $\beta$ -lactoglobulina inicial se convirtiera en micelas con un diámetro z-promediado de 130 nm. En este caso, el diámetro de las micelas se determinó utilizando un aparato Nanosizer ZS (Malvern Instruments, GB). La muestra se vertió en una cubeta de cuarzo y se registraron automáticamente las variaciones de la luz dispersada. La función de autocorrelación obtenida se ajustó utilizando el método de cumulantes a fin de que el coeficiente de difusión de las partículas pudiera calcularse y, a partir de esto, también el diámetro hidrodinámico z-promediado utilizando la ley de Stokes-Einstein. Para esta medi-

60

65

ción, se tomó un índice refractivo del disolvente de 1,33 y de las micelas de 1,45. Un volumen de 50 mL de la dispersión resultante de micelas de  $\beta$ -lactoglobulina se convirtió en espuma mediante el burbujeo de nitrógeno a través de una frita de vidrio, generando burbujas de 12-16  $\mu\text{m}$  para producir así un volumen de espuma de 180  $\text{cm}^3$ , utilizando el aparato Foamscan™ (ITConcept) estandarizado. La estabilidad de volumen de la espuma se siguió a lo largo del tiempo a 26°C utilizando el análisis de imagen y se comparó con la estabilidad de la espuma obtenida con la  $\beta$ -lactoglobulina tratada en las mismas condiciones, pero sin Arginina HCl, donde no se formaron micelas. La Fig. 5 muestra que la estabilidad de volumen de la espuma mejora en gran medida mediante la presencia de micelas de  $\beta$ -lactoglobulina.

10 Ejemplo 7: Producto lácteo fermentado a base de suero de leche – ensayos de fermentación (ilustrativo)

Material

15 Aislamiento de proteína del suero de leche (WPI) (Bipro®), obtenido de Davisco (Le Sueur, MN, EEUU) (concentración de proteínas del 92,7%).  
 Permeado de suero de leche secado por pulverización (Variolac 836): concentración de lactosa: 83% - Minerales: 8%  
 Ácido láctico al 50%  
 20 Lactosa comestible (Lactalis)  
 Agua desionizada

Método

25 El polvo Bipro® se disolvió en agua desionizada con tal de obtener una concentración de proteínas del 4,6%, es decir, por cada 3 litros de solución, 154,5 g de polvo de WPI y 2845,5 g de agua. El tiempo de hidratación fue de 3 horas. Tras la hidratación, esta solución se dividió en muestras de 200 mL para preparar diferentes ensayos:

**Tabla 3**

Ensayo	Permeado de suero de leche (%)	Lactosa (%)	Ajuste de pH	Calentamiento 85°C/ 15 min.
1	2,9	2,5	6,5	+
2	0	5	6	+
3	0	5	6,7	-
4	0	5	6,7	+
5	0	5	6,1	+
6	0	0	6	+
7	0	5 (añadida tras el ajuste de Ph)	6	-
8	0	5 (añadida tras el ajuste de Ph)	6	+

30 A cada solución se añadió ácido láctico al 50% para ajustar el pH antes del calentamiento.

Las muestras se calentaron al baño maría hasta los 85°C y se mantuvieron a esta temperatura durante 15 minutos. Tras el calentamiento, se enfriaron las soluciones a 40°C y se inocularon con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Se mantuvieron las muestras durante 5 h 30 min. en una cámara de vapor a 41°C antes de colocarse en una cámara fría a 6°C.

Los resultados se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Ensayo	Permeado de suero de leche	Lactosa	pH	Calentamiento	pH tras 5h30	Aspecto
1	+	+	6,5	+	4,68	Muy consistente
2	-	+	6	+	4,7	Consistente
3	-	+	6,7	-	5,78	Líquido
4	-	+	6,7	+	4,81	Muy consistente
5	-	+	6,1	+	4,59	Muy consistente
6	-	-	6	+	4,99	Muy consistente
7	-	- añadida tras el ajuste de pH	6	-	4,87	Líquido con manchas blancas
8	-	- añadida tras el ajuste de pH	6	+	4,77	Consistente

40 Ejemplo 8: Helado bajo en grasas enriquecido con proteína del suero de leche

## Material

- Aislamiento de proteína del suero de leche (WPI, Prolacta90® de Lactalis, Rétiers, Francia) con un contenido en proteínas del 90%
- 5 Polvo de leche descremada con un contenido en proteínas del 35%
- Sacarosa
- Maltodextrinas DE39
- Grasa deshidratada de leche
- Emulsionante
- 10 Agua desionizada
- Ácido clorhídrico comestible 1M

Método que utiliza la generación en línea de micelas de proteína del suero de leche

- 15 Utilizando un reactor de doble encamisado de 80 L, el polvo Prolacta90® se dispersó en agua desionizada a 50°C a una concentración de proteínas del 11,6% en peso, bajo agitación suave con tal de evitar la formación de espuma. Después de 1 hora de dispersión, el pH de la dispersión se ajustó al pH de micelización mediante la adición de HCl. La temperatura de la dispersión se aumento hasta los 85°C y se mantuvo así durante 15 minutos a fin de generar micelas de proteína del suero de leche. Tras 15 minutos, la temperatura se disminuyó hasta los 50°C y se añadieron
- 20 secuencialmente los ingredientes adicionales a la dispersión de micelas (es decir, el polvo de leche descremada, las maltodextrinas DE39, la sacarosa, el emulsionante y la grasa deshidratada de leche). La cantidad final de la mezcla fue de 50 kg con un contenido de sólidos final del 39,4% y un contenido en grasa del 5% en peso. Tras 30 minutos de hidratación, se homogenizó la mezcla en dos pasos (80/ 20 bares) y se pasteurizó (86°C/ 30 s) con anterioridad al reposo durante la noche.
- 25 Al día siguiente, la mezcla de helado se congeló con un crecimiento del 100% utilizando un aparato Hoyer MF50, y se endureció a -40°C antes de su almacenamiento a -20°C. El helado final contenía un 10% en peso de proteínas (17% de caseínas, 83% de proteínas del suero de leche) y un 5% en peso de grasa en base a la mezcla del helado. La contribución calórica de este helado proviene en un 51,4% de los azúcares, en un 27,9% de las grasas y en un
- 30 20,7% de las proteínas.

Método que utiliza polvo de micelas de proteína del suero de leche

- 35 Utilizando un reactor de doble encamisado de 80 L, el polvo de micelas de proteína del suero de leche se dispersó en agua desionizada a 50°C bajo agitación suave con tal de evitar la formación de espuma. Después de 15 minutos de dispersión se añadieron secuencialmente los ingredientes adicionales a la dispersión de micelas de proteína del suero de leche (es decir, el polvo de leche descremada, las maltodextrinas DE39, la sacarosa, el emulsionante/ estabilizador y la grasa deshidratada de leche). La cantidad final de la mezcla fue de 50 kg con un contenido de sólidos del 37,5% y un contenido en grasa del 5% en peso. Tras 30 minutos de hidratación, se homogenizó la mezcla en
- 40 dos pasos (80/ 20 bares) y se pasteurizó (86°C/ 30 s) con anterioridad al reposo durante la noche. Al día siguiente, la mezcla de helado se congeló con un crecimiento del 100% utilizando un aparato Hoyer MF50, y se endureció a -40°C antes de su almacenamiento a -20°C. El helado final contenía un 12,8% en peso de proteínas (13% de caseínas, 87% de proteínas del suero de leche) y un 5% en peso de grasa en base a la mezcla del helado. La contribución calórica de este helado proviene en un 44,9% de los azúcares, en un 29,4% de las grasas y en un
- 45 25,7% de las proteínas.

Ejemplo 9: Micelas de proteína del suero de leche pulverizadas obtenidas mediante secado por pulverización

## Material

- 50 Aislamiento de proteína del suero de leche (WPI, Prolacta90® de Lactalis, Retiers, Francia) con un contenido de proteínas del 90%
- Lactosa comestible
- Maltodextrinas DE39
- 55 Agua desionizada
- Ácido clorhídrico comestible 1M

## Método

- 60 Utilizando un reactor de doble encamisado de 100 L, el polvo de Prolacta90® se dispersó en agua desionizada a 50°C a una concentración de proteínas del 10% en peso, bajo agitación moderada con tal de evitar la formación de espuma, es decir, se dispersaron 11 kg de Prolacta90® de agua desionizada. Después de 1 hora de dispersión, el pH de la dispersión se ajustó al pH de la micelización (alrededor de 6,3 en este caso) mediante la adición de HCl. La temperatura de la dispersión se aumento hasta los 85°C y se mantuvo así durante 15 minutos a fin de generar micelas de proteína del suero de leche. Tras 15 minutos, la temperatura se disminuyó hasta los 50°C y se dividió la dispersión de micelas de proteína del suero de leche al 10% en peso en dos grupos de 50 kg. En un primer ensayo, se
- 65

dispersaron 20 kg de lactosa en 50 kg de dispersión de micelas a 50°C y se agitaron durante 30 min. De forma análoga, se añadieron 20 kg de maltodextrinas DE39 a los 50 kg de dispersión las micelas de proteína del suero de leche restantes.

5 Entonces, las dos mezclas se secaron por pulverización en una torre NIRO SD6.3N, a una tasa de flujo de 15 L/ h. La temperatura del aire de entrada fue de 140°C y la temperatura del aire de salida fue de 80°C. El contenido de agua del polvo obtenido fue menor al 5%.

10 El tamaño de las micelas de proteína del suero de leche se determinó en agua, en presencia de lactosa y maltodextrina (DE39), utilizando la dispersión dinámica de la luz antes y después de la secado por pulverización. La concentración total de proteínas se ajustó a 0,4% en peso, mediante dilución de la dispersión, antes del secado por pulverización o de la reconstitución del polvo a fin de estar en el rango de dilución de la viscosidad para la formación de las micelas de proteína del suero de leche. Se utilizó un aparato Nanosizer ZS (Malvern Instruments) y el diámetro de las micelas se promedió a partir de 20 mediciones.

15 El diámetro de partícula determinado para las micelas de proteína del suero de leche, en presencia de lactosa y maltodextrinas (DE39) fue de 310,4 nm y 306,6 nm, respectivamente. Tras la reconstitución de los polvos, se encontró que los diámetros respectivos eran de 265,3 nm y 268,5 nm, respectivamente. Estas mediciones confirmaron que las micelas de proteína del suero de leche eran físicamente estables a pesar del secado por pulverización. Los resultados se corroboraron mediante observaciones de microscopía con el MET de las dispersiones en agua de micelas de proteína del suero de leche al 0,1% en peso, utilizando tinción negativa en presencia de ácido fosfotúngstico al 1% y a pH 7. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Philips CM12 operando a 80 kV. Las micelas de proteína del suero de leche se observaron en solución antes del secado por pulverización y después de la reconstitución del polvo secado por pulverización. No se pudo detectar diferencia alguna en cuanto a la morfología y la estructura.

25 Ejemplo 10: Concentración mediante evaporación

30 Un aislamiento de proteína del suero de leche Prolacta 90 de Lactalis (lote 500648) fue reconstituido a 15°C en agua blanda, a una concentración de proteínas del 4%, para alcanzar un tamaño de lote final de 2500 kg. El pH se ajustó mediante la adición de ácido clorhídrico 1M a fin que el valor de pH final fuera de 5,90. La dispersión de proteína del suero de leche se bombeó a través de un intercambiador de calor de placas de APV a una tasa de flujo de 500 L/ h. Al precalentamiento a 60°C le siguió un tratamiento térmico a 85°C durante 15 minutos. La formación de las micelas de proteína del suero de leche se comprobó mediante la medición del tamaño de las partículas, utilizando tanto la dispersión dinámica de la luz como mediciones de turbidez a 500 nm. La dispersión de las micelas de proteína del suero de leche al 4% obtenida se caracterizó por un radio hidrodinámico de las partículas de 250 nm, un índice de polidispersión de 0,13 y una turbidez de 80. Entonces, la dispersión de proteína del suero de leche se introdujo en un evaporador Scheffers a una tasa de flujo de 500 L/ h. La temperatura y el vacío en el evaporador se ajustaron para producir alrededor de 500 kg de concentrado de micelas de proteína del suero de leche con una concentración de proteínas del 20%, y se enfriaron hasta los 4°C.

40 Ejemplo 11: Enriquecimiento mediante microfiltración

45 Un aislamiento de proteína del suero de leche Prolacta 90 de Lactalis (lote 500648) se reconstituyó a 15°C en agua blanda a una concentración de proteínas del 4%, para alcanzar un tamaño de lote final de 2500 kg. El pH se ajustó mediante la adición de ácido clorhídrico 1 M a fin que el valor de pH final fuera de 5,90. La dispersión de proteína del suero de leche se bombeó a través de un intercambiador de calor de placas de APV a una tasa de flujo de 500 L/ h. Al precalentamiento a 60°C le siguió un tratamiento térmico a 85°C durante 15 minutos. La formación de las micelas de proteína del suero de leche se comprobó mediante la medición del tamaño de las partículas, utilizando tanto la dispersión dinámica de la luz como mediciones de turbidez a 500 nm. La dispersión de las micelas de proteína del suero de leche al 4% obtenida se caracterizaba por un radio hidrodinámico de las partículas de 260 nm, un índice de polidispersión de 0,07 y una turbidez de 80. La forma de las micelas de las proteínas también se comprobó mediante MET, siendo claramente visibles las estructuras de las micelas, con un diámetro medio de 150-200 nm (Fig. 9). La dispersión de proteína del suero de leche se enfrió hasta 4°C y se introdujo en una unidad de filtración, equipada con una membrana Carbosep M14 de 6,8 m<sup>2</sup>, a una tasa de flujo de 180 L/ h. En este caso, la concentración de las micelas de proteína del suero de leche se realizó a 10°C hasta que la tasa de flujo del permeado alcanzó los 70 L/ h. En este caso, el concentrado final de proteína del suero de leche contenía un 20% de proteínas. La estructura de las micelas en el concentrado se comprobó mediante MET, y no se observó ningún cambio significativo en comparación con la dispersión de proteína del suero de leche al 4% antes de la microfiltración (Fig. 10).

60 Ejemplo 12: Polvo de micelas de proteína del suero de leche que contiene al menos un 90% de proteína del suero de leche.

65 Se inyectaron 200 kg de un concentrado de micelas de proteína del suero de leche, obtenido mediante microfiltración hasta un 20% de proteínas (ver ejemplo anterior) en una torre Niro SD6.3N utilizando un inyector de secado por pulverización ( $\phi = 0,5$  mm, ángulo de secado por pulverización = 65°, presión = 40 bares) a una tasa de flujo del producto de 25 kg/ h. La temperatura de entrada del producto fue de 150°C y la temperatura de salida fue de 75°C.

El flujo de aire en la torre fue de  $150 \text{ m}^3/\text{h}$ . El contenido de humedad en el polvo fue menor al 4% y el polvo se caracterizó por una fluidez muy elevada. La microscopía electrónica de barrido mostró unas partículas muy esféricas que tenían un diámetro aparente que iba de 10 a  $100 \mu\text{m}$  (Fig. 8).

#### 5 Ejemplo 13: Polvo de micelas de proteína del suero de leche mezclado

Se mezclaron 20 kg de un concentrado de micelas de proteína del suero de leche con 1,7 kg de maltodextrinas con un valor de ED de 39 a fin que la proporción final en el polvo entre las micelas de proteína del suero de leche y la maltodextrina fuera de 70/ 30. Esta mezcla se inyectó en una torre Niro SD6.3N utilizando un inyector de secado por pulverización ( $\phi = 0,5 \text{ mm}$ , ángulo de secado por pulverización =  $65^\circ$ , presión = 40 bars) a una tasa de flujo del producto de  $25 \text{ kg}/\text{h}$ . La temperatura de entrada del producto fue de  $150^\circ\text{C}$  y la temperatura de salida fue de  $75^\circ\text{C}$ . El flujo de aire en la torre fue de  $150 \text{ m}^3/\text{h}$ . El contenido de humedad en el polvo fue menor al 4% y el polvo se caracterizó por una fluidez muy elevada.

15 Cuando se reconstituyen en agua, los polvos de los ejemplos 13 y 14 contienen esencialmente micelas que tienen la misma estructura y morfología que el concentrado de micelas de proteínas del suero de leche.

Ejemplo 14: Polvo de micelas de proteína del suero de leche obtenido mediante liofilización

#### 20 Material

Concentrado de micelas de proteína del suero de leche con un 20% de proteínas, producido mediante microfiltración en el ejemplo 12 con un contenido en proteínas del 90%

#### 25 Método

Se introdujeron 100 g del concentrado de micelas de proteínas del suero de leche en un vaso de precipitados de plástico y se congelaron a  $-25^\circ\text{C}$  durante una semana. Este vaso de precipitados se colocó después en un liofilizador de escala de laboratorio Virtis equipado con una bomba de vacío. La muestra se dejó durante 7 días hasta que la presión en el liofilizador se mantuvo constante a unos 30 mbares. Se recuperaron unos 20 g de micelas de proteína del suero de leche liofilizadas.

Ejemplo 15: Dispersión acuosa de las micelas de proteína del suero de leche recubiertas con oleato de butilo sulfatado (SBO) o cualquier otro emulsionante cargado negativamente

#### 35 Material

Polvo de micelas de proteína del suero de leche (WPM) del Ejemplo 13 con un contenido en proteínas del 90% SBO

40 Ácido clorhídrico (1M)

#### Método

45 El polvo de WPM descrito en el ejemplo 13 se dispersó en agua MilliQ para lograr una concentración final de proteínas del 0,1% en peso. La dispersión se filtró en filtros de  $0,45 \mu\text{m}$  a fin de eliminar posibles agregados de WPM. El pH de esta dispersión de WPM se descendió hasta 3,0 mediante la adición de ácido clorhídrico a 1 M. Se preparó una dispersión de SBO al 1% en peso a un pH de 3,0.

50 El radio hidrodinámico y el potencial zeta de estas WPM se determinó utilizando un aparato Nanosizer ZS (Malvern Instruments Ltd.). El diámetro fue de 250 nm y la movilidad electroforética de  $+2,5 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . El radio hidrodinámico y la movilidad electroforética de la dispersión de SBO a un pH de 3,0 fueron de 4 nm y  $-1,5/-2,0 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente.

55 Tras la realización de esta caracterización preliminar, la dispersión de SBO se utilizó para la titulación de la de WPM, mientras se seguía la evolución del radio hidrodinámico y la movilidad electroforética de la mezcla. Se encontró que el radio hidrodinámico era constante alrededor de 250-300 nm hasta que se alcanzaba una proporción en peso de la mezcla entre WPM/SBO de 5:1. En este punto, el radio hidrodinámico diverge dramáticamente hasta 20.000 nm y se encuentra precipitación de complejos de WPM SBO. Tras seguir con la adición de SBO, por encima de la proporción de mezcla 5:1, el radio hidrodinámico disminuyó progresivamente hasta los 250 nm, tal y como se encontró inicialmente con las WPM, nivelándose a partir de una proporción de 4:1 en adelante. El seguimiento de la movilidad electroforética de la mezcla mostró que ésta disminuye con la adición de SBO, alcanzando el valor cero con una proporción de mezcla de 5:1. Entonces, ésta siguió disminuyendo con la adición de SBO, iniciándose el nivelado a  $-3,0 \mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  desde la proporción 4:1 en adelante.

65 La explicación a estos resultados es que las WPM cargadas positivamente, en un primer paso, quedan revestidas electrostáticamente con la cabeza negativa del SBO hasta que se logra la neutralización total de la carga (proporción

5 de mezcla de 5:1). En este punto, las colas hidrófobas del SBO son capaces de autoasociarse, induciendo la sobre-agregación con un diámetro hidrodinámico muy grande y la precipitación de los complejos. Con una mayor adición de SBO, las colas hidrófobas dan lugar a una mayor asociación formando un doble recubrimiento, exponiendo sus cabezas negativas hacia el disolvente. Esto da lugar a WPM negativamente cargadas con un doble recubrimiento de SBO (ver Figura 17) comparables con un liposoma con un núcleo formado completamente por proteínas.

10 Se han obtenido resultados similares con otros emulsionantes ácidos de uso alimentario, tales como DATEM, CITREM, SSL (de Danisco), en solución acuosa a pH 4,2, donde se mantienen principalmente ionizados en su forma aniónica (funciones químicas de  $-\text{COO}^-$ ).

15 Ejemplo 16: Determinación del ángulo de reposo para polvo secado por pulverización de micelas de proteínas del suero de leche, polvo de micelas de proteína del suero de leche mezcladas, polvo de aislamiento de proteína del suero de leche y polvo de leche descremada a baja temperatura

15 **Material**

Polvo de micelas de proteína del suero de leche del ejemplo 12 con un contenido en proteínas del 90% (humedad del 3,5%)

20 Polvo de micelas de proteína del suero de leche mezcladas del ejemplo 13 con un contenido en proteínas del 90% (humedad del 3,5%)

Polvo de aislamiento de proteína del suero de leche Prolacta 90 (lote 500658 de Lactalis, Francia; humedad del 4%)

Polvo de leche descremada a baja temperatura (lote 334314 de Emmi, Suiza; humedad del 3,5%)

Aparato de medición descrito para medir el ángulo de reposo del polvo de acuerdo con la normativa ISO 4324

25 **Método**

El polvo se coloca en embudo con un diámetro de tallo de 99 mm y se fuerza el polvo a que fluya utilizando un agitador. El polvo cae en una vasija transparente de plástico con un diámetro de 100 mm y una altura de 25 mm. El ángulo de reposo,  $\Phi$ , se mide mediante la siguiente ecuación:

30  $\text{Ángulo de reposo } \Phi = \text{ARCTAN}(2h/100)$

Siendo "h" la altura máxima del cono de polvo que se puede obtener, estando toda la superficie de la vasija de plástico cubierta de polvo.

35 Resultados del test del ángulo de reposo (los valores son la media de 3 mediciones y se indica la desviación estándar).

	Polvo de micelas de proteína del suero de leche	Polvo de micelas de proteína del suero de leche mezcladas	Aislamiento de proteína del suero de leche	Polvo de leche descremada a baja temperatura
Ángulo de reposo (°)	24,6 ± 1,1	27,3 ± 0,7	34,3 ± 0,5	43,8 ± 2,8

40 Los resultados del ángulo de reposo muestran claramente que el polvo de micelas de proteína del suero de leche, puro o mezclado con maltodextrinas, exhibe un ángulo significativamente menor al del polvo inicial de proteína del suero de leche o incluso al del polvo de leche descremada. Un ángulo de reposo menor a 35° es característico de polvos con una fluidez muy buena.

45

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un postre congelado pasteurizado, que contiene micelas de proteína del suero de leche, en el que las micelas de proteína del suero de leche se obtienen mediante el ajuste del pH de una solución desmineralizada de proteína del suero de leche nativa, que tiene un contenido en proteínas que va del 0,1% en peso al 12% en peso en base al peso total de la solución, a un valor entre 5,8 y 6,6, y el calentamiento de la solución a una temperatura de entre 82 a 89°C durante entre 10 segundos y 2 horas, en el que las micelas de proteína del suero de leche constituyen al menos el 50% del contenido total de proteínas y en el que el postre congelado tiene un contenido de proteínas mayor al 6%.
- 10 2. El postre congelado de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un contenido de proteínas mayor al 8% del peso.
- 15 3. El postre congelado de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que tiene un contenido de proteínas superior al 10% del peso, preferiblemente superior al 12%, más preferible superior al 14%, y aún más preferible superior al 16%.
- 20 4. El postre congelado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos de entre un 15% a un 30% de la energía está proporcionada por las proteínas, entre un 0% y un 45% de la energía está proporcionada por grasa, y entre un 25% y un 85% de la energía está proporcionada por carbohidratos.
- 25 5. El postre congelado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las micelas de proteína del suero de leche se proporcionan en forma de suspensión, concentrado o polvo.
- 30 6. El postre congelado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las micelas de proteína del suero de leche tienen un tamaño medio de entre 100 nm y 900 nm.
- 35 7. El postre congelado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polvo de micelas de proteína del suero de leche tiene un tamaño medio de más de 1 µm.
- 40 8. El postre congelado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el polvo de micelas de proteína del suero de leche es un transportador de un agente activo.
- 45 9. El postre congelado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las micelas de proteína del suero de leche o los polvos de las mismas están adicionalmente recubiertas con un emulsionante.
- 50 10. El postre congelado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el postre congelado es un helado, batido de leche, sorbete, mellorine, batido de fruta, helado de hielo o helado cremoso.
- 55 11. El postre congelado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el postre congelado está aireado.
- 60 12. El postre congelado de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el postre congelado tiene un crecimiento de entre el 20% y el 200%, preferiblemente entre el 70% y el 150%.
- 65 13. El postre congelado de acuerdo con la reivindicación 10, que contiene grasa de leche.
14. El postre congelado de acuerdo con la reivindicación 10, que contiene una o más grasas vegetales.
15. El postre congelado de acuerdo con la reivindicación 10, que no contiene grasa.
16. La utilización de micelas de proteína del suero de leche en el postre congelado, en el que las micelas de proteína del suero de leche se obtienen mediante el ajuste del pH de una solución desmineralizada de proteína nativa del suero de leche, que tiene un contenido en proteínas de entre un 0,1% en peso y un 12% en peso en base al peso total de la solución, a un valor entre 5,8 y 6,6, y el calentamiento de la solución a una temperatura de entre 82 y 89°C durante entre 10 segundos y 2 horas, en el que las micelas de proteína del suero de leche constituyen al menos el 50% del contenido total de proteínas del postre congelado.
17. Un proceso para la elaboración de un postre congelado que incluye al menos los pasos de:
  - a. Mezclar una combinación de ingredientes, lo que incluye las micelas de proteína del suero de leche obtenidas mediante el ajuste del pH de una solución desmineralizada de proteína nativa del suero de leche, que tiene un contenido en proteínas de entre un 0,1% en peso y un 12% en peso en base al peso total de la solución, a un valor entre 5,8 y 6,6, y el calentamiento de la solución a una temperatura de entre 82 y 89°C durante entre 10 segundos y 2 horas, un concentrado de las mismas o un polvo de las mismas en el que la mezcla obtenida en el paso a contiene de un 10-40%, preferiblemente de

un 15-35%, lo más preferiblemente un 30% de micelas de proteína del suero de leche en base a la materia seca.

- 5
- b. pasteurizar la mezcla
  - c. Opcionalmente, homogenizar de la mezcla, y
  - d. Congelar la mezcla
- 10
18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la pasteurización se lleva a cabo a un valor de pH esencialmente neutro.
- 15
19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la pasteurización se lleva a cabo a un pH moderadamente ácido de entre 4 y 6.
- 20
20. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de 17 a 19, en el que el postre congelado tiene un contenido de proteínas superior al 6%, preferiblemente superior al 8%.
- 20
21. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de 17 a 20, en el que se lleva a cabo un paso adicional de maduración tras el paso c.
- 25
22. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de 17 a 21, en el que las micelas de proteína tiene un diámetro medio de entre 100-900 nm.
- 25
23. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de 17 a 22, en el que el polvo de micelas de proteína del suero de leche tiene un diámetro medio mayor a 1 micra.

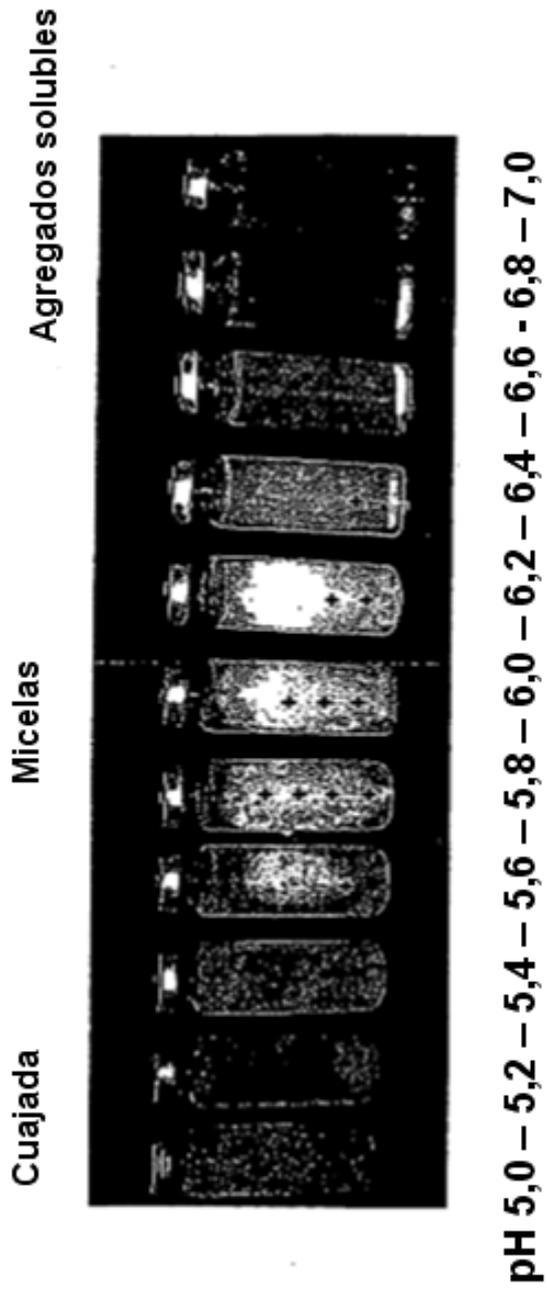


Figura 1

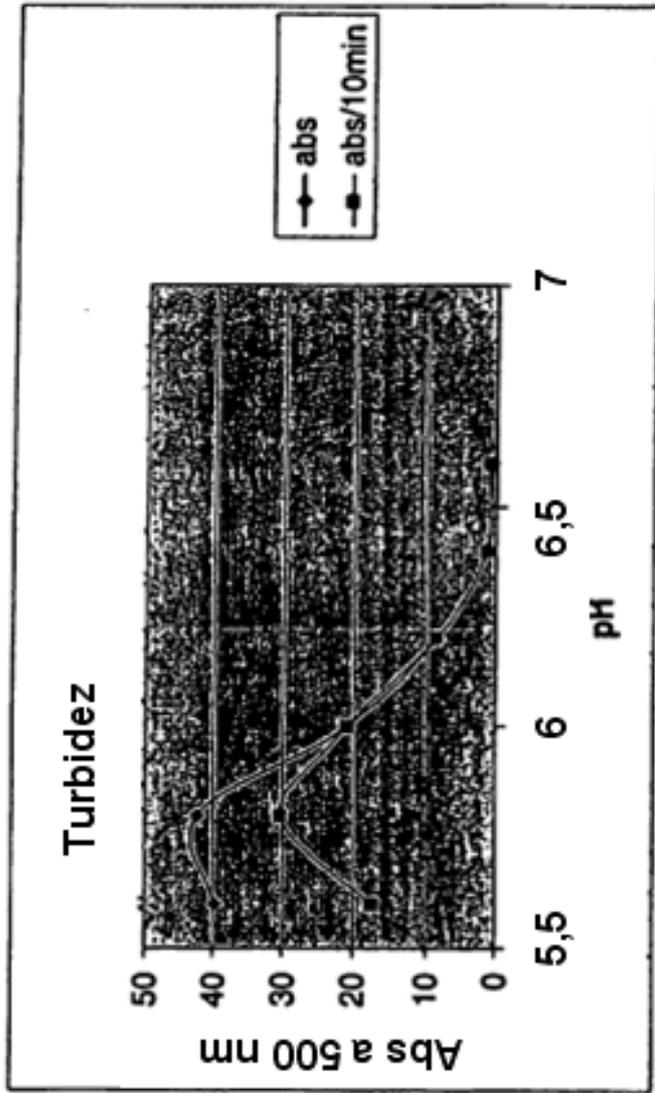
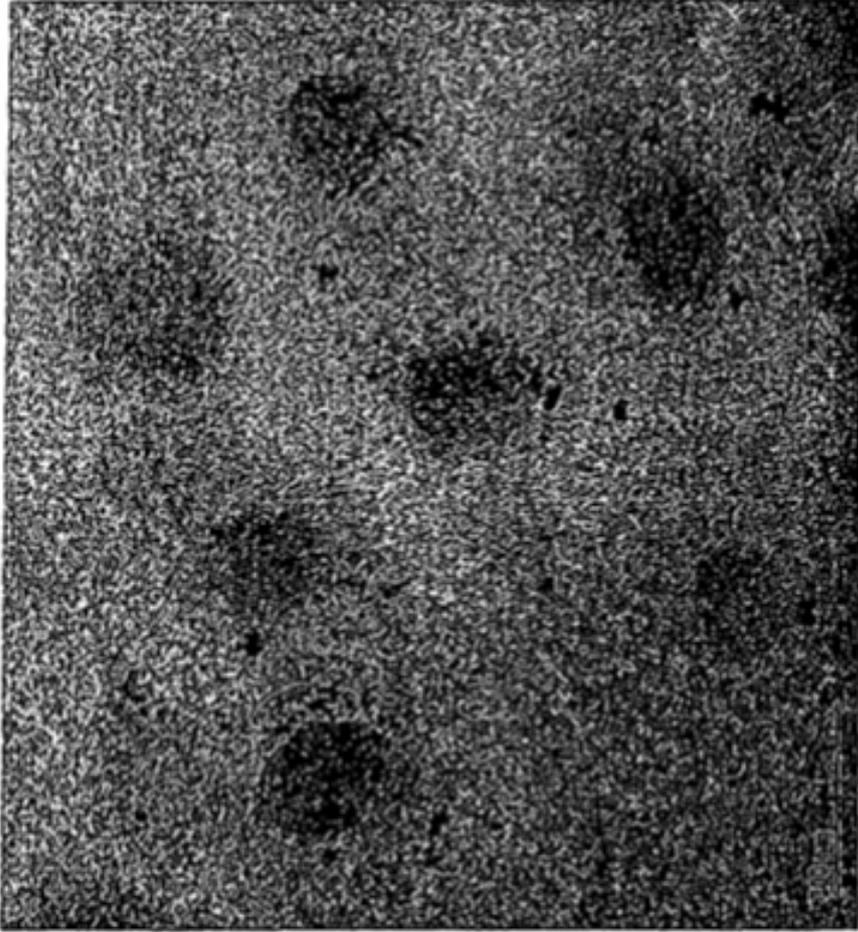
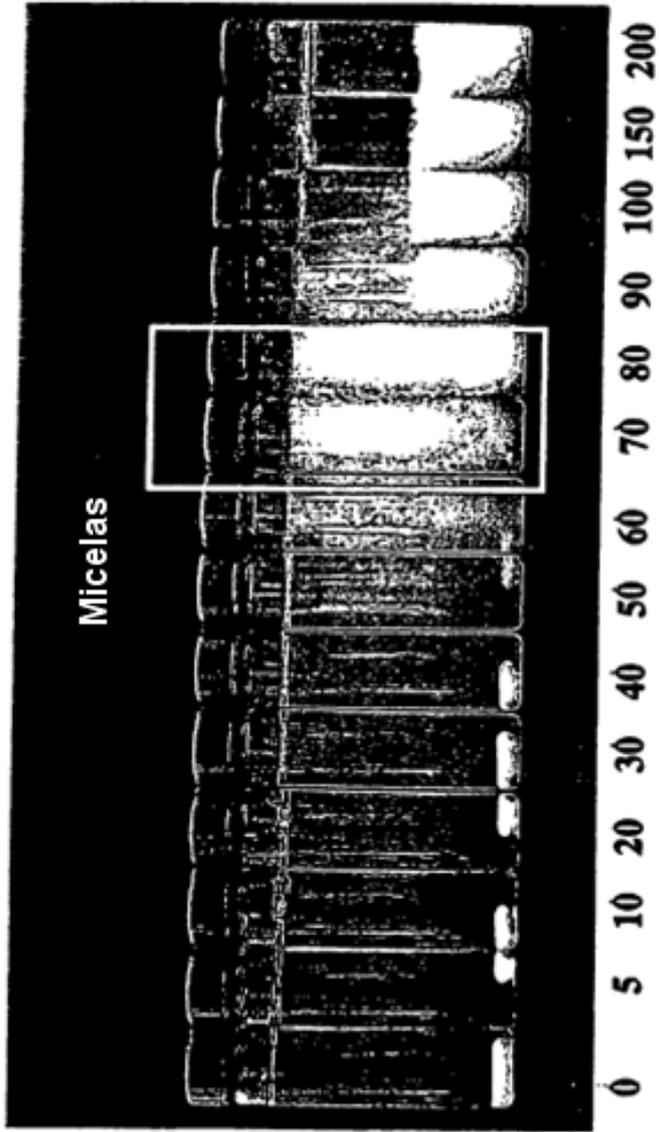


Figura 2



**Figura 3**



Mm Arginina HCl

Figura 4

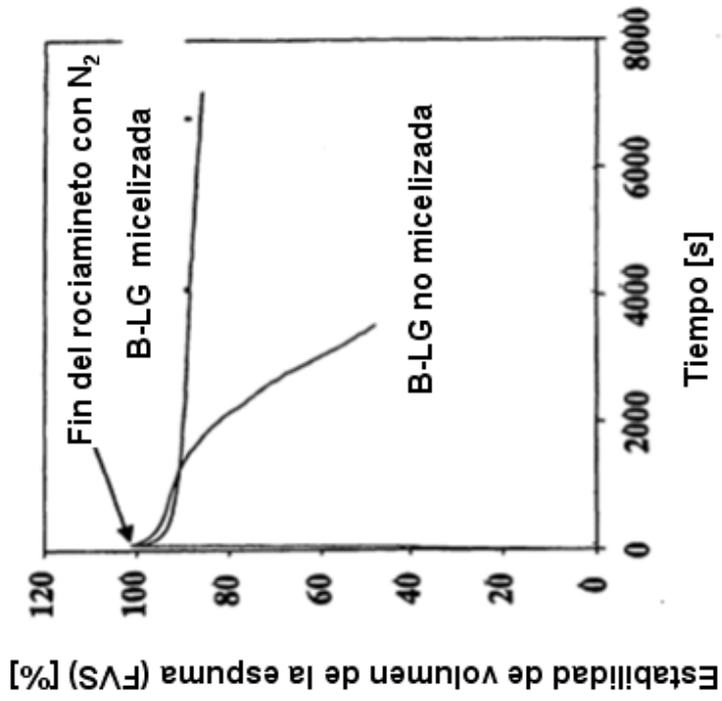


Figura 5

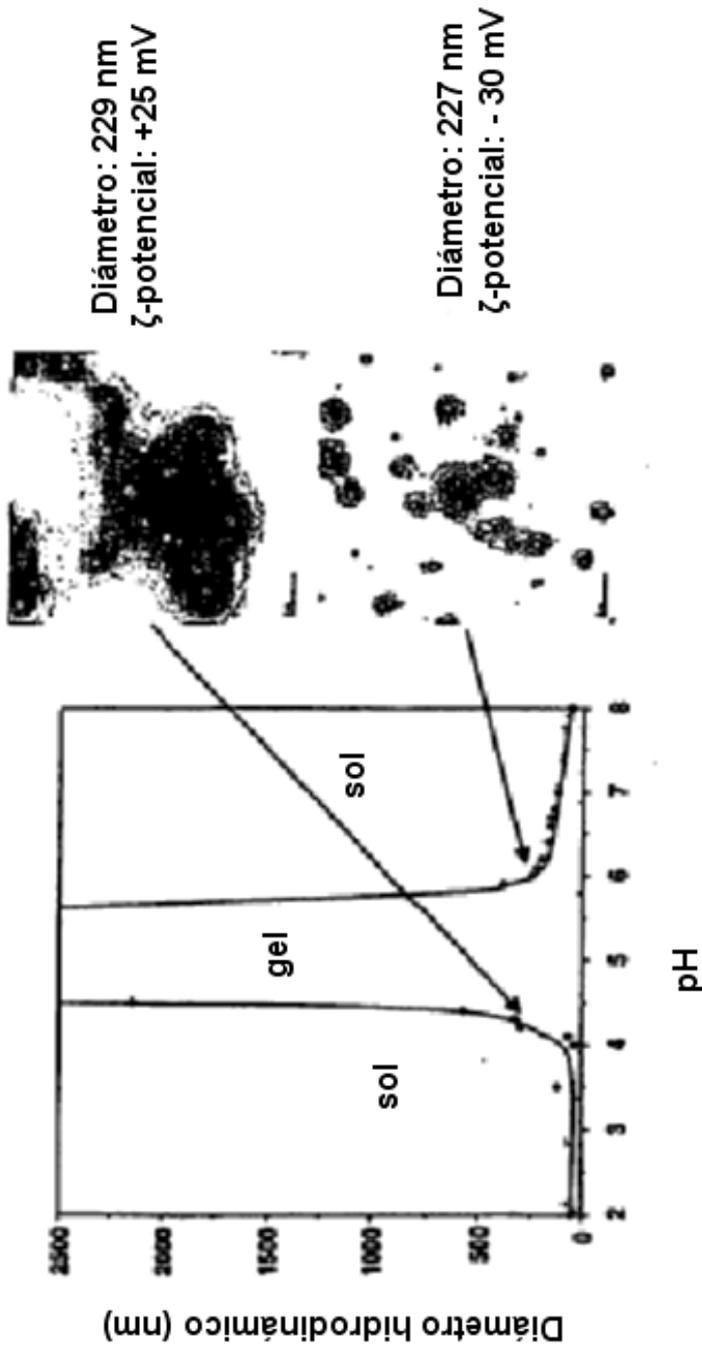
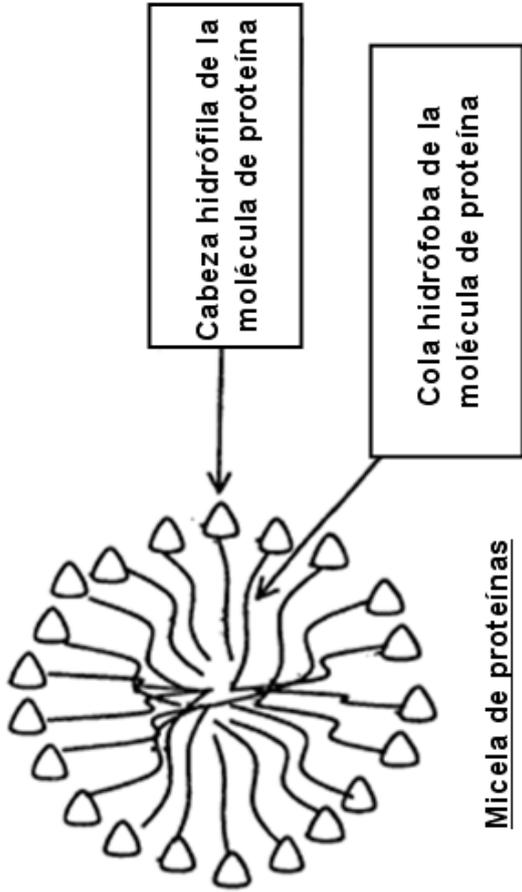


Figura 6



**Figura 7**

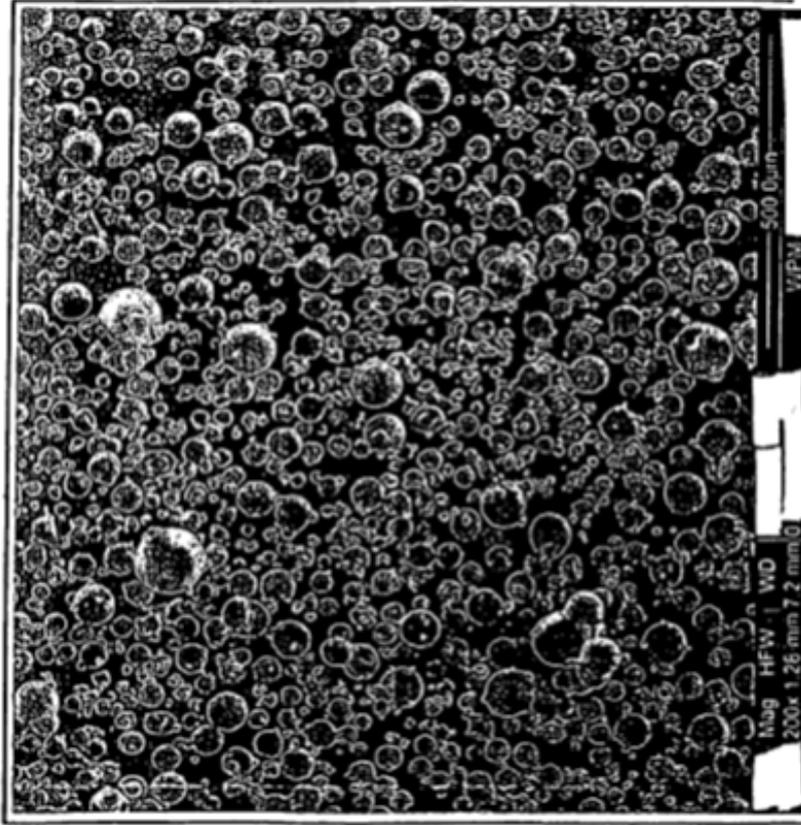


Figura 8

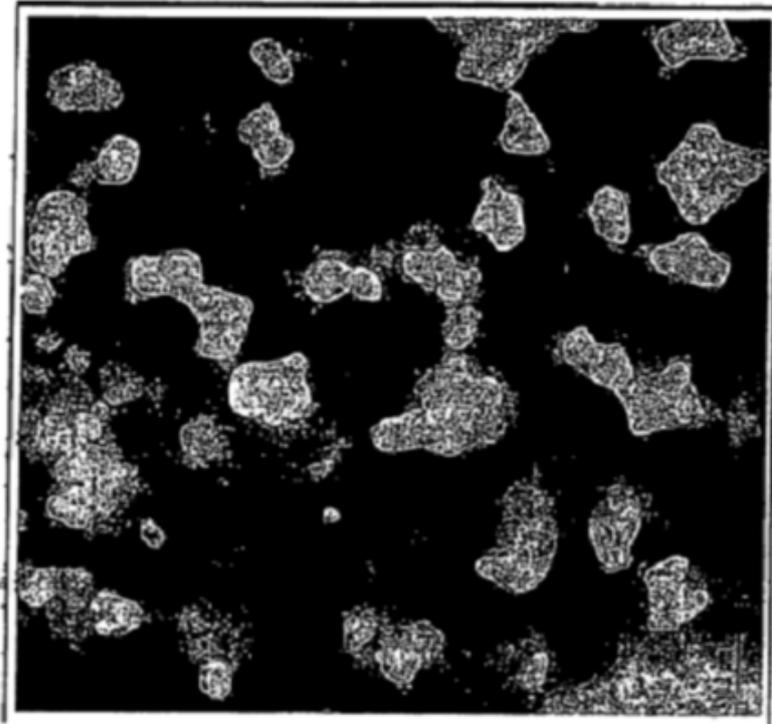


Figura 9

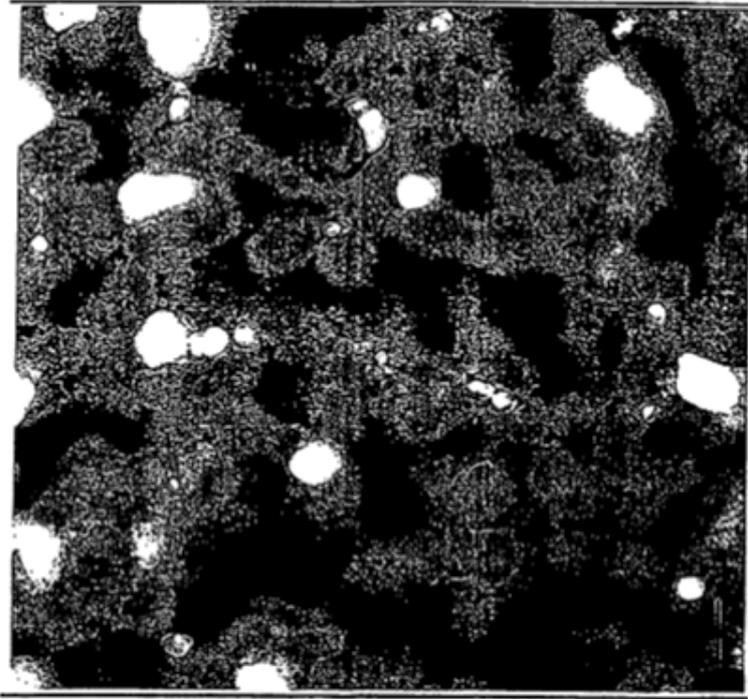


Figura 10

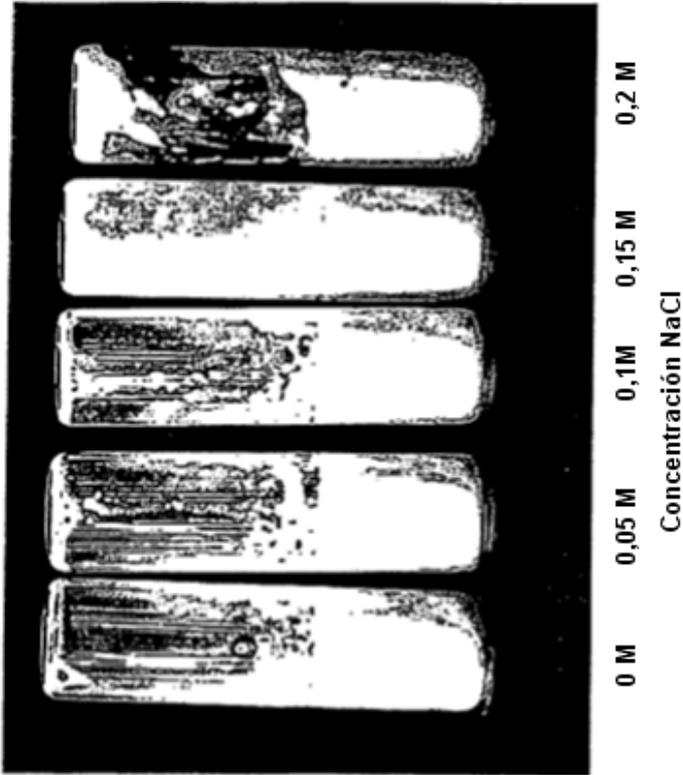


Figura 11

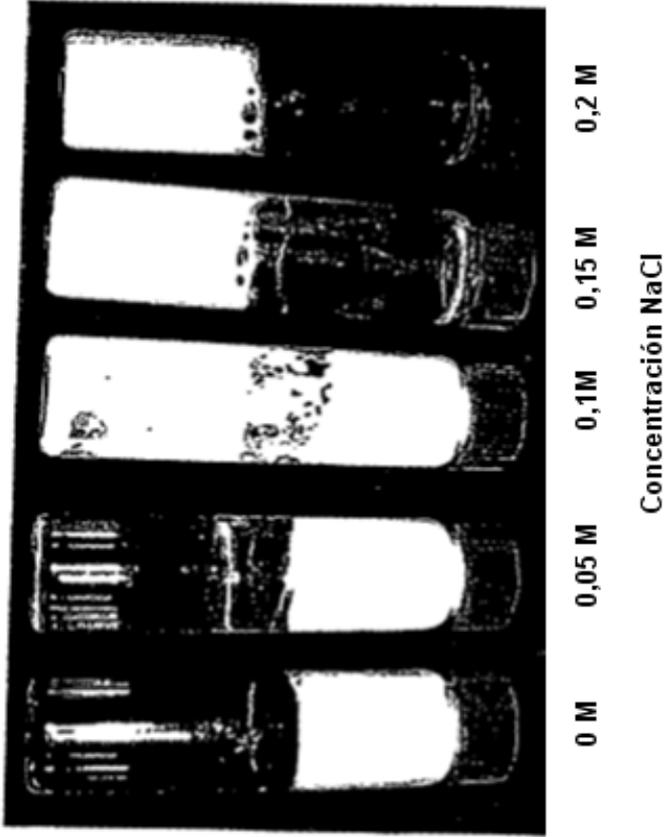


Figura 12

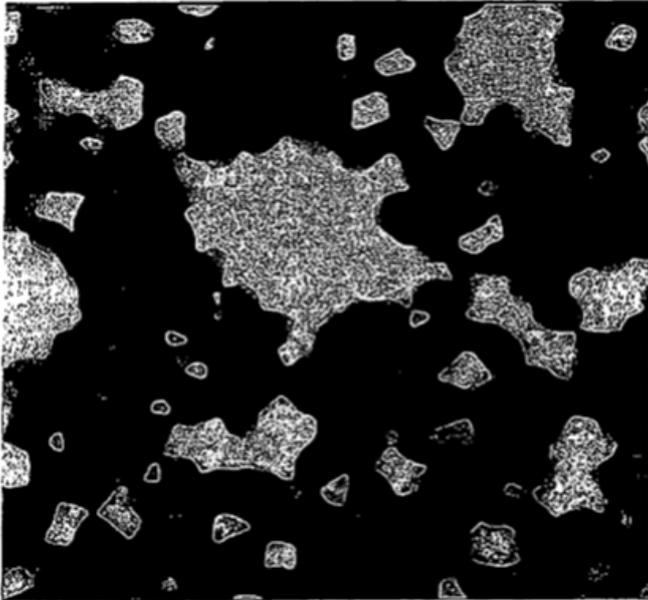


Figura 13

Distribución del tamaño de una dispersión WPM a una concentración de proteínas del 4% tras un tratamiento térmico a 85°C durante 15 min. a pH 6,9

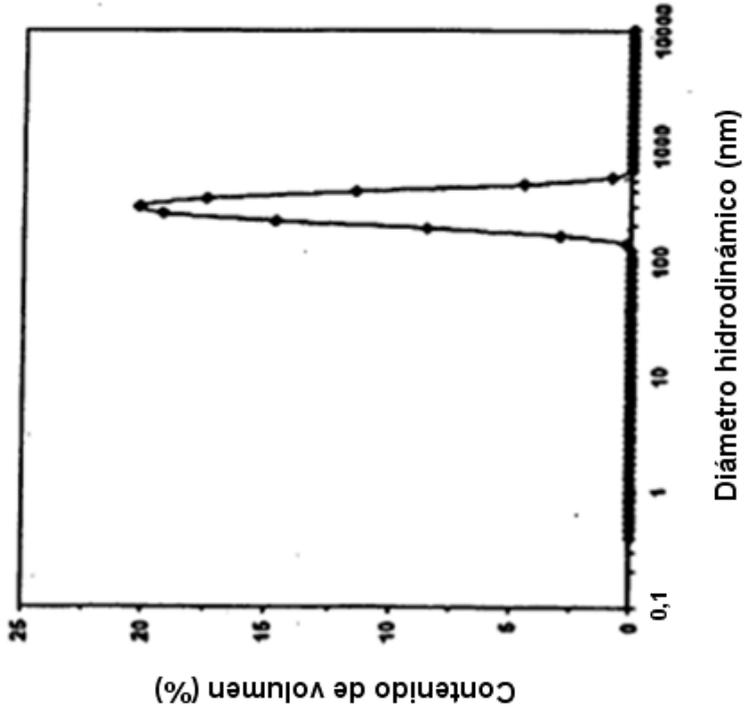


Figura 14

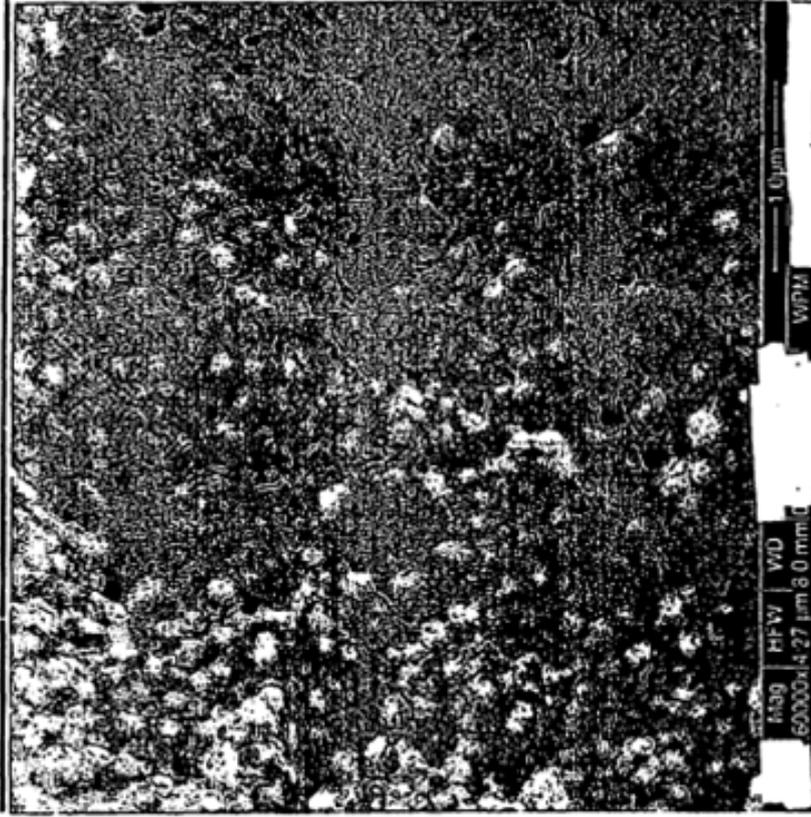


Figura 15

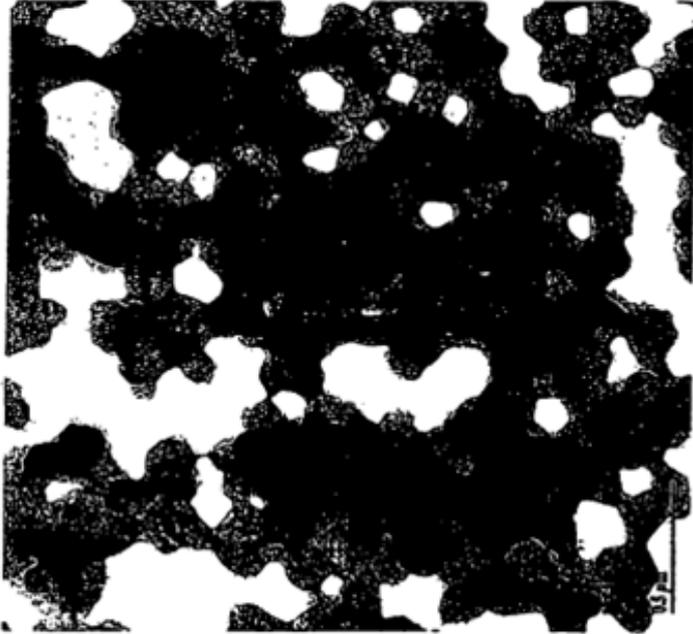


Figura 16

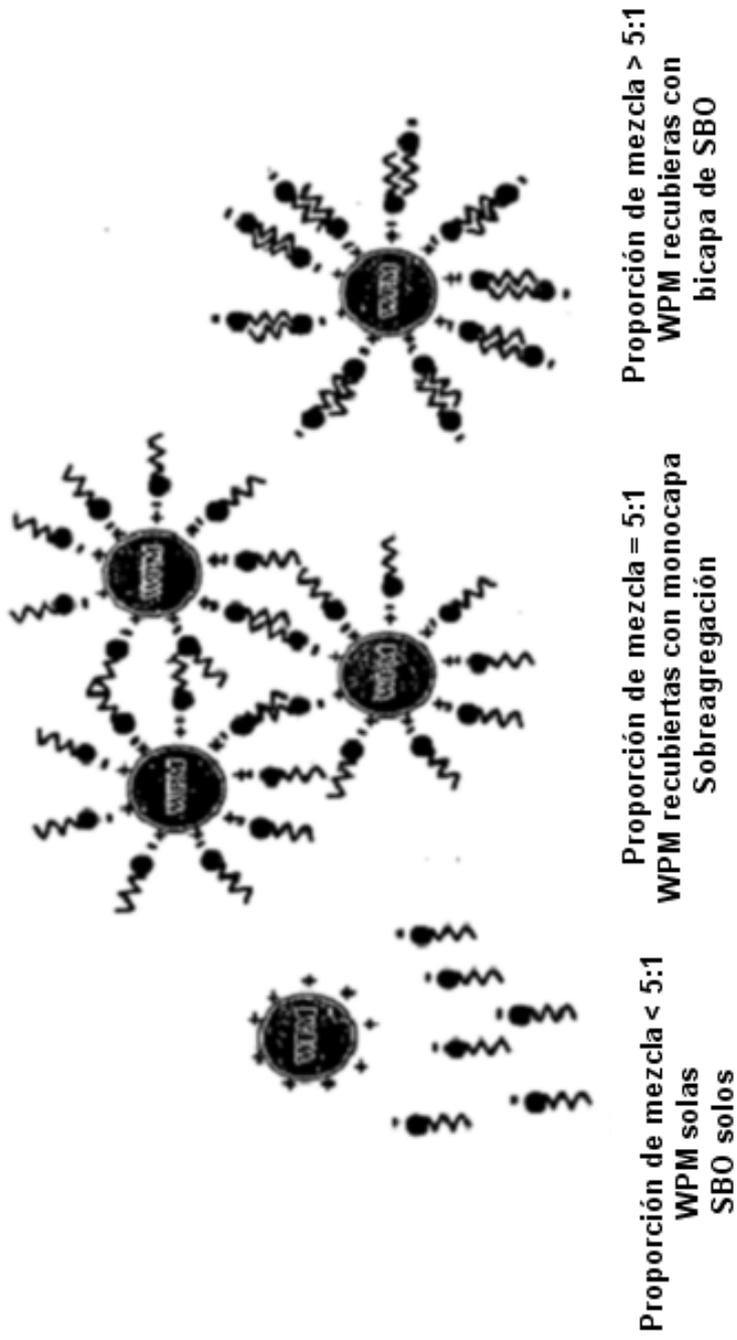


Figura 17



Figura 18