



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 246**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/00** (2006.01)

**A23C 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06006297 .3**

96 Fecha de presentación : **27.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1839498**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54

Título: **Vehículo de proteína del suero de la leche para el suministro de un agente activo.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.09.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.09.2011**

73

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

72

Inventor/es: **Schmitt, Christophe J.E. y**  
**Bovetto, Lionel**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 365 246 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**

Vehículo de proteína del suero de la leche para el suministro de un agente activo

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a micelas de proteínas del suero de la leche, particularmente a su utilización como vehículo para el suministro de agentes activos en el sector de la nutrición y/o cosméticos.

**10 Antecedentes técnicos**

Se conocen en la técnica sistemas de suministro que han sido utilizados ampliamente para el suministro dirigido de medicamentos en el cuerpo, por ejemplo, en la industria farmacéutica. Los sistemas de suministro se encuentran también frecuentemente en forma de microcápsulas para el proceso de alimentos.

15 En las aplicaciones alimenticias, con la utilización de sistemas de suministro se pueden evitar posibles interacciones indeseables entre el agente farmacéutico de nutrición añadido y otros componentes del alimento o de su entorno, y se puede gestionar la localización de la liberación del componente añadido. La aplicación apropiada de tecnología del sistema de suministro posibilita conseguir el máximo efecto de los alimentos sin afectar el sabor, aroma, o  
20 textura de los mismos. Puede impartir protección a ingredientes sensibles de los alimentos y puede aumentar la vida de almacenamiento y la estabilidad de los alimentos mejorados.

Los sistemas de suministro pueden ser también una tecnología clave con potencial para el suministro de  
25 compuestos bioactivos de la dieta y/o agentes cosméticos. Además, el sistema de suministro óptimo debe cumplir también la necesidad de suministro en el lugar específico dentro del aparato gastrointestinal, o la piel, cabello etc, dependiendo de la aplicación deseada.

Para este objetivo se ha utilizado frecuentemente la microencapsulación. Ciertamente, la encapsulación de sabores  
30 y otros agentes activos en una matriz de un polímero alimenticio es bien conocida.

Por ejemplo, el documento EP 0 180 441 B1 da a conocer la utilización de proteínas del suero de la leche para  
encapsular componentes volátiles de sabor. La leche hidrolizada es concentrada por calentamiento y evaporación a  
40 - 50% de sólidos, lo que resulta también en la encapsulación con las proteínas del suero.

35 El documento WO 96/38055 describe la encapsulación de un agente de sabor o agente activo en una matriz de una proteína del suero de la leche, produciendo una composición de encapsulado, que tiene como resultado la liberación controlada del agente de sabor o agente activo y que se puede incorporar en una masa equilibrada con levadura sin provocar efectos perjudiciales en la preparación de la masa.

40 El documento WO 2005/048998 se refiere a sistemas para el suministro en el aparato gastrointestinal, de manera que se utilizan microcápsulas a partir de proteínas y carbohidratos.

El documento US-A-5 882 705 da a conocer un procedimiento en el que una solución de proteína del suero de leche  
micelar es mezclada con un aceite de manteca. A continuación, la emulsión es secada por pulverización.

45 El documento US-A-5 601 760 describe la generación de suero de la leche en micropartículas (calentamiento de una solución al 10% WPI a 80° C con mantenimiento durante 30 minutos) y su utilización para el microencapsulado de grasa de la leche.

50 El documento US 2004/062846 A1 da a conocer un método para producir un agente formador de crema en polvo, en el que se añade suero de la leche en forma de micropartículas a una mezcla de ingredientes de aceite/agua en estado líquido. La mezcla es homogeneizada a continuación y secada por pulverización.

55 El documento US-B1-6 673 3 84 describe un método para la producción de un polvo cremoso, en el que se añade suero de la leche en forma de micropartículas a una emulsión de varios ingredientes líquidos y sólidos. La mezcla es homogeneizada y secada por pulverización.

El documento US 2004/0156979 A1 da a conocer un método para la producción de una composición generadora de  
60 crema, en la que suero de la leche en micropartículas es mezclado con Avicel y se añade agua.

65 El documento US-A-5 260 083 da a conocer un método para la preparación de un producto de frutas que se puede extender, en el que se mezcla suero de la leche en micropartículas con frutas, edulcorantes y agua adicional. La mezcla es sometida a cocción en un recipiente en vacío para aumentar los sólidos solubles mediante la evacuación de agua.

El documento EP-A-0 180 441 se refiere a la fabricación de un material en polvo con sabor de queso. En particular, se refiere a un método para el calentamiento de leche, incluyendo proteína de suero de la leche sin coagular, aproximadamente a 80° C para encapsular de manera efectiva los componentes de sabor del queso.

5 Ainsley Reid A. y otros, en la publicación "Microrretención de bacterias probióticas en un gel de proteína de suero de la leche inducido por Ca(2+)..." "Journal of microencapsulation, vol.22, no. 6, Junio 2005 (2005-6), páginas 603-619" da a conocer un procedimiento (solución aislada de proteína del suero de la leche al 12%, a pH 8, calentada a 80° C durante 30 minutos) para producir una suspensión de proteína que presente, como mínimo, "micelas de suero de la leche". Se añadió un concentrado bacteriano a dicha suspensión de proteínas. Después de otras  
10 etapas de proceso, el disolvente es evacuado en una etapa de liofilización.

Los documentos GB 2 063 273 A, US 2002/051843 A1 y US 6 767 575 B1 dan a conocer partículas de proteína del suero de la leche en alimentos.

15 Uno de los problemas que se encuentran en la producción de productos que contienen proteínas globulares de manera general y, proteínas de suero de la leche en particular es, no obstante, su capacidad limitada de proceso. Ciertamente, las moléculas de las proteínas cuando se calientan o se someten a un entorno ácido o alcalino, o en presencia de sales, tienden a perder su estructura natural y se reúnen en varias estructuras al azar tales como, por ejemplo, geles.

20 Los sistemas de encapsulado de la técnica anterior, por lo tanto, se ha demostrado que son poco eficaces en la liberación controlada de un sabor o de agentes similares, dado que consisten parcialmente en proteína globular y tienen, por lo tanto, tendencia a modificación estructural cuando se calienta, cuando se someten a la acción de sales y/o son sometidos a un entorno ácido o alcalino.

25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una composición para un sistema de suministro que posibilite la liberación controlada de un determinado agente. Además, la tecnología avanzada de alimentos y cosméticos requiere productos diseñados de manera específica, de manera que los ingredientes activos contenidos en el sistema de suministro estén protegidos contra acciones del entorno, tales como radiación UV, luz, oxígeno,  
30 humedad y temperatura.

De acuerdo con ello, el objetivo de la presente invención es el de mejorar la capacidad de utilización de las proteínas del suero de la leche como sistema de suministro en un amplio rango de aplicaciones.

### 35 **Resumen de la invención**

De acuerdo con lo anterior, este objetivo se consigue por medio de las características de las reivindicaciones independientes 1, 13, 17, y 18. Las reivindicaciones dependientes desarrollan adicionalmente la idea principal de la presente invención.

### 40 **Figuras**

La presente invención se describe adicionalmente a continuación haciendo referencia a algunas realizaciones preferentes, que se muestran en los dibujos adjuntos, en los que:

45 La figura 1 muestra el resultado de un experimento demostrativo del efecto del pH y tratamiento térmico de la micelización de  $\beta$ -lactoglobulina.

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

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

55 La figura 4 muestra el resultado de un experimento para evaluar el impacto de la fuerza iónica (Arginine HCl) en la formación de micelas de proteína a pH constante de 7,0.

60 La figura 5 muestra la estabilidad en volumen (FVS) de la espuma estabilizada mediante 1% en peso de  $\beta$ -lactoglobulina en micelas (Davisco) a pH 7,0 en presencia de 60 mM Arginina HCl en comparación con  $\beta$ -lactoglobulina no micelizada.

65 La figura 6 muestra el diámetro hidrodinámico equivalente, basado en intensidad de la proteína del suero de la leche obtenida por tratamiento térmico de 1% en peso de una dispersión de  $\beta$ -lactoglobulina durante 15 minutos a 85° C a pH comprendido entre 2 y 8.

Las micelas de proteína del suero de la leche se obtienen a pH 4,25 (cargado positivamente con un potencial zeta aproximadamente de +25mV) Y A pH 6,0 (cargado negativamente con un potencial zeta aproximadamente de -30mV).

5 El diámetro hidrodinámico en promedio Z de las micelas era de 229,3 nm a pH 4,25 y 227,2 nm a pH 6,0.

Las micrografías correspondientes de las micelas obtenidas por TEM, después de tinción negativa, se muestran en la figura. Las barras de escala son de 1µm.

10 La figura 7 muestra una estructura muy esquemática de una micela de proteína del suero de la leche.

La figura 8 muestra una micrografía SEM (microscopio electrónico de barrido) de una micela de proteína de suero de la leche en polvo, obtenida después de secado por pulverización de una dispersión con un contenido de proteína de 20% después de microfiltrado.

15 La figura 9 es una micrografía TEM con tinción negativa de una dispersión de micelas de proteína del suero de la leche, obtenida con un contenido de 4% de proteína.

20 La figura 10 es una micrografía TEM con tinción negativa de una dispersión de micelas de proteína del suero de la leche, obtenida para un contenido de proteína de 20% después de microfiltrado.

La figura 11 muestra la estabilidad térmica de una dispersión de micelas de proteína del suero de la leche, obtenida para un contenido de proteína de 10% después de microfiltrado a pH 7,0 en presencia de NaCl después de calentamiento a 85° C durante 15 minutos.

25 La figura 12 muestra la estabilidad térmica de una dispersión de proteína del suero de la leche, obtenido con un contenido de proteína de 4% a pH 7,0 en presencia de NaCl después de calentamiento a 85° C durante 15 minutos.

30 La figura 13 es una micrografía TEM de tinción negativa a partir de una dispersión de micelas de proteína del suero de la leche a 4%, basada en un material en polvo secado por pulverización de micelas de proteína del suero de la leche en estado puro, después de dispersión a 50° C en agua desionizada.

35 La figura 14 es un gráfico que muestra la distribución de dimensiones de micelas, obtenidas por el proceso de la invención, utilizando un aislado de proteína del suero de la leche Prolacta90 al 4%, tratado a pH 5,9.

La figura 15 es una micrografía SEM mostrando la estructura interna después del corte de un gránulo de polvo secado por pulverización, presentado en la figura 8.

40 La figura 16 es una micrografía TEM con tinción negativa de una dispersión de micelas de proteína del suero de la leche al 4%, basada en un material en polvo de micelas de proteínas del suero de la leche liofilizado, en estado puro, después de permanecer a temperatura ambiente en agua desionizada. La escala de barras es 0,5 micras.

45 La figura 17 es una vista esquemática del recubrimiento WPM por SDO (butil oleato sulfatado) después de incrementar la proporción de mezcla a pH 3,0. Circulo gris: WPM con cargas superficiales positivas. Parte superior negra+cola: parte superior cargada negativamente y cola hidrofóbica de SBO.

50 La figura 18 es una fotografía de un concentrado de micelas de proteínas de suero al 20%, obtenida después de evaporación, en la que se ha añadido NaCl a 4%.

### Descripción detallada de la invención

55 Según la presente invención, se da a conocer un método para la preparación de masas aglomeradas o aglomerados de proteínas y agente activo, cuyos aglomerados pueden constituir un sistema de suministro en el sector de nutrición y/o cosméticos. Los aglomerados de la presente invención son el resultado de la asociación de micelas de proteína de suero de leche con un agente activo.

60 Las micelas de proteína de suero de la leche, utilizadas en el método de la presente invención, se ve representado esquemático en la figura 7, en la que las micelas de la proteína de suero de la leche están dispuestas de manera tal que las partes hidrofílicas de las proteínas están orientadas hacia la parte externa de los aglomerados, y las partes hidrofóbicas de las proteínas están orientadas hacia el "núcleo" interno de la micela. Esta configuración, que es favorable desde el punto de vista de la energía, ofrece una buena estabilidad a estas estructuras en un entorno hidrofílico.

La estructura específica de micelas puede ser apreciada de las figuras, en particular, de las figuras 3, 9, 10, 13, y 15, en la que las micelas utilizadas en la presente invención consisten esencialmente en aglomerados esféricos de la proteína de suero de leche desnaturalizada.

5 Debido a su carácter dual (hidrofílico e hidrofóbico) este estado desnaturalizado de la proteína parece permitir interacción con la fase hidrofóbica, por ejemplo, una gotita de grasa o de aire y una fase hidrofílica. Las micelas de proteína del suero de la leche tienen, por lo tanto, características perfectas de emulsión y formación de espuma.

10 Además, las micelas pueden ser producidas de manera tal que tienen una distribución extremadamente marcada de tamaños (ver figura 14), de manera tal que más del 80% de las micelas producidas tienen dimensiones menores de 1 micra, preferentemente entre 100nm y 900nm, más preferentemente entre 100-770nm, y de manera más preferente entre 200 y 400nm.

15 El diámetro medio de las micelas se puede determinar utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM). Para ello, las muestras de micelas líquidas son encapsuladas en tubo de gel de agar. La fijación es llevada a cabo por inmersión en una solución de 2,5% de glutaraldehído en 0,1M, pH 7,4 de tampón de cacodilato y fijación posterior con 2% de tetróxido de Osmio en el mismo tampón, conteniendo ambas soluciones 0,04% rojo de Rutenio. Después de deshidratación en una serie clasificada de Etanol (70, 80, 90, 96, 100% de Etanol), las muestras son incorporadas en una resina Spurr (Spurr/Etanol 1:1, 2:1, 100%). Después de polimerización de la resina (70° C, 48  
20 horas), se cortan fragmentos semidelgados y ultradelgados con un ultramicrotomo Leica ultracut UCT. Las secciones ultradelgadas con tinción con Uranil-acetato acuoso y citrato de plomo, son examinados a continuación mediante microscopio electrónico de transmisión (Philips CM12, 80kV).

25 Sin desear quedar ligados por una teoría, se cree que durante la formación de micelas éstas alcanzan una dimensión "máxima" debido a la carga electrostática global de las micelas que repelen cualquier molécula de proteína adicional, de manera tal que las micelas ya no pueden crecer dimensionalmente. Esta es la razón de la distribución de tamaños estrecha que se observa (ver figura 14).

30 Las micelas descritas en lo anterior, pueden ser producidas por un procedimiento que se describe en detalle a continuación.

35 Como proteína del suero de la leche, que puede ser utilizada para la fabricación de micelas de proteína de suero de la leche, se puede utilizar cualquier aislado de proteína del suero de la leche disponible comercialmente, o concentrados de los mismos, es decir, proteínas del suero de la leche obtenidas por cualquier procedimiento para la preparación de proteínas del suero de la leche conocido en la técnica, así como fracciones de proteínas del suero de la leche preparadas a partir de aquéllas, o proteínas tales como  $\beta$ -lactoglobulina (BLG),  $\alpha$ -lactalbumina y albumina de suero. En particular, se puede utilizar como proteína del suero de la leche el suero de la leche llamado dulce, obtenido como subproducto en la fabricación de queso, suero de la leche ácido, obtenido como subproducto en la fabricación de caseína ácida, suero de la leche natural, obtenido por microfiltrado de la leche, o suero de la  
40 leche del cuajo, obtenido como subproducto en la fabricación de caseína de cuajo. La proteína del suero de la leche puede proceder de cualquier fuente individual o de mezcla de cualesquiera fuentes.

45 La fuente de proteínas del suero de la leche para la fabricación de micelas no está restringida a aislados del suero de la leche procedente de origen bovino, sino que corresponde a aislados del suero de la leche, procedentes de cualquier especie animal de mamíferos, tales como ovejas, cabras, caballos, y camellos. Asimismo, el proceso de fabricación se aplica a preparados de suero de la leche mineralizados, desmineralizados, o ligeramente mineralizados. Por "ligeramente mineralizados" se debe comprender cualquier preparado de suero de la leche después de la eliminación de minerales libres que son dializables o diafiltrables, pero que mantienen minerales asociados al mismo por mineralización natural después de preparación del concentrado de proteína del suero de la  
50 leche o aislado, por ejemplo. Estos preparados del suero de la leche "ligeramente mineralizados" no han sido sometidos a ningún enriquecimiento específico de mineral.

55 Las proteínas del suero de la leche son una fuente excedente de aminoácidos esenciales (AA) (45%). En comparación con la caseína (que contiene 0,3g de cisteína/100g de proteína), las proteínas del suero de la leche dulce contienen 7 veces más cisteína, y el suero de ácido 10 veces más cisteína. La cisteína es el aminoácido limitador de la proporción para síntesis de glutatión (GSH), un tripéptido constituido por glutamato de cisteína y glicina, que tiene importantes funciones primarias en la defensa del cuerpo en el caso de estrés. Las exigencias de estos aminoácidos se pueden incrementar en el caso de estrés y en personas de edad avanzada. Asimismo, el suplemento oral de glutatión con proteína de suero de la leche se ha demostrado que aumenta los niveles de  
60 plasma GSH de pacientes infectados por HIV (Eur. J. Clin. Invest. 2001; 31, 171-178).

Otros beneficios para la salud que proporcionan las proteínas del suero de la leche incluyen el incremento y constitución muscular, así como el mantenimiento de los músculos en niños, adultos, o personas de edad avanzada, aumento de la función inmune, mejora de la función cognitiva, control de glucosa en la sangre, de

manera que son adecuados para diabéticos, control de peso y de la sensación de saciedad, efectos antiinflamatorios, curación de heridas y reparación de la piel, disminución de la presión de la sangre, etc.

5 Las proteínas del suero de la leche tienen una mejor relación de eficiencia de proteínas (PER = 118) en comparación, por ejemplo, con caseína (PER = 100). El PER es una medida de la calidad de proteínas, evaluada al determinar la forma beneficiosa en que dichas proteínas ayudan en la ganancia de peso. Se puede calcular por la siguiente fórmula:

$$10 \text{ PER} = \text{crecimiento de peso corporal (g)} / \text{ingesta en peso de proteína (g)} .$$

Ejemplos	PER	% Caseína
caseína	3.2	100
huevo	3.8	118
suero	3.8	118
soja completa	2.5	78
gluten de trigo	0.3	9

15 Para el proceso de micelización las proteínas del suero se encuentran presentes en una solución acuosa en una cantidad de 0,1% en peso hasta 12% en peso, preferentemente en una cantidad de 0,1% en peso hasta 8% en peso, más preferentemente en una cantidad de 0,2% en peso hasta 7% en peso, de manera más preferente en una cantidad comprendida entre 0,5% en peso y 6% en peso, y de forma más preferente en una cantidad comprendida entre 1% en peso y 4% en peso, en base al peso total de la solución.

20 La solución acuosa del preparado de proteína del suero de la leche, presente antes de la etapa de micelización, puede comprender también compuestos adicionales, tales como subproductos de los respectivos procesos de producción de suero, otras proteínas, gomas, o carbohidratos. La solución puede comprender también otros ingredientes alimenticios (grasa, carbohidratos, extractos de plantas, etc). La cantidad de estos compuestos adicionales no supera preferentemente 50% en peso, preferentemente 20% en peso, y más preferentemente no supera 10% en peso del peso total de la solución.

25 La proteína del suero de la leche, así como las fracciones y/o proteínas principales del mismo, se pueden utilizar en forma purificada o igualmente en forma de producto en crudo. Preferentemente, el contenido de cationes bivalentes en la proteína del suero de la leche para la preparación de un concentrado de micelas de proteína del suero es menor de 2,5%, más preferentemente menos de 2%, incluso más preferentemente menos de 0,2%. De modo más preferente, las proteínas del suero de la leche están completamente desmineralizadas.

30 El pH y la fuerza iónica son factores importantes en la micelización de las proteínas del suero de la leche. De este modo, como referencia, para muestras dializadas de forma extensa que carecen virtualmente de cationes libres o cationes agotados, tales como Ca, K, Na, Mg, se ha descubierto que cuando se lleva a cabo el tratamiento térmico durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 segundos y 2 horas a un pH por debajo de 5,4, se obtiene cuajo, mientras que a un pH superior a 6,8, se obtiene como resultado proteínas del suero de la leche solubles (ver figura 1). De este modo, solamente en este rango relativamente estrecho, de pH se obtendrán micelas de proteínas con un diámetro menor de 1µm. Estas micelas tendrán una carga general negativa. La misma forma de micela puede también ser obtenida simétricamente por debajo del pH isoeléctrico, es decir, de 3,5 a 5,0, más preferentemente de 3,8 a 4,5, dando como resultado micelas cargadas positivamente (ver figura 6).

40 Por lo tanto, como referencia, a efectos de obtener micelas cargadas positivamente se puede realizar la micelización de proteínas del suero de la leche en una solución libre de sal con un valor de pH ajustado entre 3,8 y 4,5, dependiendo del contenido de mineral de la fuente de proteínas.

45 Como referencia, a efectos de obtener micelas que tengan una carga general negativa, el pH se ajusta a un rango de 6,3 a 9,0 para un contenido de cationes bivalentes comprendido entre 0,2% y 2,5% en material en polvo de proteína del suero de la leche.

50 Como referencia, para obtener micelas cargadas negativamente el pH es ajustado a un rango comprendido entre 5,6 y 6,4, más preferentemente de 5,8 a 6,0 para un contenido bajo de cationes bivalentes (por ejemplo, menos de 0,2% del polvo de proteína de suero inicial). El pH se puede incrementar hasta 8,4 dependiendo del contenido de mineral de la fuente de proteína del suero (concentrado o aislado). En particular, el pH se puede encontrar entre 7,5 y 8,4, preferentemente entre 7,6 y 8,0 para obtener micelas cargadas negativamente en presencia de grandes cantidades de minerales libres, y el pH se puede encontrar entre 6,4 y 7,4, preferentemente entre 6,6 y 7,2 para obtener micelas cargadas negativamente en presencia de cantidades moderadas de minerales libres. Como norma

general, cuanto mayor es el contenido de calcio y/o magnesio del polvo de proteínas del suero inicial, mayor es el pH de micelización.

5 De acuerdo con la presente invención, las condiciones de formación de las micelas de proteínas de suero de la leche requieren la desmineralización por cualquier técnica de desmineralización (diálisis, ultrafiltrado, osmosis inversa, cromatografía de intercambio iónico...) cualquier fuente de proteínas del suero de la leche natural con una concentración de proteínas comprendida desde la del suero dulce de la leche, permeado de microfiltrado de leche, o suero ácido de la leche (0,9% de contenido de proteínas) hasta una concentración de 30% de proteínas. La diálisis puede ser realizada contra agua (desionizada, destilada, o dura), pero dado que esto permitirá solamente la  
10 eliminación de iones débilmente unidos a las proteínas del suero, es más preferible dializar contra un pH ácido por debajo de 4,0 (orgánico u inorgánico) para controlar mejor la composición iónica de las proteínas del suero de la leche. Al proceder de este modo, el pH de la formación de micelas de proteínas del suero quedará comprendido entre 5,8 y 6,6.

15 Antes de calentar la solución acuosa de proteína del suero de la leche, el pH se ajusta de manera general por la adición de ácido, que es preferentemente de calidad alimenticia, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido glucónico, o ácido láctico. Cuando el contenido de minerales es elevado, el pH se ajusta de manera general mediante la adición de una solución alcalina, que es preferentemente de calidad alimenticia, tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico, o hidróxido amónico.

20 De manera alternativa, si no se desea ajuste de pH, es posible ajustar la fuerza iónica de la proteína del suero de la leche manteniendo el pH constante. A continuación, la fuerza iónica puede ser ajustada mediante iones orgánicos o inorgánicos, de manera que permite la micelización a un valor constante de pH de 7. La figura 4 muestra que se pueden formar micelas a un valor constante del pH de 7,0 mientras que la fuerza iónica es variada por la adición de  
25 70-80 mM de arginina HCl.

Se puede añadir además un tampón a la solución acuosa de proteína del suero de la leche, de manera que se puede evitar un cambio sustancial del valor de pH durante el tratamiento térmico de la proteína del suero de la leche. En principio, el tampón puede ser seleccionado entre cualquier sistema tampón con calidad alimenticia, es decir, ácido acético y sus sales, tales como. Por ejemplo, acetato sódico o acetato potásico, ácido fosfórico y 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 sus sales.

30 El ajuste del pH y/o de la fuerza iónica de la solución acuosa, tiene como resultado un proceso controlado que produce micelas que tienen dimensiones comprendidas entre 100nm-900nm, preferentemente entre 100-700nm, más preferentemente entre 200-400nm. Preferentemente, la distribución de micelas con dimensiones entre 100-700nm es superior al 80% cuando se lleva a cabo el proceso de micelización descrito (ver figura 14).

40 En una segunda etapa, la solución acuosa de proteína del suero inicial es sometida a tratamiento térmico. A este respecto, se ha descubierto que para obtener micelas de proteínas del suero es importante hacer que la temperatura se encuentre en un rango de aproximadamente 80 a 98° C, preferentemente entre 82 y 89° C aproximadamente, más preferentemente desde 84 a 87° C aproximadamente, y más preferentemente de unos 85° C.

45 Una vez se ha alcanzado la temperatura deseada, la solución acuosa de proteína del suero de la leche inicial es mantenida a esta temperatura durante un mínimo de 10 segundos y un máximo de 2 horas. Preferentemente, el periodo de tiempo durante el cual la solución de proteína del suero de la leche acuosa es mantenida a la temperatura deseada esta comprendida entre 12 y 25 minutos, más preferentemente de 12 a 20 minutos, o de manera más preferente unos 15 minutos.

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

55 Tal como se ha mostrado en la figura 2, las mediciones de turbidez son una indicación de la formación de micelas. La turbidez medida por absorbancia a 500nm puede ser, como mínimo, de 3 unidades de absorbancia para una solución de proteína al 1% pero puede alcanzar 16 unidades de absorbancia cuando el rendimiento de la micelización supera 80% (ver figura 2).

60 Para ilustrar de manera adicional el efecto de formación de micelas desde un punto de vista físico-químico, una dispersión a 1% en peso de Bipro® fue calentada durante 15 minutos a 85° C a pH 6,0 y 6,8 en agua MilliQ. El diámetro hidrodinámico de los agregados obtenidos después de tratamiento térmico fue medido por dispersión dinámica de luz. El peso molecular aparente de los agregados se determinó por dispersión estática de luz,  
65 utilizando el gráfico llamado Debye. La hidrofobicidad superficial fue comprobada utilizando la sonda ANS

hidrofóbica y los grupos thiol libremente accesibles por el método DTNB utilizando cisteína como aminoácido estándar. Finalmente, la morfología de los agregados fue estudiada por TEM con tinción negativa. Los resultados se indican en la tabla 1.

5 **Tabla 1: propiedades físico-químicas de los agregados de proteínas del suero de la leche solubles, obtenidos por tratamiento térmico (85° C, 15 minutos) de una dispersión al 1% en peso de proteínas en presencia o ausencia de NaCl.**

pH	diámetro hidrodinámico (nm)	peso molecular $M_w$ ( $\times 10^6$ g.mol <sup>-1</sup> )	morfología	potencial $\zeta$ (mV)	hidrofobicidad superficial de la proteína ( $\mu$ g.mmol <sup>-1</sup> ANS)	grupos SH accesibles (nmol SH.mg <sup>-1</sup> prot.)
6.0	120.3±9.1	27.02±8.09	micelas esféricas	-31.8±0.8	105.4	3.5±0.4

pH	diámetro hidrodinámico (nm)	peso molecular $M_w$ ( $\times 10^6$ g.mol <sup>-1</sup> )	morfología	potencial $\zeta$ (mV)	hidrofobicidad superficial de la proteína ( $\mu$ g.mmol <sup>-1</sup> ANS)	grupos SH accesibles (nmol SH.mg <sup>-1</sup> prot.)
6.8	56.2±4.6	0.64±0.01	agregados lineales	-27.9±1.2	200.8	6.8±0.5

10 Es evidente de la tabla 1 que las micelas de proteína de suero de la leche formadas a pH 6,0 permiten que la proteína disminuya su hidrofobicidad superficial ANS específica por un factor de 2 en comparación con las proteínas del suero de la leche no micelizadas calentadas en la misma situación pero a pH 6,8. La formación de micelas puede apreciarse también en el peso molecular muy elevado de  $27 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> en comparación con  $0,64 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> para proteínas no micelizadas, indicando un estado muy condensado de la materia dentro de la micela (bajo contenido de agua). Es de interés observar que, el potencial  $\zeta$  de las micelas es, incluso, más negativo que las proteínas no micelizadas, aunque estas últimas hayan sido formadas con un pH más básico que las micelas. Este es el resultado de la superficie más hidrofóbica de las micelas, expuesta al disolvente. Finalmente, se debe observar que la reactividad del thiol de las micelas es mucho menor que la de la proteína no micelizada, a causa del diferente pH del tratamiento térmico.

Se ha descubierto que el rendimiento de conversión de proteína de suero de la leche nativo en micelas disminuye cuando la concentración inicial de proteína se incrementa antes del ajuste de pH y tratamiento térmico. Por ejemplo, cuando se empieza con un aislado de proteína de la leche Prolacta90 (lote 673 de Lactalis), el rendimiento de formación de micelas de proteína del suero disminuye de 85% (cuando se empieza con proteínas de 4%) a 50% (cuando se empieza con proteínas de 12%). A efectos de hacer máxima la formación de micelas de proteína del suero (mayor de 85% del contenido inicial de proteínas) es mejor empezar con una solución acuosa de proteínas del suero con una concentración de proteínas por debajo de 12%, preferentemente por debajo de 4%. Dependiendo de las aplicaciones finales deseadas, la concentración de proteína se ajusta antes de tratamiento térmico para controlar el rendimiento óptimo de micelas de proteína del suero.

Las micelas de proteínas del suero que se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento descrito en lo anterior tendrán dimensiones con un diámetro menor de 1 $\mu$ m, preferentemente de 100 a 990nm, más preferentemente de 100-700nm, y de forma más preferente de 200-400nm.

Dependiendo de la aplicación deseada, el rendimiento de micelas es, como mínimo, de 50%, preferentemente, como mínimo, de 80% y los agregados solubles residuales o contenido de proteína soluble es preferentemente inferior a 20%. Las dimensiones promedio de las micelas se caracterizan por un índice de polidispersión inferior a 0,200. Como consecuencia, aparecen micelas como suspensión de color blanco que es estable y tiene un aspecto lechoso en un rango grande de pH 2-8. Se ha observado que las micelas de las proteínas del suero pueden formar agregados alrededor de pH 4,5, no obstante, sin signos de separación de fase macroscópica después de un mínimo de 12 horas a 4°C.

La pureza de las micelas de proteínas del suero, que pueden ser producidas de acuerdo con el procedimiento que se describe, se puede obtener determinando la cantidad de proteínas solubles residuales. Las micelas son eliminadas por centrifugación a 20° C y 26900g durante 15 minutos. El sobrenadante es utilizado para determinar la cantidad de proteínas en cubetas de cuarzo a 280nm (longitud de la trayectoria de luz 1cm). Los valores se expresan en forma de porcentaje del valor inicial antes de tratamiento térmico.

**Proporción de micelas = (Cantidad de proteínas iniciales - cantidad de proteínas solubles) / Cantidad de proteínas iniciales**

5 Las micelas de proteínas del suero de la leche, que se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento que se describe, no han sido sometidas a ningún esfuerzo mecánico que conduzca a la reducción del tamaño de las partículas durante la formación. El proceso induce espontáneamente una micelización de las proteínas del suero de la leche durante el tratamiento térmico en ausencia de cizalladura.

10 Las micelas de proteínas del suero de la leche, utilizadas en la presente invención, pueden ser producidas de acuerdo con el proceso de micelización descrito anteriormente, pero no quedan limitadas al mismo.

15 De acuerdo con la presente invención, el proceso de micelización en su conjunto, tal como se ha descrito en lo anterior, es llevado a cabo sobre una dispersión de proteína de suero de la leche nativa y un agente activo, de manera que después de la formación de micelas se produce un agregado de micelas de proteína del suero de la leche y agente activo.

20 De acuerdo con la presente invención, el agente activo es dispersado en un disolvente con micelas de proteína del suero de la leche. Las micelas de la proteína del suero de la leche pueden ser utilizadas como tales, o pueden ser utilizadas en forma de concentrados y/o materiales en polvo de las mismas. De manera adicional, las micelas de las proteínas del suero de la leche pueden ser dotadas de recubrimiento con un emulsionante, tal como fosfolípidos, por ejemplo, u otros agentes de recubrimiento, tales como goma acacia a efectos de modular la funcionalidad de las micelas de las proteínas del suero de la leche. Preferentemente, el recubrimiento es un emulsionante seleccionado entre butil oleato sulfatado, ésteres del ácido diacetiltartárico de mono y diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de monoglicéridos, esteroilactilatos y mezclas de los mismos.

25 La figura 17 es una representación esquemática de dicho recubrimiento con butil oleato sulfatado.

30 Se pueden producir concentrados de micelas por evaporación, centrifugación, sedimentación o microfiltrado, por ejemplo.

35 La evaporación puede ser llevada a cabo sobre las micelas, alimentando la suspensión de micelas obtenidas después de tratamiento térmico a un evaporador en vacío, con una temperatura entre 50° C y 85° C. Las micelas de proteínas del suero en forma de concentrado obtenidas por evaporación tienen a tener una textura cremosa, semisólida (tal como se muestra en la figura 18) que se puede utilizar en los métodos de la presente invención.

40 La centrifugación puede ser llevada a cabo con una elevada aceleración (más de 2000g) o una baja aceleración (menos de 500g) después de acidificación de la dispersión de micelas de proteínas del suero a un pH menor de 5, preferiblemente de 4,5.

45 También se puede llevar a cabo sedimentación espontánea sobre la dispersión de micelas de proteínas del suero por acidificación. Preferentemente el pH será de 4,5 y el tiempo de sedimentación es superior a 12 horas.

50 De manera alternativa, la concentración de micelas de proteínas del suero se puede conseguir por microfiltrado de la suspensión de micelas obtenidas después de tratamiento térmico. Esta técnica de enriquecimiento no solamente posibilita concentrar micelas de proteínas del suero de la leche al eliminar el disolvente, sino que posibilita asimismo la eliminación de proteínas no micelizadas (tales como proteínas naturales o agregados solubles). De este modo, el producto final solamente consiste en micelas (tal como se puede comprobar mediante microscopio electrónico de transmisión, ver figuras 9 y 10). En este caso, el factor de concentración, que se puede conseguir se obtiene después de que el caudal inicial de permeado a través de la membrana, ha descendido a 20% de su valor inicial.

55 El concentrado de proteínas del suero de la leche, obtenido por microfiltrado, puede tener una concentración de proteínas de un mínimo de 12%. Además, el concentrado puede contener, como mínimo, 50%, preferentemente un mínimo de 80% de la proteína en forma de micelas.

60 Es interesante observar que el concentrado, si se ajusta a un contenido de proteínas de 10%, tiene la capacidad de resistir un tratamiento térmico subsiguiente a 85° C durante 15 minutos y pH 7,0 en presencia, por ejemplo, de hasta 0,15M de cloruro sódico, tal como se muestra en la figura 11. A efectos de comparación, una dispersión de proteína del suero natural (Prolacta90, lote 500658 de Lactalis) forma un gel en presencia de 0,1M de cloruro sódico, con una concentración de proteínas de 4% solamente (ver figura 12). Esto confirma la elevada estabilidad, con respecto a factores externos, de las micelas de proteínas de suero de la leche en la presente invención.

En la presente invención, las micelas pueden ser proporcionadas en forma de micelas de proteínas de suero de la leche o concentrado de micelas de proteínas de suero de la leche en forma líquida como dispersión, en forma

semisólida, o en forma seca. El concentrado de micelas de proteínas del suero se puede utilizar como tal o se puede diluir dependiendo de la aplicación.

5 Una forma seca de micela se puede obtener por cualesquiera técnicas conocidas, tales como secado por pulverización, liofilización, secado por rodillos etc, que se puede llevar a cabo sobre las micelas de proteínas del suero o concentrados de las mismas. De acuerdo con ello, el secado puede ser llevado a cabo con o sin adición de otros ingredientes.

10 La figura 8 muestra un material en polvo obtenido por secado por pulverización sin adición de otros ingredientes adicionales, teniendo un tamaño en diámetro promedio de partículas superior a 1 micra debido a que la agregación de micelas ha tenido lugar durante el secado en pulverización. Un diámetro medio en volumen promedio típico ( $D_{43}$ ) de dichos materiales en polvo está comprendido entre 45 y 55 micras, preferentemente 51 micras. El diámetro medio superficial ( $D_{32}$ ) de dichos materiales en polvo está comprendido preferentemente entre 3 y 4 micras, más preferentemente es de 3,8 micras.

15 El contenido de humedad de los materiales en polvo obtenidos después de secado por pulverización es preferentemente menor de 10%, más preferentemente menor de 4%.

20 Se pueden utilizar los materiales en polvo de micelas de proteínas del suero en la presente invención. Preferentemente estos materiales en polvo serán "puros". Por "material en polvo puro" se considera un material en polvo que comprende, como mínimo 90% de proteínas del suero de la leche. Dicho material en polvo de micelas de proteínas del suero de la leche se caracteriza por una gran capacidad de flujo. Estos materiales en polvo se comportan casi como líquidos y presentan las ventajas de fácil de capacidad de utilización y de transferibilidad. El ángulo de reposo de estos materiales en polvo es preferentemente inferior a 35°, más preferentemente por debajo de 30°. Este ángulo de reposo de valor bajo permite que los materiales en polvo sean utilizados como agentes con capacidad de flujo en aplicaciones cosméticas o aplicaciones alimentarias, por ejemplo.

30 Además, el material en polvo de micelas de proteínas del suero de la leche tiene una elevada capacidad de unión para disolventes tales como agua, glicerol, etanol, aceite, disolventes orgánicos etc. La capacidad de unión de los materiales en polvo con respecto al aceite es, como mínimo, de 30%, con respecto al agua es, como mínimo de 50%, preferentemente, como mínimo 90%, más preferentemente, como mínimo 100%. Para disolventes tales como glicerol y etanol, la capacidad de unión es, como mínimo, de 50%. Esta característica de los materiales en polvo de micelas de proteínas de suero de la leche permite que éstos sean pulverizados o utilizados para llenado con otros agentes activos, seleccionados del grupo de los péptidos, extractos de plantas, hidrolizados de proteínas, bioactivos, vitaminas, minerales, productos farmacéuticos, componentes cosméticos etc, y mezclas de los mismos. El complejo formado puede actuar entonces como agente de suministro, de acuerdo con la presente invención.

40 Una importante característica de las micelas de proteínas del suero de la leche es que la estructura básica de las micelas de las proteínas del suero se conserva después del proceso o reconstitución en disolventes. La figura 15 muestra un grano de polvo de micela de proteína del suero que ha sido seccionado, y en el que se pueden observar las micelas de proteínas del suero individuales. Además, la estructura de las micelas se puede reconstituir fácilmente en disolventes. Se ha demostrado que los materiales en polvo obtenidos a partir de un concentrado de micelas de proteínas del suero se pueden redispersar fácilmente en agua a temperatura ambiente o a 50° C. Las dimensiones y estructura de las micelas de proteínas del suero de la leche se conservan por completo en comparación con el concentrado inicial. Por ejemplo, en la figura 13 el concentrado de proteínas del suero de la leche que ha sido secado por pulverización con una concentración de proteínas de 20% ha sido redispersado en agua desionizada a 50° C con una concentración de proteínas de 50%. La estructura de las micelas ha sido comprobada mediante TEM y se puede comparar a la figura 10. Se obtuvo una forma similar de micelas. El diámetro de las micelas se observó que era de 315nm por dispersión dinámica de luz con un índice de polidispersión de 0,2. La figura 16 muestra también la dispersión de un material en polvo de micelas de proteínas del suero liofilizado, en el que las micelas están reconstituidas.

55 Para llevar a cabo el método de la presente invención se pueden utilizar en cualquier forma micelas de proteínas de suero de la leche, concentrados o materiales en polvo de las mismas. Estos pueden encontrarse en suspensión, en forma semisólida, o en forma seca. Por lo tanto, en una primera etapa se forma una dispersión que comprende micelas de proteínas de suero de la leche como agente activo. El disolvente puede ser cualquier disolvente. Por ejemplo, puede ser agua, disolventes orgánicos, etanol, glicerol, aceites etc.

60 De acuerdo con la presente invención, los agentes activos se seleccionan entre los polifenoles (de café, te verde etc.), licopeno y otros carotenoides. Pueden incluir compuestos tales como cafeína y hesperidinas.

El agente activo puede ser suministrado como único agente activo o como mezclas de agentes activos. Se puede facilitar en cualquier cantidad de 0,1 a 50% del peso total del aglomerado.

Los agentes activos se pueden encontrar en forma seca añadiéndose a la dispersión de micelas de proteína del suero de la leche en un disolvente.

5 De manera alternativa, el agente activo se puede encontrar en forma líquida, que puede ser pulverizado directamente sobre las micelas de las proteínas del suero. La forma líquida puede ser la forma real del agente activo, o puede resultar de la disolución o suspensión del agente activo en un líquido. Dicho líquido puede ser el mismo que el disolvente, en el que se han dispersado las micelas de proteínas del suero de la leche y el agente activo, de acuerdo con el método de la presente invención. También puede ser diferente.

10 De manera alternativa, el agente activo en forma líquida puede ser mezclado con un polvo de micelas de proteínas del suero de la leche.

15 La evaporación del disolvente de dispersión para conseguir aglomerados se lleva a cabo a continuación. Esta operación puede ser realizada por cualquier tratamiento de evaporación conocido en la técnica. De acuerdo con una realización, la evaporación puede ser llevada a cabo por secado por pulverización, de manera que los aglomerados, después de secado por pulverización, adoptan forma de un material en polvo mixto que comprende las micelas de proteínas de suero de la leche aglomeradas con el agente activo. Los aglomerados de micelas de proteínas de suero de la leche resultantes en forma de mezcla comprenden micelas de proteínas del suero de la leche y agentes activos en una proporción de peso comprendida entre 1:1 a 1:1000.

20 La evaporación puede ser evitada cuando se utiliza polvo de micelas de proteínas del suero de la leche debido a la capacidad de estos productos en polvo en absorber el disolvente en una cierta medida, permaneciendo, no obstante, en forma de polvo. De acuerdo con ello, un método para la preparación de micelas de proteínas del suero de la leche y aglomerados de agentes activos, de manera que el agente activo es mezclado con un polvo de micelas de proteínas del suero, es el método previsto. De manera preferente, el material en polvo comprenderá, como mínimo, 50% de micelas de proteínas del suero de la leche.

30 Los materiales en polvo de micelas de proteína del suero tienen una elevada capacidad de unión para disolvente, tales como agua, disolventes orgánicos, glicerol, etanol, aceites etc. La capacidad de unión de los materiales en polvo de micelas de proteínas del suero al aceite es, como mínimo, de 30%, con respecto al agua es, como mínimo, de 50%, preferentemente, como mínimo, 90%, más preferentemente, como mínimo, 100%. Para disolventes tales como glicerol y etanol la capacidad de unión es, como mínimo, de 50%.

35 Esto presenta la ventaja de que el agente activo puede ser añadido al polvo de micelas de proteínas del suero de la leche en forma líquida por mezcla, pulverización etc., y que los aglomerados resultantes adoptan forma de un material en polvo sin que se requiera otro proceso posterior.

40 El agente activo se puede incluir en el polvo de micelas de proteínas del suero en una cantidad de 0,1 - 50%, preferentemente 2 - 20%. De este modo, el material en polvo puede actuar como vehículo de suministro para aquellos agentes activos.

Debido a su carácter dual hidrofóbico e hidrofílico, las micelas de proteínas del suero de la leche son capaces de absorber compuestos insolventes hidrofóbicos, así como hidrofílicos.

45 Los aglomerados de la presente invención son tales que comprenden, como mínimo, un agente activo asociado con las micelas de proteínas del suero de la leche. Estas pueden adoptar la forma de una matriz de proteínas del suero, que tiene, como mínimo, un agente activo incorporado. Dicha matriz de proteínas del suero de la leche puede adoptar la forma de un polímero amorfo.

50 Por lo tanto, la presente invención proporciona un complejo para el suministro de agente activo que comprende micelas de proteínas del suero y dichos agentes activos.

55 Los aglomerados pueden ser utilizados en aplicaciones en las que se desea una liberación lenta de ingredientes activos. Las micelas de proteínas del suero presentan la ventaja de que es posible una liberación controlada del agente activo. Además, las micelas de proteínas del suero de la leche pueden actuar como vehículo de suministro versátil, que puede mejorar la biodisponibilidad de los agentes activos. Las micelas pueden actuar ciertamente como vehículo para suministro de lípidos para vitaminas liposolubles, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Además, por una parte, permiten la estabilización de compuestos solubles en agua, tales como catequinas, polifenoles etc. al liberar antioxidantes liposolubles. Por otra parte, también pueden estabilizar compuestos liposolubles, tales como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, vitamina E, etc. al liberar antioxidantes solubles en agua. Esta versatilidad presenta una gran ventaja con respecto a otros sistemas de suministro ya conocidos.

65 Otras ventajas ofrecidas por los aglomerados de la presente invención incluyen su capacidad en modular la percepción del sabor. Por ejemplo, la percepción del carácter amargo de la cafeína se reduce cuando la cafeína

como agente activo es asociada a las micelas de las proteínas del suero de acuerdo con la presente invención, y se utilizan, por ejemplo, en barras nutritivas cafeinadas. Por otra parte, estos aglomerados pueden proporcionar un incremento de la percepción de sabor salado/dulce.

5 Además, debido a la presencia de micelas de proteínas del suero de la leche los aglomerados de la presente invención son también idealmente adecuados para su utilización como emulsionante, sustituto de grasas, sustituto de caseína micelar, o agente de formación de espuma, puesto que son capaces de estabilizar grasas y/o aire en un sistema acuoso durante un periodo de tiempo prolongado.

10 La estabilidad de la espuma se ha mostrado en la figura 5, que compara la utilización de proteínas del suero de la leche no micelizadas con respecto a proteínas del suero de la leche, micelizadas según la presente invención.

Por lo tanto, los aglomerados de la presente invención pueden ser utilizados como agente emulsionante, para lo que es especialmente adecuado dicho material, puesto que tiene sabor neutro y no se crean sabores secundarios por la utilización del mismo. También se puede utilizar como sustituto de caseína micelar.

15 Además, los presentes aglomerados se encuentran también en condiciones de servir como agente blanqueante, de manera que con un compuesto se pueden realizar varias tareas. Dado que el suero de la leche es un material que se encuentra abundantemente a disposición, su utilización reduce el coste de un producto que requiere un agente de emulsión, de carga, de blanqueo, o de formación de espuma. Cuando se utiliza en aplicaciones de nutrición los aglomerados contribuyen también al valor nutritivo del alimento al que se añaden.

20 Además, los aglomerados de micelas de proteínas del suero de la leche tienen una Proporción de Eficiencia de proteínas de, como mínimo, 100, preferentemente, como mínimo, 110, lo que hace de ellas importantes ingredientes nutritivos.

De acuerdo con ello, los aglomerados obtenidos, de acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención, pueden ser utilizados para la preparación de cualquier tipo de producto que requiera estabilización de una emulsión o de una espuma, tal como, por ejemplo, las que se encuentran presentes en cremas batidas, o helados, en agentes de crema para café, o también en productos de la leche sustancialmente desnatados o con contenido bajo de grasas, o también en aplicaciones como sustituto de la caseína micelar. En aplicaciones cosméticas se pueden utilizar en productos espumosos, gel para el cabello, cremas corporales, ungüentos, champús, etc.

30 Además, los aglomerados solos, o junto con otros materiales, tales como polisacáridos (por ejemplo, goma acacia o carragenatos) pueden ayudar a estabilizar matrices y, por ejemplo, matrices de leche batida. Debido a su sabor neutro, su capacidad de blanqueo y su estabilidad, estos agregados pueden ser utilizados para incrementar el carácter blanco de la leche descremada y su sensación en la boca.

40 Además de incrementar la potencia blanqueante de sistemas basados en la leche para el mismo contenido total de proteínas, el contenido de grasas en una matriz alimenticia se puede reducir utilizando los aglomerados de la presente invención. Dado que los aglomerados de micelas de proteínas de suero de la leche pueden ser utilizados como sustituyentes de las grasas, manteniendo al mismo tiempo las características estructurales, de textura, y organolépticas deseables, se puede obtener una variedad más amplia de productos bajos de grasa.

45 La presente invención da a conocer, por lo tanto, un sistema en el que se consiguen todas las ventajas que se han descrito anteriormente ofreciendo además la disposición y suministro de agentes activos. La combinación de efectos presenta notables ventajas con respecto a los sistemas de suministro conocidos en esta técnica. Además, el sistema de suministro de la presente invención puede ser utilizado en el sector de nutrición, productos farmacéuticos, y cosméticos.

50 Como resultado, los aglomerados de la presente invención pueden ser utilizados en una amplia gamma de aplicaciones. Por ejemplo, consumibles enriquecidos con proteínas que contienen agentes activos, tales como chocolate, barras de alto rendimiento nutritivo, productos culinarios deshidratados, chicles, etc. se pueden producir fácilmente utilizando los aglomerados de micelas de proteínas de suero de la leche.

55 Además, los aglomerados de la presente invención, pueden quedar incluidos en cualquier tipo de producto alimenticio y/o composición cosmética y/o farmacéutica, tal como, por ejemplo, productos de leche, mayonesa, salsas para ensaladas, leche UGH pasteurizada, leche dulce condensada, yogurt, leches fermentadas, salsas, salsas con reducción de grasas, tales como, por ejemplo, salsa de bechamel, productos fermentados basados en la leche, chocolate con leche, productos cremosos, productos esponjosos, emulsiones, helados, productos basados en cereales fermentados, materiales en polvo basados en la leche, materiales en polvo instantáneos de alimentos/bebidas, formulaciones para niños, refuerzos para dietas, alimentos para animales domésticos, tabletas, jarabes, cremas, ungüentos, pulverizaciones, cuidado corporal, suspensiones bacterianas líquidas, suplementos orales secos, suplementos orales húmedos, etc.

Otras aplicaciones incluyen cuidado de la piel y cuidado de la boca, tales como pasta dentrífica, chicles o agentes de limpieza de las encías, por ejemplo.

5 Los siguientes ejemplos muestran la presente invención sin limitar la misma.

### Ejemplos

10 La invención se define adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que describen en detalle la preparación de las micelas de la presente invención. La invención descrita y reivindicada no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas que se describe, puesto que dichas realizaciones están destinadas a ser ilustrativas de diferentes aspectos de la invención. Cualesquiera realizaciones equivalentes estarán comprendidas dentro del ámbito de la presente invención. Ciertamente, diferentes modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en esta descripción quedarán evidentes para los técnicos en la materia a partir de la lectura de esta descripción. Estas modificaciones están destinadas también a quedar comprendidas dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

#### Ejemplo 1: micelización de $\beta$ lactoglobulina (referencia)

20 Se obtuvo  $\beta$  lactoglobulina (lote JE002-8-922, 13-12-2000) de la firma Davisco (Le Sueur, MN, USA). La proteína fue purificada a partir de suero dulce de la leche por ultrafiltrado y cromatografía por intercambio iónico. La composición del material en polvo es de 89,7% de proteínas, 8,85% de humedad, 1,36% de cenizas (0,079 %  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,013 %  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,097 %  $\text{K}^{+}$ , 0,576 %  $\text{Na}^{+}$ , 0,050 %  $\text{Cl}^{-}$ ). Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica (Merck Darmstadt, Alemania).

25 La solución de proteínas fue preparada con la concentración de 0,2% por solvatación de  $\beta$  lactoglobulina en agua MiliQ® (Milipore), y con agitación a 20° C durante 2 horas. El pH de partes alícuotas fue ajustado a 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0 por adición de HCl. Las soluciones fueron dispuestas en viales de vidrio de 20 ml (Agilent Technologies) y selladas con cápsulas de aluminio, conteniendo un sellador de silicona/PTFE. Las soluciones fueron calentadas a 85° C durante 15 minutos (tiempo para alcanzar la temperatura 2,30 - 3,00 minutos). Después del tratamiento térmico las muestras fueron enfriadas en agua helada a 20° C.

35 El aspecto visual del producto (figura 1) indica que el pH óptimo de micelización es de 5,8.

#### Ejemplo 2: Micelización de aislado de proteínas del suero de la leche (referencia)

40 Se obtuvo un aislado de proteínas del suero de la leche (WPI) (Bipro®, Batch JE032-1-420) de la firma Davisco (Le Sueur, MN, USA). La composición del material en polvo está indicada en la tabla 2.

45 La solución de proteínas fue preparada con un contenido de 3,4% de proteínas por solvatación del material en polvo de proteínas de suero de la leche en agua MiliQ® (Milipore), y agitando a 20° C durante 2 horas. El pH inicial fue de 7,2, a continuación se ajustó el pH de partes alícuotas a a 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4 y 6,6 por adición de HCl 0,1N.

50 Las soluciones fueron colocadas en viales de vidrio de 20 ml (Agilent Technologies), y selladas con cápsulas de aluminio, conteniendo un sellador de siliconas/PTFE. Las soluciones fueron calentadas a 85° C durante 15 minutos (tiempo para alcanzar la temperatura 2,30 - 2,50 minutos). Después del tratamiento térmico las muestras fueron enfriadas en agua helada a 20° C.

Se determinó la turbidez de las proteínas del suero de la leche calientes a 500nm y 25° C, las muestras fueron diluidas para permitir la medición en un rango de 0,1-3 unidades absolutas (Espectrofotómetro Uvikon 810, Kontron Instrument). Los valores se calcularon para la concentración de proteínas inicial de 3,4%.

55 El pH de micelización fue considerado que se había alcanzado en la estabilidad (menos de 5% de variación del valor inicial) de la absorbancia medida a 500 nm dentro de un intervalo de 10 minutos para las mismas muestras que se han mostrado en la figura 2. Para este producto el pH óptimo para la micelización fue de 6,0 a 6,2. Para este pH ajustado antes de tratamiento térmico, la turbidez estable fue de 21 y las proteínas solubles residuales se evaluaron por absorbancia a 280 nm después de centrifugación, mostrando un valor de 1,9%. Se puede llegar a la conclusión de que el 45% de las proteínas iniciales se transformó en micelas a pH 6,0.

Tabla 2: Composición de WPI y características de la muestra después de micelización

Suministrador	Davisco
Nombre producto	Bipro
Número lote	JE 032-1-420
Composición (mg/100 g)	
Sodio	650
Potasio	44
Cloruro *10 if $\leq 40$	10
Calcio	82
Fósforo	49
Magnésio	6
pH inicial	7.2
pH de micelización	6.0
Turbidez (500 nm) para 3,4% de proteínas en solución	21
Proteínas solubles residuales (%) por absorbancia a 280 nm	1.9

### Ejemplo 3: Observación microscópica de micelas (referencia)

#### 5 Producción de micelas:

Se preparó una solución de proteínas con un contenido de 2% de proteínas por solvatación de material en polvo de proteínas de suero de la leche (WPI 90 lote 989/2, Lactalis, Retier, Francia) en agua MilliQ® (Milipore), y se agitó a 20 °C durante 2 horas. Los pH de partes alícuotas fueron ajustados utilizando HCl 0,1N o NaOH 0,1N.

10 Las soluciones se colocaron en viales de vidrio de 20 ml (Agilent Technologies), y se sellaron con cápsulas de aluminio, conteniendo un sellador de siliconas/PTFE. Las soluciones fueron calentadas a 85° C durante 15 minutos (tiempo para alcanzar la temperatura 2,30 - 2,50 minutos). Después del tratamiento térmico las muestras fueron enfriadas en agua helada a 20° C. Para este producto el pH óptimo para la micelización fue de 7,4.

#### 15 Observaciones microscópicas:

Se encapsulan muestras de micelas líquidas en tubos de gel de agar. La fijación se logró por inmersión en una solución a 2,5% de glutaraldeído en 0,1 M, pH 7,4 de cacodilato, tampón con postfijación con 2% de tetroxido de Osmio en el mismo tampón, conteniendo ambas soluciones 0,04% de rojo de rutenio. Después de deshidratación en una serie clasificada de etanol (70, 80, 90, 96, 100% etanol), las muestras fueron embebidas en resina Spurr (Spurr/etanol 1:1, 2:1, 100%). Después de polimerización de la resina (70° C, 48 horas), se cortaron secciones semidelgadas y ultradelgadas con un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Las secciones ultradelgadas con tinción de uranil acetato en solución acuosa y citrato de plomo, fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión (Philips CM12, 80kV).

La micrografía TEM se muestra en la figura 3. Las micelas obtenidas presentan forma esférica con un diámetro de 200 nm.

#### 30 Distribución de tamaño de partículas:

Las distribuciones de tamaño de micelas basadas en la intensidad se midieron para las micelas obtenidas por tratamiento térmico de una dispersión a 1% en peso de  $\beta$  lactoglobulina durante 15 minutos a 85° C y pH 4,25 (con carga positiva, con potencial zeta alrededor de +25mV) y pH 6,0 (carga negativa con un potencial zeta alrededor de -30mV). El diámetro hidrodinámico, según promedio Z de las micelas era de 229,3 nm a pH 4,25 y 227,2 a pH 6,0. Se siguieron  $\beta$  LG y los aglomerados de proteínas del suero de la leche utilizando dispersión dinámica de la luz. Un aparato Nanosizer ZS (Malvern Instruments, UK) dotado de un láser emitiendo a 633 nm y con una potencia de 4,0 mW fue utilizado en la prueba. El instrumento fue utilizado en la configuración de retrodispersión, en la que la detección se llevó con un ángulo de dispersión de 173° C. Esto permite una considerable reducción de las señales de dispersión múltiple que se encuentran en muestras turbias. Se colocaron muestras en una celda de cuarzo de forma cuadrada (Hellma, longitud de trayectoria 1 cm). La longitud de trayectoria del haz de luz se ajustó

automáticamente por el aparato dependiendo de la turbidez de la muestra (atenuación). La función de autocorrelación se calculó a partir de la fluctuación de la intensidad de dispersión. Los resultados se indican en la figura 6. Se observa que las partículas promedias se caracterizan por un índice de polidispersidad muy estrecho ( $<0,200$ ). Como consecuencia, la suspensión blanca, obtenida por la presente invención, es estable y tiene un aspecto lechoso en un amplio rango de pH 3-8.

#### **Ejemplo 4: Micelización de una $\beta$ lactoglobulina a pH constante (referencia)**

Se repitió el método descrito en el ejemplo 1 con la condición de utilizar una solución acuosa de  $\beta$  lactoglobulina al 2%. El pH de esta solución se había ajustado a 7,0, añadiendo soluciones de arginina HCl para obtener una concentración final de la sal, comprendida entre 5 y 200 mM y una concentración final de  $\beta$  lactoglobulina de 1%. El tratamiento térmico subsiguiente (80°C, 10 min, unos 2 minutos de calentamiento) fue llevado a cabo produciendo las micelas.

Los resultados se muestran en la figura 4 e indican claramente que solamente en el rango de fuerza iónica, comprendida entre 50 y 70 mM aproximadamente, se puede observar una turbidez sustancial, indicando la presencia de micelas de proteínas del suero de la leche.

#### **Ejemplo 5: preparación de un agente blanqueante (referencia)**

Se trataron proteínas del suero de la leche naturales (WPI 95 lote 848, Lactalis; solución acuosa a 8% en peso) de acuerdo con el ejemplo 2. La luminosidad (L) del producto resultante fue medida en modalidad de transreflectancia, utilizando un aparato MacBeth CE-XTH D65 10° SCE dotado de una celda de medición de 2 mm. La luminosidad resultante fue de  $L=74,8$  que se podía comparar con el valor de  $L=74,5$  para leche entera.

#### **Ejemplo 6: Preparación de un producto generador de crema de café (referencia)**

Se mezclaron proteínas de suero de la leche naturales (Bipro®, lote JE 032-1-420, solución acuosa a 0,5% en peso) a 50° C con 10% en peso de aceite de palma parcialmente hidrogenado, 14% en peso de maltodextrina (DE 21) y en presencia de 50 mM de fosfato-citrato tampón ajustado al pH de micelización de 6,0 para este Bipro®. La mezcla fue homogeneizada bajo una presión de 400/50 bars utilizando un homogeneizador Rannie, y a continuación se trató térmicamente durante 15 minutos a 85° C.

La emulsión obtenida mostró una gran estabilidad durante un periodo de tiempo mínimo de un mes en las condiciones de almacenamiento de 4° C, y proporcionó una blancura  $L=78$  en comparación con un producto generador de crema líquido de referencia (Crème à Café, Emmi, Suiza), con un contenido de grasas de 15% y una luminosidad de  $L=75,9$ .

#### **Ejemplo 7: Preparación de una espuma esponjosa (referencia)**

Se mezcló  $\beta$  lactoglobulina natural (Biopure, Davisco, lote JE 002-8-922, solución acuosa al 2%) con una solución de 120mM Arginina HCl, de manera que la concentración final de  $\beta$  lactoglobulina fue de 1% en peso y Arginina HCl 60 mM. El pH se ajustó a 7,0 por adición de 1N HCl. La mezcla fue tratada a continuación térmicamente a 80° C durante 10 minutos, de manera que el 90% de la  $\beta$  lactoglobulina inicial se convirtió en micelas que tenían un diámetro con promedio en  $z$  de 130 nm. En este caso, el diámetro de las micelas se determinó utilizando un aparato Nanosizer ZS (Malvern Instruments, UK). La muestra fue vertida en una cubeta de cuarzo y se registraron automáticamente las dispersiones de la luz. La función de autocorrelación obtenida fue ajustada utilizando el método de acumulativos, de manera que el coeficiente de difusión de las partículas se pudo calcular, y a continuación el diámetro hidrodinámico promediado en  $z$ , utilizando la ley de Stokes-Einstein. Para esta medición, el índice de refracción del disolvente se tomó en 1,33 y el de las micelas 1,45. Un volumen de 50 mL de la dispersión resultante de micelas de  $\beta$  lactoglobulina se esponja por burbujeo de nitrógeno a través de una frita de vidrio generadora de burbujas de 12-16  $\mu\text{m}$  para producir un volumen de espuma de 180  $\text{cm}^3$  utilizando el aparato estandarizado Foamscan™ (ITConcept). La estabilidad de volumen de la espuma fue seguida a continuación a lo largo del tiempo a 26° C utilizando análisis de imagen, y se comparó con la estabilidad de la espuma obtenida con  $\beta$  lactoglobulina, tratada en las mismas condiciones, pero sin arginina HCl, en la que no se formaron micelas. La figura 5 muestra que la estabilidad del volumen de espuma mejora notablemente por la presencia de micelas de  $\beta$  lactoglobulina.

#### **Ejemplo 8: Producto de la leche fermentado basado en suero de la leche-pruebas de fermentación (referencia)**

##### Material

Se obtuvo un aislado de proteínas del suero de la leche (WPI) (Bipro®) de la firma Davisco (Le Sueur, MN, USA) (concentración de proteínas 92,7%).

Permeado de suero de la leche secado por pulverización (Variolac 836): concentración de lactosa: 83% - minerales 8%

- 5 Ácido láctico 50%
- Lactosa comestible (Lactalis)
- Agua desionizada

10 Método

El material en polvo (Bipro®) fue disuelto en agua desionizada a efectos de disponer de una concentración de proteína de 4,6%, es decir, para 3 litros de solución 154,5 g de polvo WPI y 2845,5 g de agua. El tiempo de hidratación fue de 3 horas. Después de hidratación, la solución fue dividida en muestras de 200 ml para preparar las diferentes pruebas.

15

Tabla 3

Prueba	Permeado de suero (%)	Lactosa (%)	Ajuste 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 (añadido después de ajuste de pH)	6	-
8	0	5 (añadido después de ajuste de pH)	6	+

Para cada solución, se añadió ácido láctico a 50% para ajustar el pH antes de calentamiento.

20

Las muestras fueron calentadas con el calentador doble hasta 85° C y se mantuvo a esta temperatura durante 15 minutos. Después de calentamiento, se enfriaron las soluciones a 40° C y se inocularon con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Las muestras permanecieron 5h 30 en una habitación con vapor a 41° C antes de ser colocadas en un recinto frío a 6° C.

25

Los resultados se han mostrado en la tabla 4.

Tabla 4

Prueba	Permeado de suero	Lactosa	pH	Calentamiento	pH después de 5h30	Aspecto
1	+	+	6.5	+	4.68	Muy firme
2	-	+	6	+	4.7	Firme
3	-	+	6.7	-	5.78	Líquido
4	-	+	6.7	+	4.81	Muy firme
5	-	+	6.1	+	4.59	Muy firme
6	-	-	6	+	4.99	Muy firme
7	-	- añadido después de ajuste pH	6	-	4.87	Líquido con manchas blancas
8	-	- añadido después de ajuste pH	6	+	4.77	Firme

**Ejemplo 9: Helado reforzado con proteínas de suero de la leche con reducido contenido de grasas (referencia)**5 Material

Aislado de proteínas del suero de la leche (WPI, Prolacta90® de Lactalis, Rétiers, Francia) con un contenido de proteínas de 90%

Leche descremada en polvo con 35% de contenido de proteínas

## 10 Sacarosa

Maltodextrina DE39

Grasa anhidra de la leche

Emulsionante

Agua desionizada

## 15 Ácido clorhídrico comestible 1M

Método

20 Utilizando un depósito de doble camisa de 80 L, el polvo Prolacta90® se dispersó a 50° C en agua desionizada a una concentración de proteínas de 9,67% en peso con agitación suave, a efectos de evitar la formación de espuma, es decir, 3,3 kg de Prolacta90® se dispersaron en 31,05 kg de agua desionizada. Después de 1 hora de dispersión, el pH de la dispersión fue ajustado al pH de micelización por adición de HCl. La temperatura de la dispersión se elevó a 85° C y se mantuvo durante 15 minutos a efectos de generar las micelas de la proteína del suero de la leche. Después de 15 minutos la temperatura disminuyó a 50° C y los ingredientes adicionales fueron

25 añadidos secuencialmente a la dispersión de micelas (es decir, leche en polvo descremada, maltodextrinas DE39, sacarosa, emulsionante, y grasa anhidra de la leche). La cantidad final de mezcla fue de 50 kg con un contenido total de sólidos de 39,5% y un contenido de grasas de 5% en peso. Después de 30 minutos de hidratación, la mezcla fue homogeneizada en dos etapas (80/20 bars) y pasteurizada (86°C/30s) antes de reposo durante una noche.

30 Al día siguiente la mezcla de helado fue congelada con un exceso de 100% utilizando un aparato Hoyer MF50 y se endureció a -40° C antes de almacenamiento a -20° C. El helado final contenía 8% en peso de proteínas (20% caseínas, 80% proteínas de suero de la leche) y 5% en peso de grasas en base a la mezcla del helado.

**Ejemplo 10: Micelas de proteínas del suero de la leche obtenidas por secado por pulverización (referencia)**

## 35

Material

Aislado de proteínas del suero (WPI, Prolacta90® de Lactalis, Rétiers, Francia) con un contenido de proteínas de 90%

## 40 Lactosa comestible

Maltodextrina DE39

Agua desionizada

Ácido clorhídrico comestible 1M

45 Método

Utilizando un depósito de doble camisa de 100 L, el polvo Prolacta90® fue dispersado a 50° C en agua desionizada con una concentración de proteínas de 10% en peso con agitación suave, a efectos de evitar la formación de espuma, es decir, 11 kg de Prolacta90® se dispersaron en 89 kg de agua desionizada. Después de 1 hora de dispersión, el pH de la dispersión fue ajustado al pH de micelización (alrededor de 6,3 en este caso) por adición de HCl. La temperatura de la dispersión se elevó a 85° C y se mantuvo durante 15 minutos a efectos de generar las micelas de las proteínas del suero de la leche. Después de 15 minutos la temperatura fue reducida a 50° C y la dispersión de micelas de proteínas del suero al 10% en peso fue dividida en dos lotes de 50 kg. En una primera prueba se dispersaron 20 kg de Lactosa en 50 kg de dispersión de micelas a 50° C y se agitó durante 30 minutos.

55 De manera similar, 20 kg de maltodextrina DE39 se añadieron a los 50 kg restantes de dispersión de micelas de proteína de suero de la leche.

Las dos mezclas fueron secadas a continuación por pulverización en una torre NIRO SD 6,3N con un caudal de 15L/h. La temperatura del aire de entrada era de 140° C y la temperatura del aire de salida era de 80° C. El contenido de agua de los medidores en polvo obtenidos era menor de 5%.

60

Las dimensiones de las micelas de las proteínas del suero fueron determinadas en presencia de lactosa y maltodextrina DE39 en agua, utilizando dispersión dinámica de la luz antes y después del secado por pulverización. La concentración total de proteínas fue ajustada en 0,4% en peso por dilución de la dispersión antes de secar por pulverización o reconstitución del polvo, a efectos de encontrarse en el régimen diluido de viscosidad

65

para las micelas de proteínas del suero. Se utilizó un aparato Nanosizer ZS (Malvern Instruments) y el diámetro de las micelas fue promediado a partir de 20 mediciones.

5 El diámetro de las partículas determinado por las micelas de proteínas de suero en presencia de lactosa y maltodextrina (DE39) fue de 310,4 nm y 306,6, respectivamente. Después de reconstitución de los materiales en polvo, se observó que los correspondientes diámetros eran de 265,3 nm y 268,5, respectivamente. Estas mediciones confirman que las micelas de las proteínas del suero de la leche eran físicamente estables con respecto al secado por pulverización. Los resultados fueron corroborados por observaciones mediante microscopio TEM de micelas de proteínas de suero a 0,1% en peso en dispersión en agua, utilizando tinción negativa en presencia de ácido fosfotúngstico al 1% a pH 7. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Philips CM12 funcionando a 80kV. Las micelas de proteínas del suero fueron observadas en solución antes del secado por pulverización y después de reconstitución de este material en polvo secado por pulverización. No se pudo detectar diferencia de morfología ni de estructura.

#### 15 **Ejemplo 11: Concentración por evaporación (referencia)**

Se reconstituyó un aislado de proteína del suero Prolacta90® de la firma Lactalis (lote 500648) en agua blanda con una concentración de proteínas de 4% para alcanzar unas dimensiones finales del lote de 2500 kg. El pH fue ajustado por adición de ácido clorhídrico 1M, de manera que el valor final del pH era de 5,90. La dispersión de proteínas del suero se bombeó a través de un cambiador de calor placa-placa APV-mix con un caudal de 500 l/h. El precalentamiento a 60° C fue seguido por tratamiento térmico de 85° C durante 15 minutos. La formación de micelas de proteínas del suero fue comprobada por medición del tamaño de partículas, utilizando dispersión dinámica de la luz y también por medición de la turbidez a 500 nm. La dispersión de micelas de proteínas del suero al 4% obtenida se caracterizó por un radio hidrodinámico de las partículas de 250 nm, un índice de polidispersidad de 0,13, y turbidez de 80. La dispersión de micelas de proteínas del suero fue utilizada a continuación para alimentar un evaporador Scheffers con un caudal de 500l/h. La temperatura y vacío en el evaporador fueron adaptados de manera que se produjeron unos 500 kg de micelas de proteínas del suero, concentrado, con una concentración de proteínas de 20%, y se enfrió a 4° C.

#### 30 **Ejemplo 12: Enriquecimiento por microfiltrado (referencia)**

Se reconstituyó un aislado de proteínas del suero Prolacta90® a 15° C en agua blanda con una concentración de proteínas de 4% para alcanzar unas dimensiones totales del lote de 2500 kg. El pH fue ajustado por adición de ácido clorhídrico 1M de manera que el valor de pH final era de 5,90. La dispersión de proteínas del suero fue bombeada a través de un cambiador de calor placa-placa APV-mix con un caudal de 500 l/h. Se realizó a continuación un precalentamiento a 60° C por tratamiento térmico de 85° C durante 15 minutos. Se comprobó la formación de micelas de proteínas del suero por medición del tamaño de partículas utilizando dispersión dinámica de luz, así como medición de turbidez a 500 nm. La dispersión de micelas de proteínas del suero al 4% obtenida se caracterizaba por un radio hidrodinámico de las partículas de 260 nm, un índice de polidispersidad de 0,07, y una turbidez de 80. La forma de las micelas de la proteína fue también comprobada por TEM, y las estructuras de las micelas con un diámetro promedio de 150-200 nm eran plenamente visibles (figura 9). La dispersión de micelas de proteínas del suero fue enfriada a 4° C, y utilizada para alimentar una unidad de filtrado dotada de una membrana Carbosep M14 de 6,8 m<sup>2</sup> con un caudal de 180 l/h. En este caso, la concentración de micelas de proteínas del suero se llevó a cabo a 10° C, hasta que el caudal de permeado alcanzó 70 l/h. En este caso, el concentrado de proteínas del suero final contenía 20% de proteínas. La estructura de las micelas en el concentrado se comprobó por TEM y, claramente, no existía cambio significativo en comparación con la dispersión al 4% de proteínas del suero antes de microfiltrado (figura 10).

#### 50 **Ejemplo 13: Polvo de micelas de proteínas del suero de la leche, comprendiendo, como mínimo, 90% de proteínas del suero (referencia)**

200 kg de un concentrado de micelas de proteínas del suero de la leche obtenido por microfiltrado a 20% de proteínas (ver ejemplo anterior) se inyectaron en una torres NIRO SD 6,3N utilizando una tobera de atomización (diámetro = 0,5 mm, ángulo de pulverización 65°, presión 40 bars) con un caudal de producto de 25 kg/h. La temperatura de entrada del producto era de 150° C y la temperatura de la salida de 75° C. El caudal de aire en la torre era de 150 m<sup>3</sup>/h. El contenido de material en polvo era menor de 4% y el material en polvo se caracterizaba por una capacidad de flujo muy elevada. Por microscopio electrónico de exploración del material en polvo se observaron partículas muy esféricas con un diámetro aparente comprendido entre 10 y 100 µm (figura 8).

#### 60 **Ejemplo 14: Polvo de micelas de proteínas del suero de la leche, en mezcla (referencia)**

20 kg de concentrado de micelas de suero de la leche se mezclaron con 1,7 kg de maltodextrina con un DE de 39, de manera que la relación en peso final de las micelas de las proteínas del suero con respecto a la maltodextrina es de 70/30. Esta mezcla fue inyectada en una torre NIRO SD 6,3N utilizando una tobera de atomización (diámetro Ø = 0,5 mm, ángulo de pulverización = 65°, presión = 40 bars) con un caudal final de producto de 25 kg/h. La

temperatura de entrada del producto era de 150° C y la temperatura de salida era de 75° C. El caudal en la torre era de 150 m<sup>3</sup>/h. El contenido de humedad en el polvo era menos de 4% y el polvo se caracterizaba por una capacidad de flujo muy elevada.

- 5 Los materiales en polvo de los ejemplos 13 y 14, una vez reconstituidos en agua, comprenden esencialmente micelas que tienen la misma estructura y morfología que el concentrado de micelas de proteínas del suero de la leche.

**Ejemplo 15: Polvo de micelas de proteínas del suero de la leche obtenido por liofilización (referencia)**

10 Material

Concentrado de micelas de proteínas del suero de la leche a 20% de proteínas, producido por microfiltrado en el ejemplo 12, con un contenido de proteínas de 90%.

15 Método

20 Se introdujeron 100 g de concentrado de micelas de proteínas del suero de la leche en un matraz de plástico y se congeló a -25° C durante una semana. Este matraz fue colocado a continuación en un liofilizador de laboratorio Virtis dotado de bomba de vacío. La muestra se dejó permanecer durante 7 días hasta que la presión en el liofilizador resultó constante aproximadamente de 30 mbars. Se recuperaron unos 20 g de micelas de proteínas del suero de leche liofilizadas.

**Ejemplo 16: Chocolate negro enriquecido con proteínas del suero de la leche sin sacarosa**

25 Material

Ingredientes	Porcentaje
Polvo de micelas de proteínas del suero del ejemplo 13 con un contenido de proteínas de 90%	40-50%
Sucralosa	0.05-0.1%
Grasa de leche anhidra	3-5%
Licor de cacao	30-40%
Manteca de cacao	5-15%
Vanilina	0.005-0.015%
Lecitina	0.1-1%

30 Método

35 El licor de cacao es mezclado con manteca de cacao, grasa de manteca, polvo de micelas de proteínas del suero, sucralosa, vanilina, y lecitina. La mezcla es sometida a conchado durante una noche a 65° C, hasta obtener una pasta homogénea. Esta masa de chocolate es moldeada a continuación formando tabletas de chocolate y se enfría. El chocolate negro se caracteriza por un contenido final de proteínas del suero de 45-50%.

**Ejemplo 17: Chocolate blanco enriquecido con proteínas del suero de la leche**

40 Material

Ingredientes	Método 1	Método 2	Método 3
Polvo de micelas de proteínas del suero del ejemplo 13 con un contenido de proteínas de 90%	15-25%	25-35%	35-40%

Sacarosa	40-45%	30-35%	30-35%
Grasa anhidra de la leche	1-10%	1-10%	1-10%
Polvo de suero de la leche	2-10%	2-10%	0%
Manteca de cacao	20-30%	20-30%	20-30%
Vanilina	0.01-0.1%	0.01-0.1%	0.01-0.1%
Lecitina	0.1-1%	0.1-1%	0.1-1%

#### Método 1

5 Micelas de proteínas del suero de la leche, polvo de suero de la leche, sacarosa, y vanilina se mezclaron y movieron hasta obtener la distribución de tamaño de partículas deseada. La mezcla es sometida a conchado durante una noche a 65° C con manteca de cacao, grasa de leche anhidra, y lecitina hasta conseguir una pasta homogénea. Esta masa de chocolate es moldeada a continuación en placas de chocolate y enfriada. Este chocolate blanco se caracteriza por un contenido final de proteínas del suero de 20%.

#### Método 2

15 Micelas de proteínas del suero de la leche, polvo de suero de la leche, sacarosa, y vanilina se mezclaron y movieron hasta obtener la distribución de tamaño de partículas deseada. La mezcla es sometida a conchado durante una noche a 65° C con manteca de cacao, grasa de leche anhidra, y lecitina hasta conseguir una pasta homogénea. Esta masa de chocolate es moldeada a continuación en placas de chocolate y enfriada. Este chocolate blanco se caracteriza por un contenido final de proteínas del suero de 30%.

#### Método 3

20 Micelas de proteínas del suero de la leche, sacarosa, y vanilina se mezclan y se somete a molturación hasta conseguir la distribución de tamaño de partículas deseada. La mezcla es sometida a conchado durante una noche a 65° C con manteca de cacao, grasa de leche anhidra, y lecitina hasta conseguir una pasta homogénea. Esta masa de chocolate es moldeada a continuación en placas de chocolate y enfriada. Este chocolate blanco se caracteriza por un contenido final de proteínas del suero de 30-35%.

#### **Ejemplo 18: Dispersión acuosa de micelas de proteínas del suero de la leche con recubrimiento de butil oleato sulfatado (SBO) o cualquier otro emulsionante cargado negativamente (referencia).**

#### Material

Polvo de micelas de proteínas del suero de la leche (WPM) del ejemplo 13 con un contenido de proteínas de 90% SBO

35 Ácido clorhídrico (1M)

#### Método

40 Se dispersó polvo (WPM), descrito en el ejemplo 13, en agua MiliQ para conseguir una concentración final de proteínas de 0,1% en peso. Esta dispersión es filtrada sobre filtros de 0,45 µm a efectos de eliminar posibles aglomerados de WPM. El pH de esta dispersión WPM fue llevado a 3,0 por adición de ácido clorhídrico 1M. Se preparó una dispersión de SBO a 1% en peso a pH 3,0.

45 El radio hidrodinámico y el potencial zeta de estos WPM se determinó utilizando el aparato Nanosizer NS (Malvern Instruments Ltd.). El diámetro era de 250 nm y la movilidad electroforética de + 2.5 Pm.cm.V<sup>-1</sup> .s<sup>-1</sup>. El radio hidrodinámico y la movilidad electroforética de la dispersión de SBO a pH 3,0 eran de 4 nm y - 1.5/-2.0 Pm.cm.V<sup>-1</sup> .s<sup>-1</sup>, respectivamente.

50 Después de haber realizado esta caracterización preliminar se utiliza la dispersión de SBO para titular el WPM uno, siguiendo la evolución del radio hidrodinámico y de la movilidad electroforética de la mezcla. Se descubrió que el radio hidrodinámico era constante de unos 250-300 nm hasta una proporción de mezcla en peso de WPM/SBO de 5:1. En este momento, el radio hidrodinámico diverge notablemente hasta 20000 nm y se observa precipitación de complejos de WPM SBO. Después de añadir de manera adicional SBO, en una proporción superior a 5:1 el radio hidrodinámico disminuyó progresivamente a 250 nm, tal como se había encontrado inicialmente para WPM, nivelando desde una proporción de 4:1. El seguimiento de la movilidad electroforética de la mezcla demostró que disminuía por la adición de SBO, alcanzando un valor 0 para una proporción de mezcla

de 5:1. A continuación, sigue descendiendo con la adición de SBO, empezando la nivelación a - 3.0 Pm.cm.V-1.s-1 a partir de la proporción 4:1.

5 La explicación de estos resultados es que los WPM cargados positivamente son, recubiertos electrostáticamente en una primera etapa con la parte negativa del SBO, hasta conseguir completa neutralización de la carga (proporción de mezcla 5:1). En este momento, los restos hidrofóbicos (colas) del SBO son capaces de autosaciarse llegando a una sobreaglomeración con un diámetro hidrodinámico muy grande, y precipitación de complejos. Después de otra adición de SBO las colas hidrofóbicas se asocian adicionalmente formando un doble recubrimiento, exponiendo su cabeza negativa al disolvente. Esto conduce a WPM cargados negativamente con un doble recubrimiento de SBO (ver figura 17) comparable a un liposoma de núcleo completo de proteína.

15 Se han obtenido resultados similares con otros emulsionantes de calidad de alimentos ácidos, tales como DATEM, CITREM, SSL (de Danisco), en solución acuosa con un pH 4,2, de manera que se ionizan principalmente en su forma aniónica (funciones químicas COO).

#### **Ejemplo 19: Salsa bechamel enriquecida con proteínas (referencia).**

##### Material

20 Polvo de micelas de proteínas del suero de la leche, en mezcla, según el ejemplo 14, con un contenido de proteínas de 70%  
Mantequilla  
Harina  
Leche descremada  
25 Sal

##### Método

30 30 g del polvo de proteínas del suero en mezcla se dispersan en un litro de leche descremada con calentamiento, 30 g de mantequilla y 80 g de harina se añaden a continuación junto con 2,5 g de sal. La mezcla es sometida a ebullición para producir una salsa bechamel, que tiene un contenido de proteínas del suero de la leche de 3 g/100 g, aproximadamente.

#### **Ejemplo 20: Base para barrita de alto rendimiento enriquecida con proteínas del suero de la leche.**

35

##### Material

Ingredientes	Porcentaje
Polvo de micelas de proteínas de suero en mezcla procedente del ejemplo 13 con un contenido de proteínas de 90% (humedad 3,5%)	40-50%
Jarabe de arroz marrón	35-45%
Maltitol	5-10%
Glicerol	10-15%

##### Método

40 Se mezcla jarabe de arroz marrón con maltitol y glicerol a 25° C. A continuación, se añade polvo de micelas de proteínas del suero de la leche y se lleva a cabo mezcla durante 10 minutos. Se obtiene una base enriquecida con proteínas del suero para barrita de alto rendimiento que se puede mezclar con otros ingredientes (minerales, 45 vitaminas, aromas). Esta preparación contiene más proteínas que leche (38%).

#### **Ejemplo 21: Determinación del ángulo de reposo para polvo de micelas de proteínas del suero de la leche secado por pulverización, mezclado con polvo de micelas de proteínas del suero de la leche, polvo de aislado de proteínas del suero de la leche y leche en polvo descremada con bajo contenido calórico (referencia).**

50

##### Material

55 Polvo de micelas de proteínas del suero de la leche del ejemplo 12 con un contenido de proteínas de 90% (humedad 3,5%)  
Polvo de micelas de proteínas del suero de la leche, en mezcla, del ejemplo 13, con un contenido de de proteínas de 90% (humedad 3,5%)

Polvo de aislado de proteínas del suero de la leche Prolacta90 (lote 500658 de Lactalis, Francia; humedad 4%)  
 Leche en polvo descremada de bajo poder calorífico (lote 334314 de Emmi, Suiza; humedad 3,5%)  
 Dispositivo de medición descrito para medir el ángulo de reposo para materiales en polvo, según norma ISO 4324.

5

#### Método

El material en polvo es colocado en un embudo con un diámetro de 99 mm y el polvo es forzado al flujo utilizando el agitador. El material en polvo cae sobre un recipiente de plástico transparente con un diámetro de 100 mm y una altura de 25 mm. El ángulo de reposo,  $\Phi$ , es medido a partir de la siguiente ecuación:

10

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

En la que h es la altura máxima del cono de material de polvo que se puede obtener, estando cubierta toda la superficie del recipiente de plástico por polvo.

15

Resultados de la prueba de ángulo de reposo (valores que son medias de 3 mediciones indicándose la desviación estándar).

	Polvo de micelas de proteínas del suero	Polvo de micelas de proteínas del suero en mezcla	Aislado de proteínas del suero	Polvo de leche descremada de bajo poder calorífico
Ángulo de reposo (°)	24.6±1.1	27.3±0.7	34.3±0.5	43.8±2.8

20

Los resultados del ángulo de reposo muestran claramente que el polvo de micelas de proteínas de la leche, puro o mezclado con maltodextrina, muestra un ángulo, significativamente, menor que el polvo de proteínas de suero de la leche inicial, o incluso que el polvo de leche descremada. Un ángulo de respuesta inferior a 35° es característico de polvos con muy buena capacidad de flujo.

25

#### **Ejemplo 22: forma de obtener un vehículo para el suministro de extracto de te verde.**

##### Método 1

30

5 ml de solución de extracto de te verde al 20% fueron vertidos en 10 g de polvo de micelas de proteínas de suero de la leche puro, y a continuación sometido a rigurosa agitación en un matraz. El polvo absorbía la totalidad de fase líquida. El agua residual fue eliminada por secado a 60° C en estufa durante 18 horas. El producto final contenía 9% de extracto de te verde.

35

##### Método 2

30 ml de extracto alcohólico de te verde fueron vertidos en 70 g de polvo de micelas de suero de leche puro, y a continuación se sometió a agitación. El producto final tenía un color verde muy agradable. Se evaporó el etanol a temperatura ambiente.

40

#### **Ejemplo 23: fórmula para obtener un vehículo de suministro de cafeína.**

Se vertieron 10 ml de cafeína al 2% en 10 g de polvo de micelas de proteínas de suero de la leche, y a continuación se agitó rigurosamente en un matraz. El material en polvo absorbió la totalidad de fase líquida. El secado a 60° C en estufa durante 18 horas eliminó el agua residual. El producto final contiene 1,7% de cafeína. El producto final compacto fue triturado manualmente y sometido a comprobación. El producto era crujiente y no se percibió sabor amargo, incluso para dicho contenido elevado de cafeína.

45

#### **Ejemplo 24: fórmula para obtener un vehículo para suministro de extracto de café.**

5 ml de una solución conteniendo extracto de café soluble al 20% fueron vertidos en 10 g de polvo de micelas de proteínas de suero de la leche puro, y a continuación agitado rigurosamente en un matraz. El material en polvo absorbió toda la fase líquida. El secado a 60° C en una estufa durante 18 horas eliminó el agua residual. El producto final contiene 9% de extracto de café soluble, era muy crujiente y tenía un fuerte sabor a café.

55

#### **Ejemplo 25: fórmula para obtener un vehículo para suministro de licopeno.**

30 ml de una solución conteniendo extracto alcohólico de licopeno saturado fueron vertidos en 70 g de polvo de micelas puro, y a continuación sometido a agitación. El producto final tenía un color naranja muy agradable. El etanol fue evaporado a temperatura ambiente.

60

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la preparación de aglomerados de micelas de proteínas y un agente activo, cuyo método comprende las etapas:
- dispersión de micelas de proteínas de suero de la leche y el agente activo en un disolvente, y
  - evaporar el disolvente,
- 10 de manera que las micelas son obtenidas ajustando el pH de una solución de proteína de suero de la leche natural desmineralizada, con un contenido de proteínas de 0,1% en peso hasta 12% en peso en base al peso, total de la solución, hasta un valor comprendido entre 5,8 y 6,6, y calentando la solución a una temperatura de 80 a 98° C durante 10 segundos hasta 2 horas; de manera que el agente activo es seleccionado entre polifenoles, por ejemplo, café o te verde, licopeno, carotenoides, cafeína, hesperidinas, y cualesquiera mezcla de los mismos.
- 15 2. Método, según la reivindicación 1, en el que el disolvente seleccionado entre agua, disolventes orgánicos, etanol, glicerol, y aceites.
- 20 3. Método, según la reivindicaciones 1 ó 2, en el que el agente activo adopta forma seca antes de la dispersión en un disolvente.
4. Método, según la reivindicaciones 1 ó 2, en el que el agente activo tiene forma líquida antes de dispersión en un disolvente.
- 25 5. Método, según la reivindicación 4, en el que el agente activo es pulverizado en las micelas de proteínas de suero de la leche.
6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaporación es llevada a cabo por secado por evaporación.
- 30 7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo es seleccionado entre componentes sensibles al calor, radiación UV, luz, oxígeno, metales, humedad, y temperatura.
- 35 8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción de micelas con respecto al agente activo está comprendida entre 1:1 hasta 1:1000.
9. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los aglomerados comprenden, como mínimo, un agente activo asociado con micelas de proteínas de suero de la leche.
- 40 10. Método, según la reivindicación 9, en el que los aglomerados son una matriz de micelas de proteínas de suero de la leche que contiene, como mínimo, un agente activo incorporado.
11. Método, según la reivindicación 10, en el que la matriz es un polímero amorfo.
- 45 12. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo está contenido en el aglomerado en una cantidad de 0,1 a 50%.
13. Aglomerado que se puede obtener por un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 50 14. Aglomerado, según la reivindicación 13, en el que los aglomerados y una matriz de micelas de proteínas de suero de la leche que tiene, como mínimo, un agente activo incorporado.
15. Aglomerados, según la reivindicación 14, en los que la matriz es un polímero amorfo.
- 55 16. Aglomerados, según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en los que el agente activo es seleccionado entre polifenoles, por ejemplo, entre café o te verde, licopeno, carotenoides, cafeína, hesperidinas, y mezclas de los mismos.
- 60 17. Un producto alimenticio o cosmético que comprende aglomerados, según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.
18. Utilización de micelas de proteínas del suero de la leche como vehículo para suministrar el agente activo, en la que las micelas son obtenidas por ajuste del pH de una solución de proteínas de suero de la leche natural desmineralizada, que tiene un contenido de proteínas de 0,1% en peso a 12% en peso en base al peso total

de la solución hasta un valor comprendido entre 5,8 y 6,6 y calentado la solución a una temperatura de 80 a 98° C durante un tiempo de 10 segundos hasta 2 horas.

- 5     **19.** Utilización, según la reivindicación 18, en la que las micelas de proteínas del suero de la leche se utilizan como vehículo para el suministro de lípidos.
- 20.** Utilización, según la reivindicación 19, en la que el lípido es seleccionado entre vitaminas liposolubles, antioxidantes o ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
- 10    **21.** Utilización, según las reivindicaciones 18 a 20, para objetivos alimenticios o cosméticos.

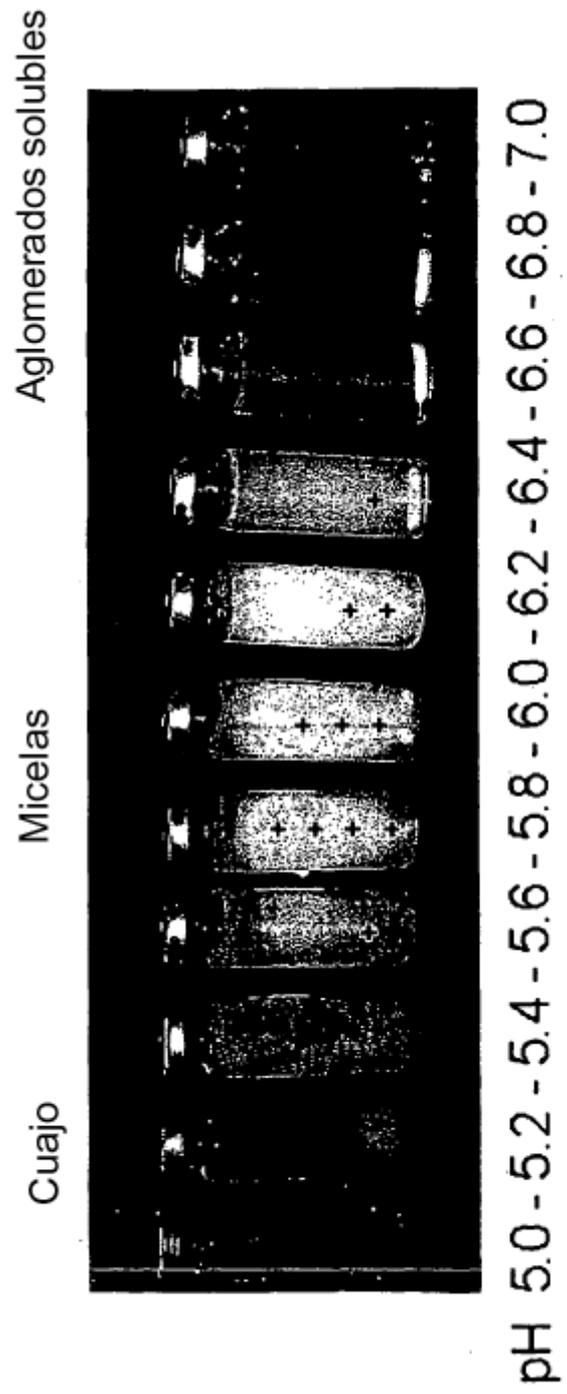


Figura 1

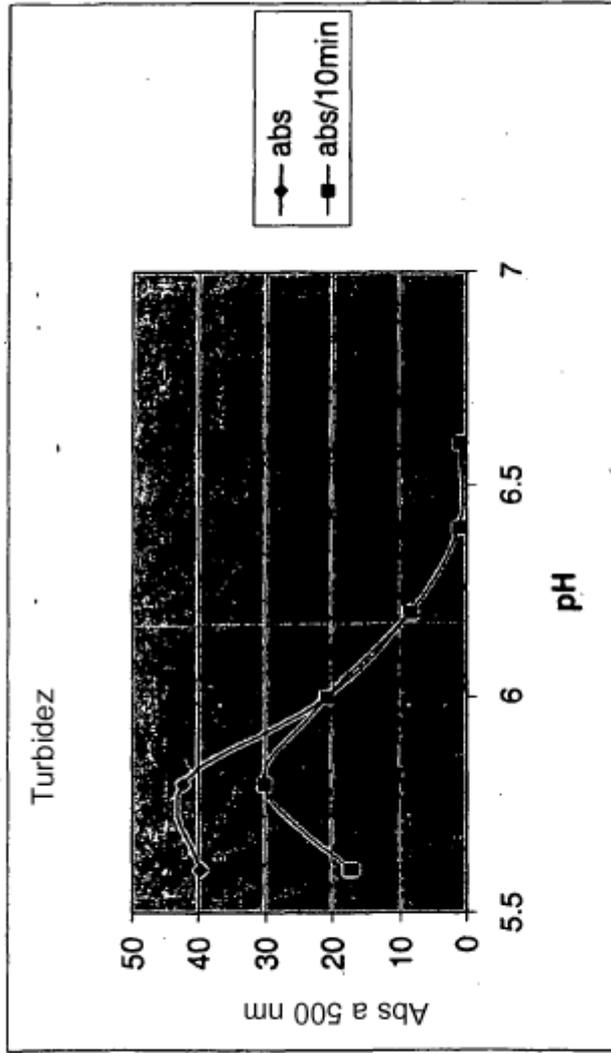


Figura 2

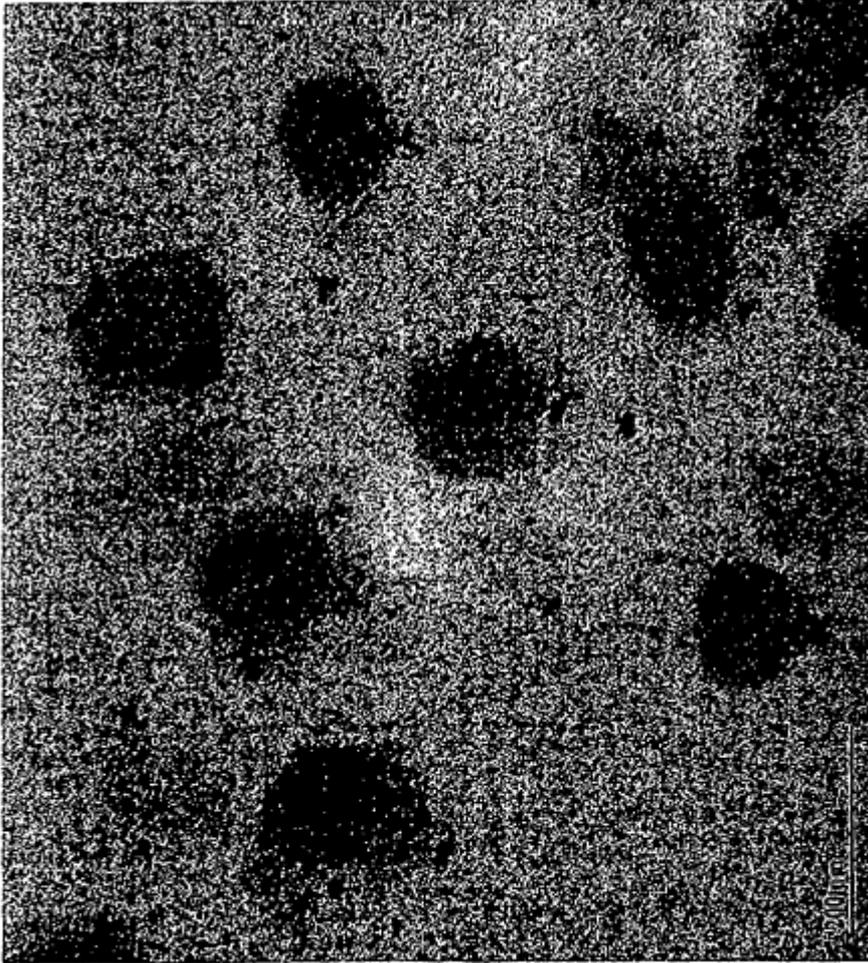


Figura 3

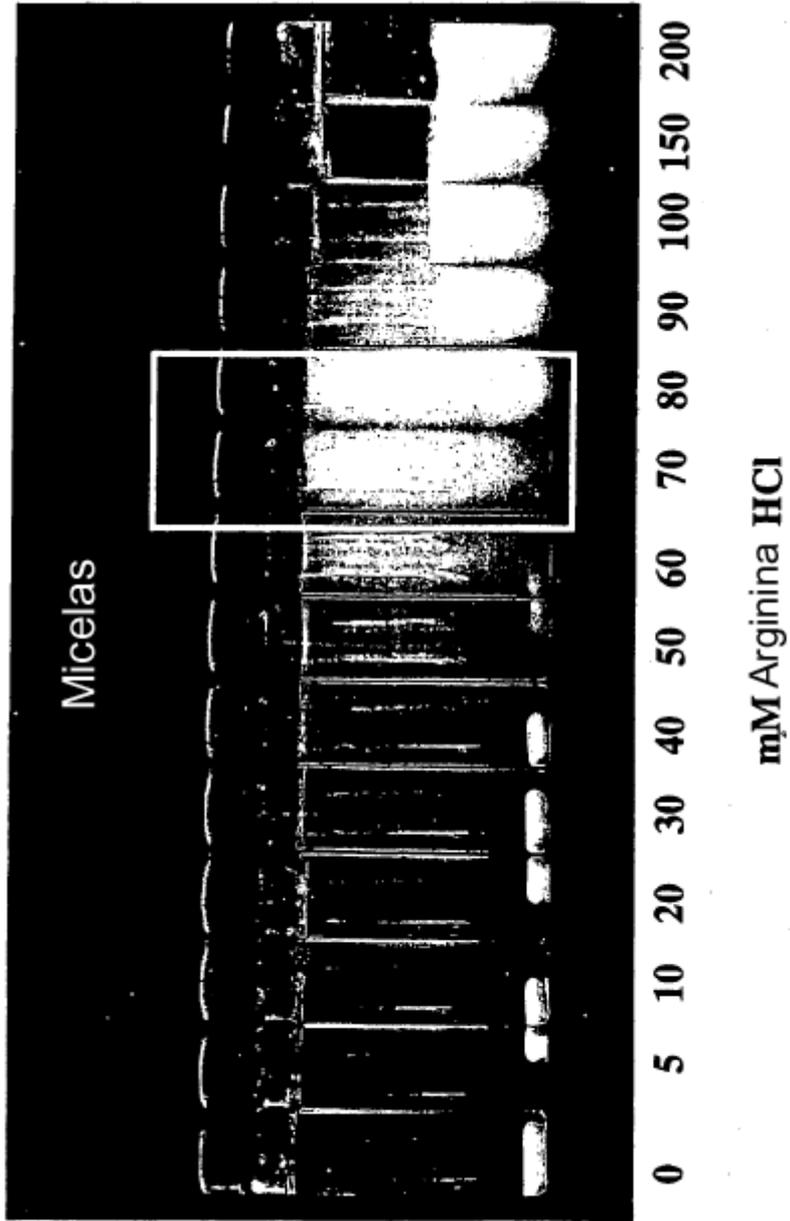


Figura 4

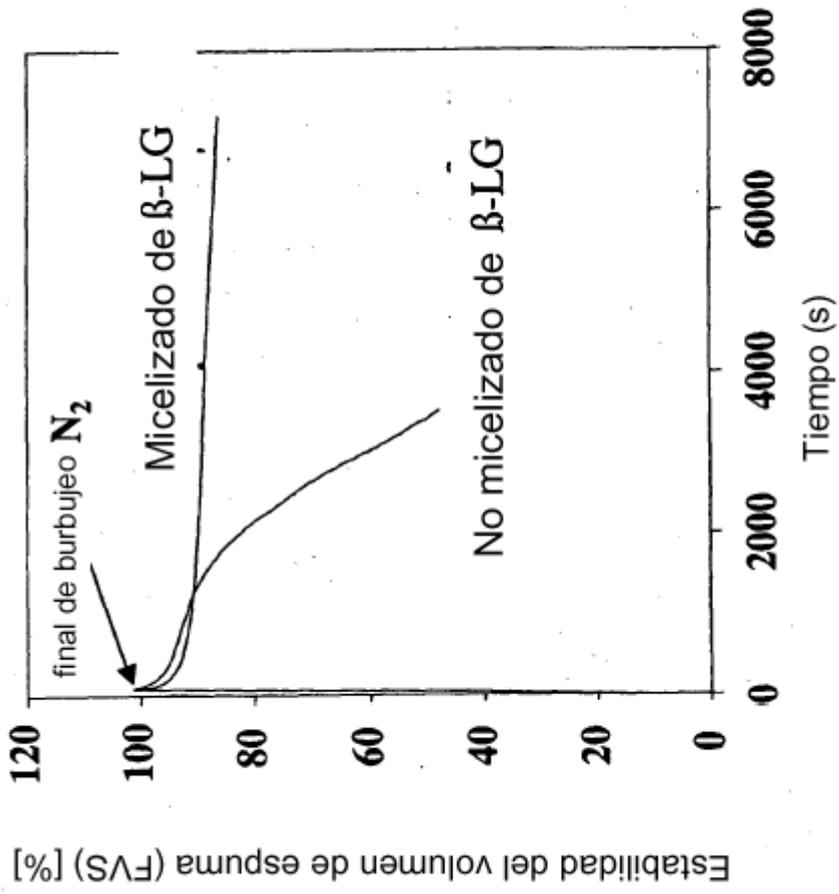


Figura 5

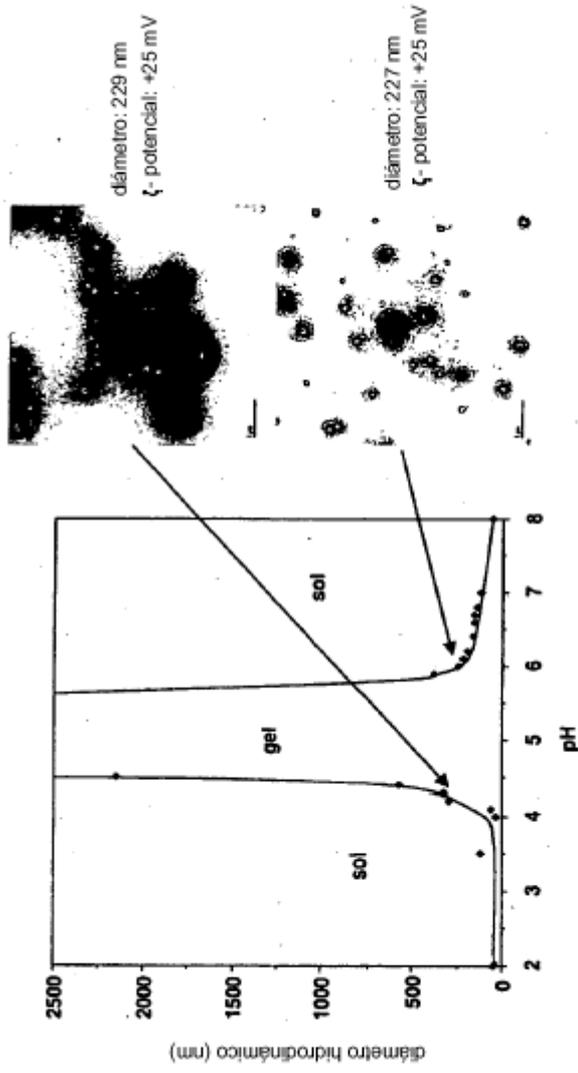


Figura 6

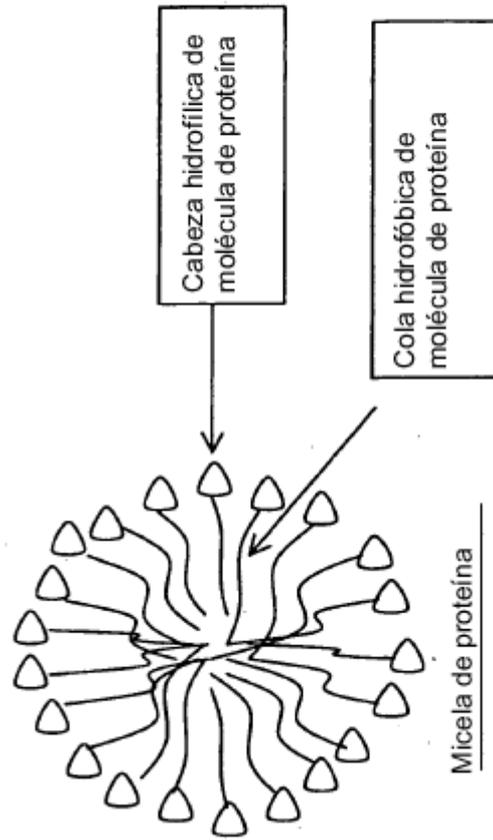


Figura 7

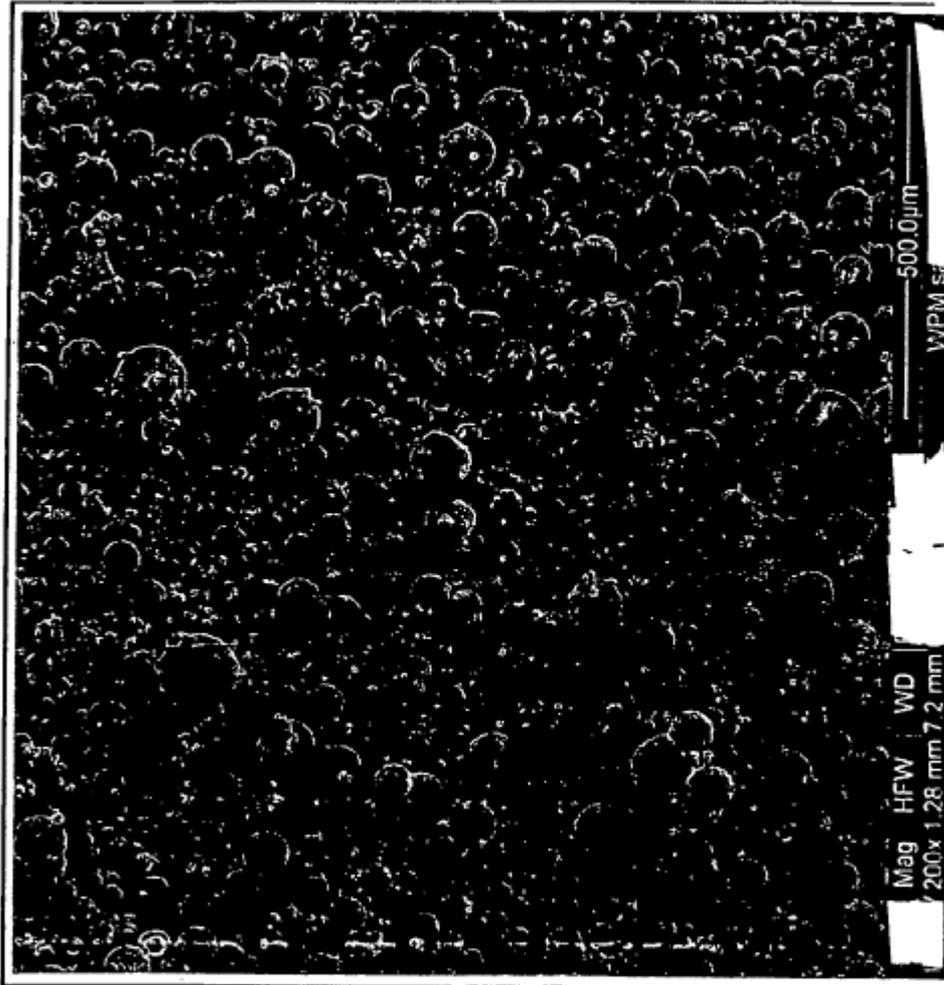


Figura 8

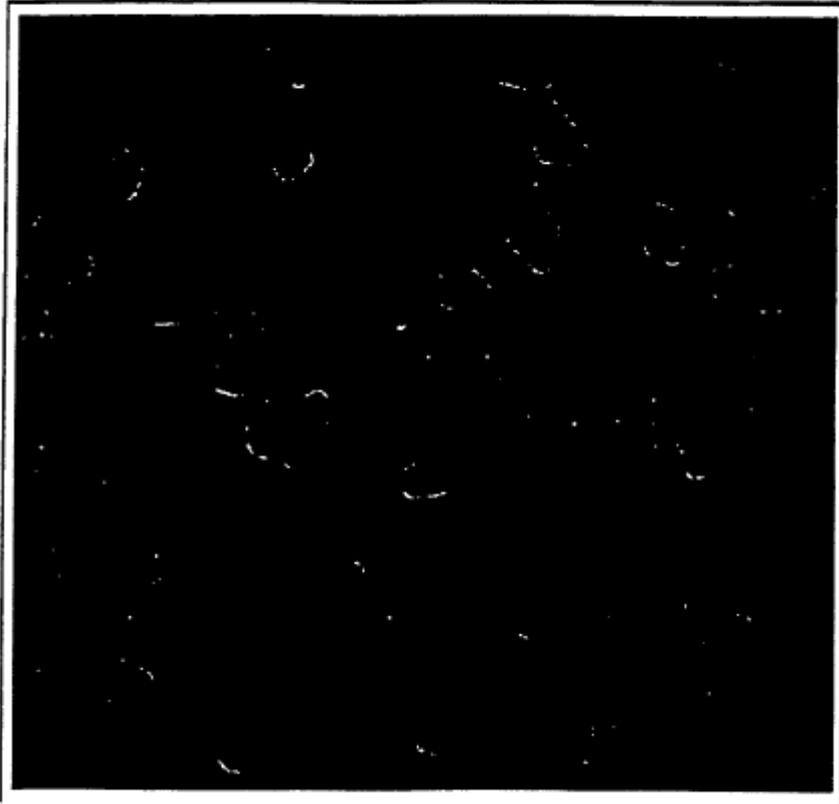


Figura 9

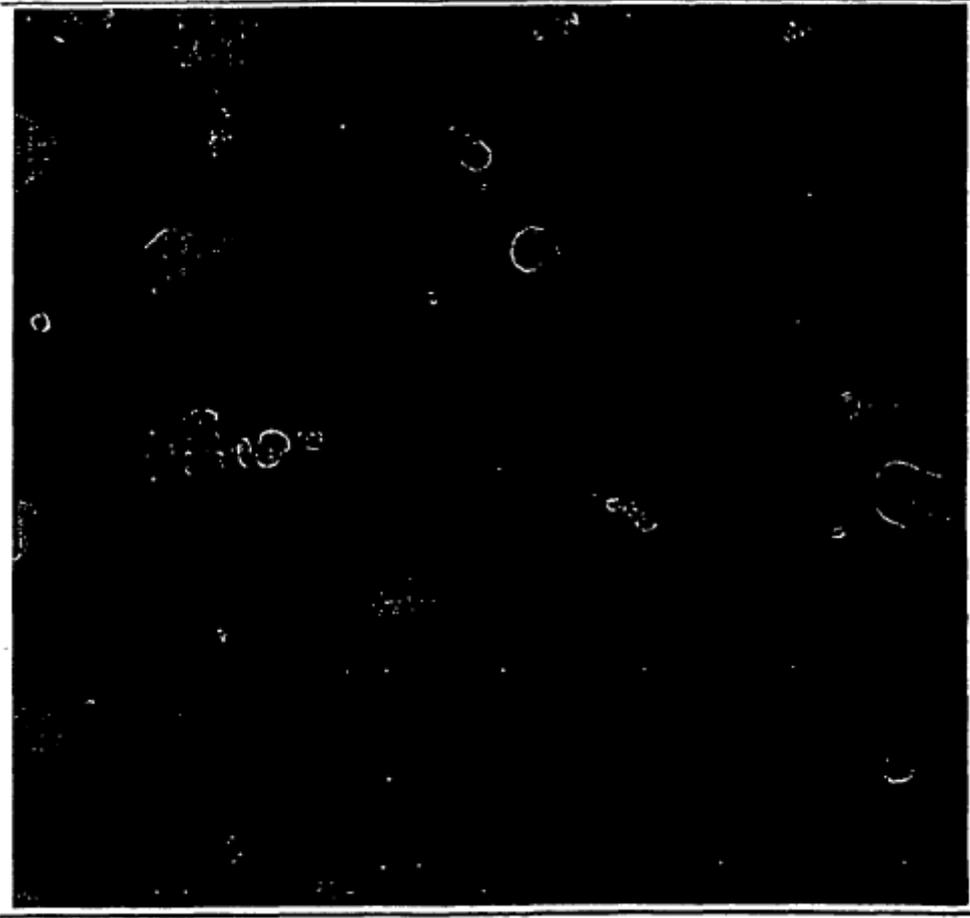
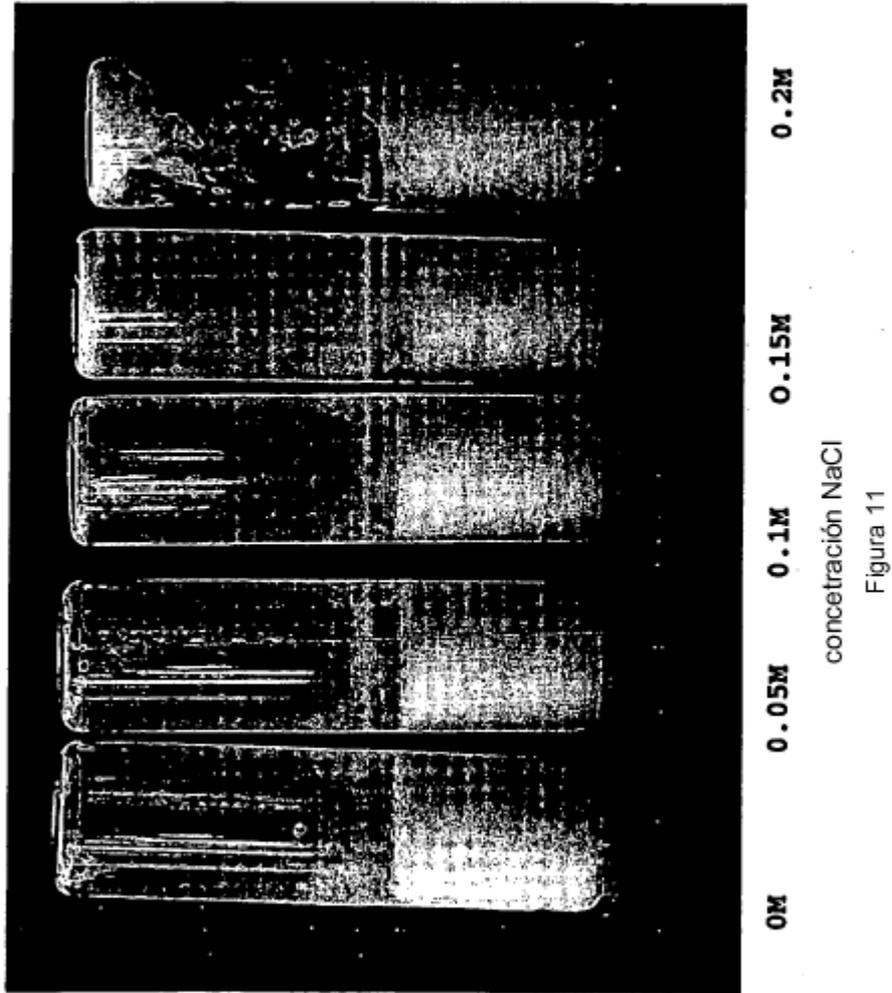


Figura 10



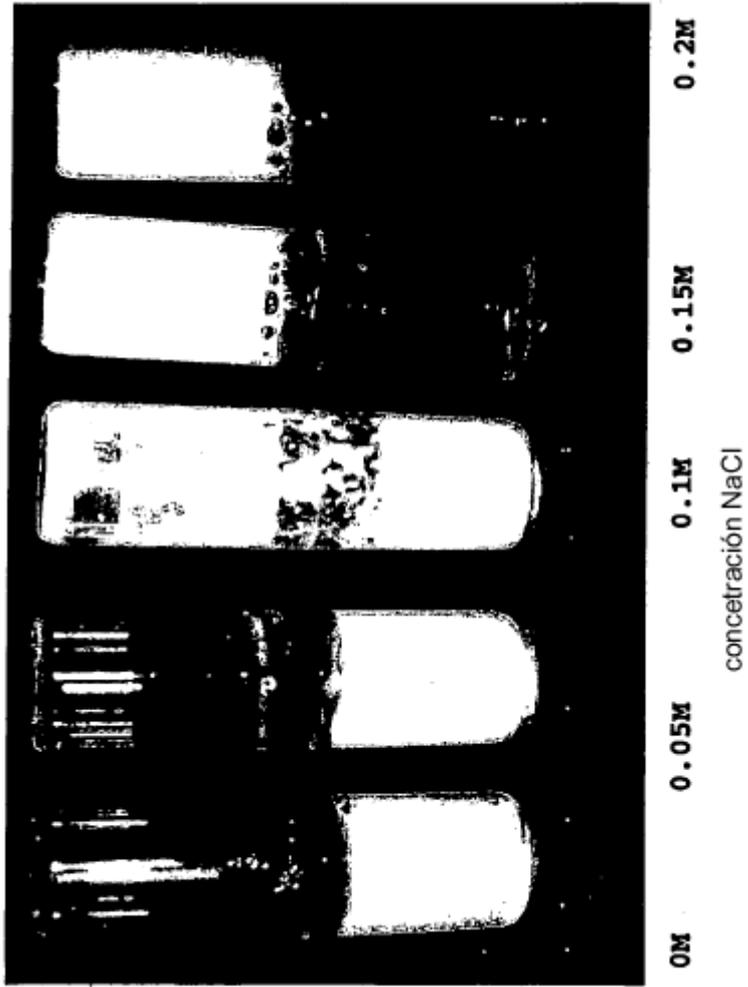


Figura 12

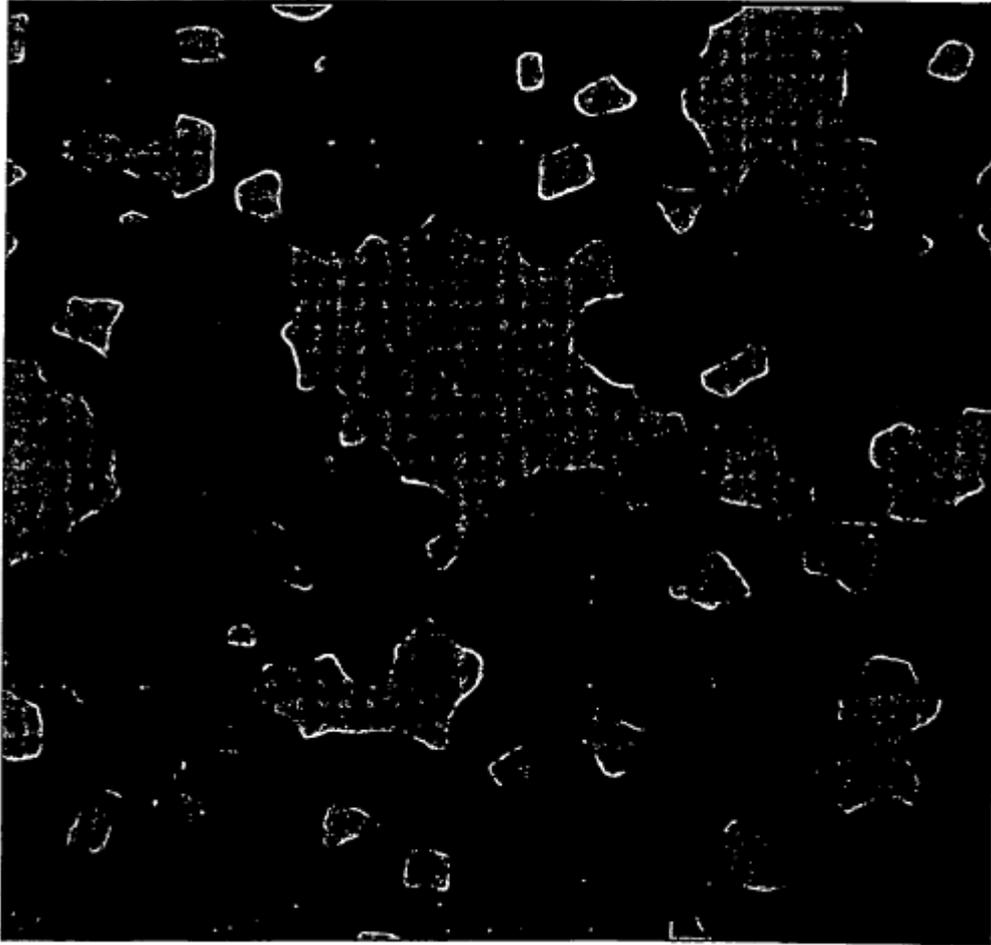


Figura 13

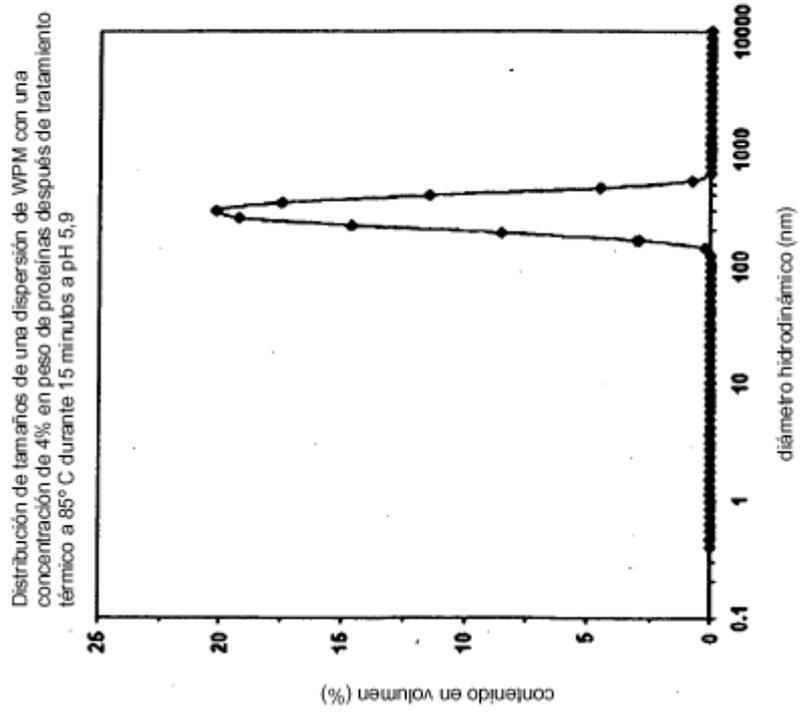


Figura 14

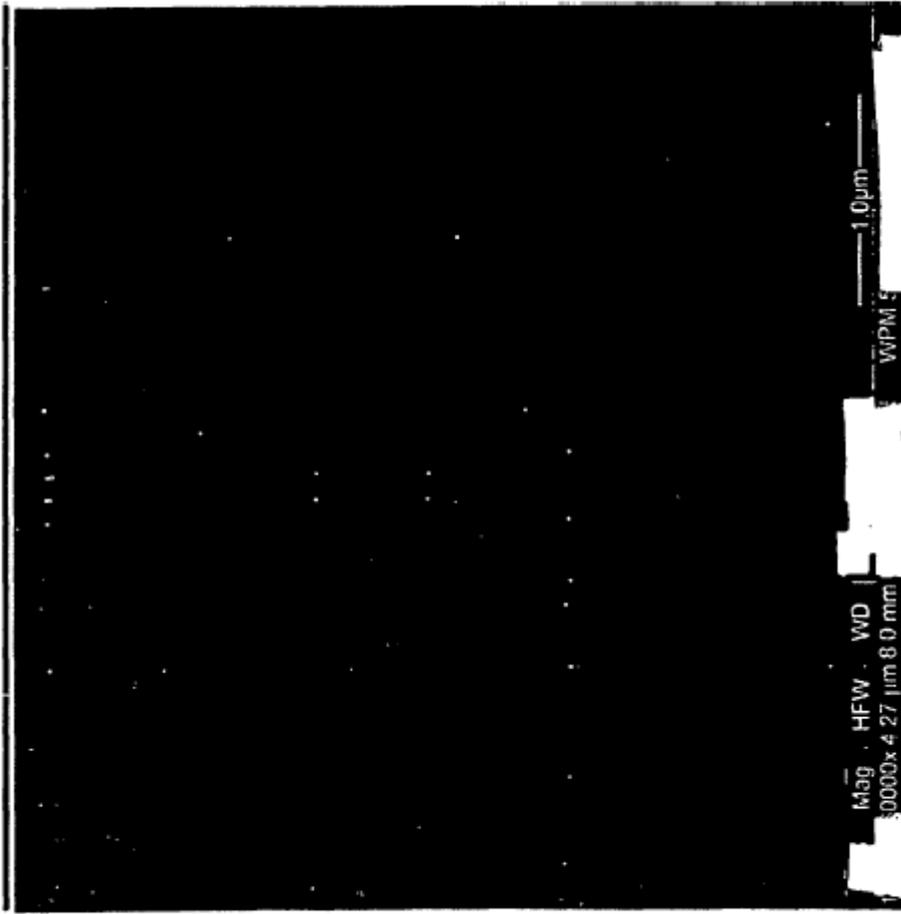


Figura 15

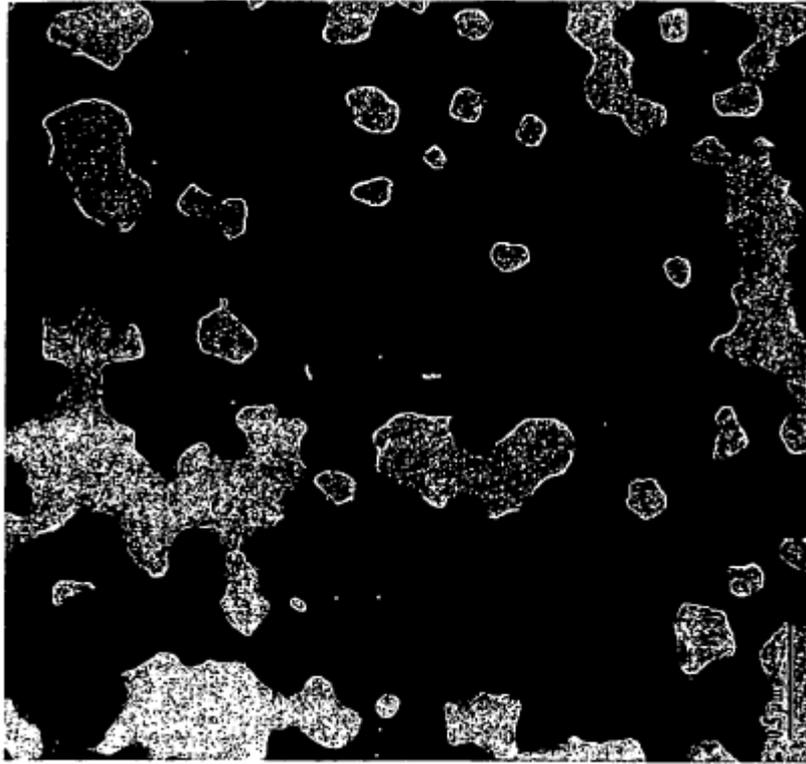


Figura 16

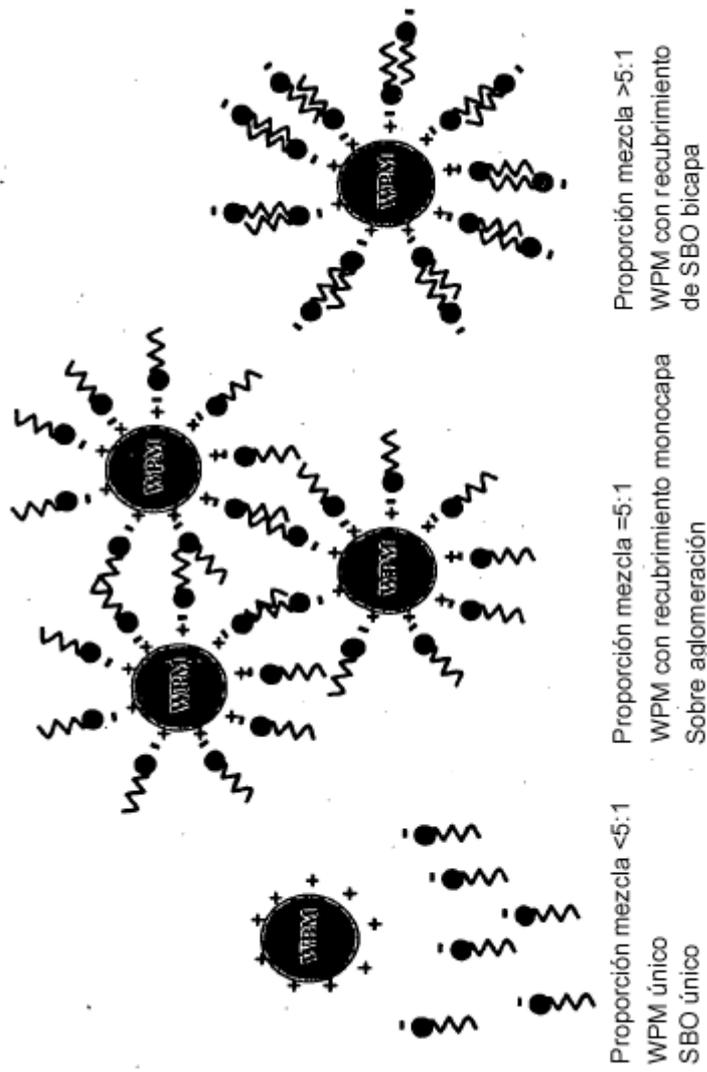


Figura 17

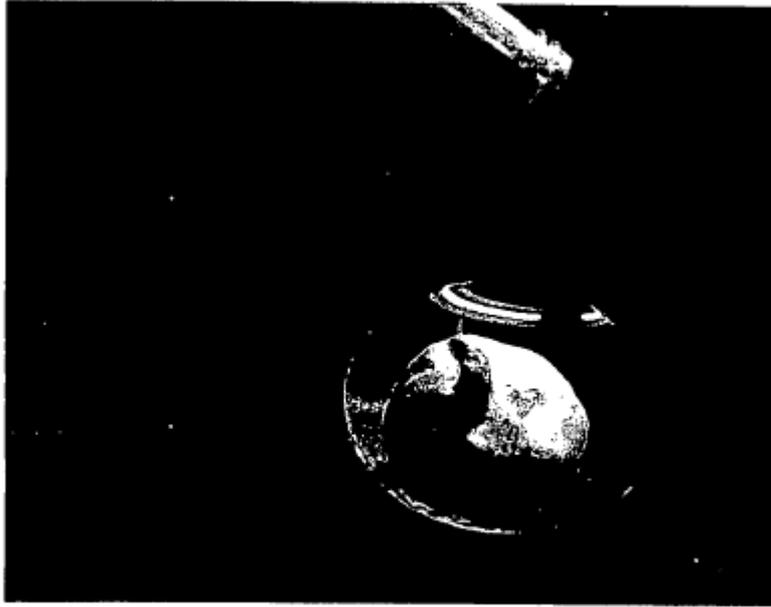


Figura 18