

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

**ESPAÑA** 



11) Número de publicación: 2 373 400

(51) Int. Cl.: A23C 21/00 A23J 1/20

A23J 3/08

(2006.01) (2006.01) (2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Número de solicitud europea: 06006295 .7
- (96) Fecha de presentación: **27.03.2006**
- (97) Número de publicación de la solicitud: 1839492 (97) Fecha de publicación de la solicitud: 03.10.2007
- 54 Título: MICELAS DE PROTEÍNA LÁCTEA.
- (45) Fecha de publicación de la mención BOPI: 03.02.2012
- (73) Titular/es: **NESTEC S.A. AVENUE NESTLÉ 55** 1800 VEVEY, CH
- (45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: 03.02.2012
- (72) Inventor/es:

Schmitt, Christophe J.E.; Bovetto, Lionel; Robin, Frédéric y Pouzot, Matthieu

(74) Agente: Isern Jara, Jorge

# **DESCRIPCIÓN**

Micelas de proteína láctea

#### 5 Sector de la invención

10

15

30

35

55

60

La presente invención, se refiere a micelas de proteínas de suero lácteo, de una forma particular, a concentrados de micelas de proteínas y materias en polvo de suero lácteo de éstas y a un procedimiento para la producción de éstos. La presente invención, pertenece, también, al uso de estos concentrados de micelas y materias en polvo de éstos, en una amplia gama de aplicaciones.

#### Antecedentes y trasfondo de la invención

Las proteínas, constituyen una parte indispensable de las dietas de muchas poblaciones. Éstas se utilizan no únicamente por su valor nutritivo, sino que, además, éstas imparten una textura y estabilización deseables para muchos alimentos. Así, por ejemplo, en los productos que contienen grasas, la grasa, permanece estabilizada a través de la totalidad del tiempo de vida de conservación del producto, de tal forma que no acontece una separación de fases.

Para esta finalidad, se utilizan agentes emulsionantes, los cuales proporcionan una estabilidad de la emulsión, una vez formada ésta, que se basa en su propiedad inherente consistente en el hecho de que, una parte lipofílica o hidrofóbica es soluble en la fase no acuosa y que, una parte polar o hidrofóbica, es soluble en agua, de tal forma que, dichas moléculas, facilitan la emulsión de una fase, en la otra fase. Adicionalmente, además, los agentes emulsionantes, cuidan asimismo de que, una vez se hayan formado las gotitas la fase, no se produzca una agregación o coalescencia. Como agentes emulsionantes, se utilizan emulsionantes de origen natural, tales como las consistentes hidrocoloides, fosfolípidos o glicolípidos o, por otro lado, pueden utilizarse, también, agentes sintéticos tales como los el estearil-2-lactilato o los mono-, di-acilglicéridos, etc.

Uno de los mayores inconvenientes de estos agentes, reside en el hecho consistente en que, éstos, algunas veces, tienen un coste que se añade substancialmente a los costes del producto final, y que no se añaden al valor nutritivo del producto. Algunas veces, tales tipos de materiales, no muestran, tampoco, ningunas propiedades adecuadas de estabilización, debido al hecho de una competencia interfacial con las proteínas.

De una forma incrementante, por lo tanto, la proteína, se utiliza, también, como un emulsionante y como un sustituto parcial para la grasa.

El documento de patente estadounidense US 6 767 575 B1, da a conocer una preparación de un producto agregado de proteína de suero lácteo, en donde, la proteína de suero lácteo, se desnaturaliza mediante acidificación y calentamiento. Los agregados de proteína de esta forma obtenidos, se utilizan en la utilización de productos alimenticios.

40 El documento de patente británica GB 1 079 604, describe mejoras en la fabricación de queso, en donde, las proteínas de suero lácteo, experimentan un tratamiento por calor y un óptimo valor pH, con objeto de obtener proteínas de suero lácteo insolubles, las cuales se añaden, a continuación, a leche cruda.

El documento de patente internacional 93 / 07 761, se refiere a la provisión de un producto de proteínas en forma de micropartículas, el cual puede utilizarse como un sustituto de la grasa.

El documento de patente estadounidense US 5 750 183, da a conocer un procedimiento para producir micropartículas proteináceas, las cuales son de utilidad como sustitutas de la grasa, y que no contienen grasa.

Se da también a conocer un sustituto proteináceo de la grasa, en el documento de patente internacional WO 91 / 17 665, en donde, las proteínas, se encuentran en forma de proteínas de suero lácteo desnaturalizadas y en forma de micropartículas, dispersables en agua.

Aparte de las aplicaciones en alimentos, las proteínas, se encuentran también presentes en muchas composiciones farmacéuticas y cosméticas.

Uno de los problemas involucrados en la producción de productos que contienen proteínas globulares, en general, y de una forma particular, proteínas de suero lácteo, es no obstante su limitada procesabilidad en la producción de productos alimenticios. De hecho, cuando las moléculas de proteína se calientan, o cuando éstas se someten a un entorno medioambiental ácido o alcalino, o cuando éstas se encuentran en presencia de sales, tienden entonces a abandonar su estructura nativa y éstas se reúnen en varias estructuras aleatorias o al azar, tales como, por ejemplo, las consistentes en geles.

La preparación de composiciones acuosas en proteínas de suero lácteo, en forma de geles, es el objeto de docu-65 mento de patente europea EP 1 281 322.

# ES 2 373 400 T3

Elofsson et al., describen, en el Internacional Dairy Journal, 1997, páginas 601 – 608, la gelificación en frío de concentrados de suero de proteína de suero lácteo.

5 De una forma similar, Kilara et al., en Journal of Agriculture and Food 20 Chemistry, 1998, páginas 1830 – 1835, describen el efecto del valor pH, en la agregación de proteínas de suero lácteo, y su gelificación.

Este efecto de gel, presenta una limitación, no únicamente en términos de procesabilidad (como por ejemplo, en el atascamiento de las máquinas utilizadas en la fabricación de productos que contienen proteínas), sino también, en términos de la textura de esta forma obtenida, la cual puede no ser la que se desee, para una amplia gama de aplicaciones de las proteínas.

La desnaturalización controlada de las proteínas, es así, de este modo, un hecho deseable, con objeto de extender el uso de las proteínas.

Erdman, en Journal of American College of Nutrition, 1990, páginas 398 - 409, describe el hecho de que, la calidad de las proteínas en forma de micropartículas, no se ve afectada, a pesar del hecho de utilizar un alto valor de cizallamiento y calor. El documento de patente europea EP 0 603 981, describe, también, una emulsión del tipo aceite en agua, estable al calor.

Los documentos de patente estadounidense US-B1-6 767 575, US-A-5 882 705, US-A-3 644 326 y US 2002/051843, el documentos de patente europea EP-A1-0 779 035, el documento de patente británica GB-A-2 063 273, los documentos de patente europea EP-A1-0 716 810, EP-A1-0 787 436, el documento de patente internacional WO 93/07761 A, el documento de patente europea EP-A1-0 250 623, el documento de patente estadounidense US-A-5 601 760, y De la Fuente M A et al.: "Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins "Trends in food science and technology, - "Avances recientes en la caracterización de proteínas de suero lácteo" Tendencias en la ciencia y tecnología de los alimentos -, Elsevier Science Publishers, GB, volumen 13, nº 8, Agosto de 2002 (2002-08), páginas 262 - 274" dan a conocer procedimientos para la producción de soluciones y composiciones de proteínas de suero lácteo.

El documento de patente internacional WO 2006 / 034 857 A2m el cual representa una técnica correspondiente al arte anterior, según el Art. 54 (3) EPC, y que es relevante en cuanto a la novedad, da únicamente a conocer un procedimiento para la producción de suero lácteo, en forma de partículas (de un tamaño de partícula inferior a 1 µm, partiendo de proteína de suero lácteo exenta de sal, procediendo a ajustar el pH y calentando a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre 80 y 95°C, durante un transcurso de tiempo comprendido entre diez segundos y 30 minutos. La dispersión de nanopartículas, se seca (= se concentra). La concentración de la proteína de suero lácteo en solución es, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 1 y un 40%.

Britten M., en "Heat treatments to improve functional properties of whey proteins in whey": proceedings of the second international whey conference, - Tratamientos de calor para mejorar las propiedades funcionales de proteínas de suero lácteo en el suero lácteo": procedimientos de las segunda conferencia internacional sobre suero lácteo -, realizada en Chicago, USA, en fecha 27 - 29 Octubre 1997, y publicada en las páginas 189 a 196, en el año 1998, da a conocer la preparación de polímeros solubles, procediendo a calentar (90°C – 15 minutos) una dispersión de proteínas de suero lácteo (8% de proteínas), en condiciones neutras o alcalinas (pH = 6,5 – 8,5), en presencia de una baja concentración de calcio (0 - 4 mM).

Así, de este modo, es un objeto de la presente invención, el mejorar la capacidad de uso de las proteínas, en procedimientos industriales de producción.

#### Resumen de la invención

Correspondientemente en concordancia, este objeto, se logra por mediación de los rasgos distintivos de las reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones independientes, desarrollan adicionalmente la idea central de la presente invención.

Las micelas de proteínas de suero lácteo y los productos comestibles que comprenden las citadas micelas, se dan también a conocer aquí.

# 60 Figuras

La presente invención, se describirá adicionalmente, en la parte que sigue de este documento, con referencia a algunas formas preferidas de presentación, las cuales se muestran en las figuras de acompañamiento, en las cuales:

65

50

55

10

15

20

25

30

# ES 2 373 400 T3

La figura 1, muestra el resultado de un experimento que demuestra el efecto del valor pH y del tratamiento de calor, en la micelación de la  $\beta$ -lactoglobulina.

La figura 2, muestra un medio para determinar el valor pH de la micelación, para una preparación comercial (Bipro®, Batch JE032-1-420), utilizando mediciones de la turbidez, a 500 nm.

La figura 3, es un micrográfico TEM (Microscopia electrónica de de transmisión – TEM = del inglés Transmission Electron Microscopy -) micrograph, procedente de micelas de proteínas de suero lácteo (2% en peso, WPI 95, Lactalis) a un valor pH de 7,4. La barra de escala es de 200 nm.

La figura 4, muestra el resultado de una evaluación experimental del impacto de la fuerza iónica (Arginina HCI), en la formación de micelas de proteína, a un valor pH constante de 7,0.

La figura 5, muestra la estabilidad volumétrica (FVS – del inglés, volume stability -) de una espuma estabilizada mediante un porcentaje del 1%, en peso, de micelas de β-lactoglobulina (Davisco), a un valor pH de 7,0, en presencia de Arginina HCl 60 mM, comparada con β-lactoglobulina, no micelada.

La figura 6, muestra el diámetro hidrodinámico equivalente basado en la intensidad, de proteína de suero lácteo, obtenido mediante tratamiento de calor de una dispersión de β-lactoglobulina al 1%, en peso, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 85°C, a un valor pH correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 2 a 8. Las micelas de proteína de suero lácteo, se obtienen a un valor pH de 4,25 (positivamente cargadas con un potencial zeta de aproximadamente +25mV), y a un valor pH de 6,0 (negativamente cargado con un potencial zeta de aproximadamente 30 mV). El diámetro hidrodinámico mediado con Z de las micelas, era el correspondiente a un valor de 229,3 nm, a un valor pH de 4,25, y el correspondiente a un valor de 227,2 nm, a un valor pH de 6,0. Los micrográficos correspondientes de las micelas obtenidas mediante TEM, después de la tinción negativa, se muestran en la figura. Las barras de escala, son de 1 μm.

La figura 7, muestra una estructura altamente esquemática de una micela de suero lácteo.

10

40

- 30 La figura 8, muestra un micrográfico SEM (microscopia de exploración electrónica SEM, del inglés, Scanning electrón microscopy) de una materia en polvo de micelas de proteína de suero lácteo, después de un secado mediante proyección pulverizada (spray), de una dispersión con un contenido de proteína del 20%, después del microfiltrado.
- La figura 9, es un micrográfico TEM (micrografía electrónica de transmisión) de tinción negativa, de una dispersión de proteínas de suero lácteo, obtenido a un contenido de proteínas del 4%).
  - La figura 10, es un micrográfico TEM de tinción negativa, de una dispersión de proteínas de suero lácteo, obtenido a un contenido de proteínas del 20%).
  - La figura 11, muestra la estabilidad al calor de una dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo, obtenida a un contenido de proteínas del 10%, después del microfiltrado, a un valor pH de 7,0, en presencia de NaCl, después del calentamiento a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos.
- La figura 12, muestra la estabilidad al calor de una dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo, obtenida a un contenido de proteínas del 4%, después del microfiltrado, a un valor pH de 7,0, en presencia de NaCl, después del calentamiento a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos.
- La figura 13, es un micrográfico TEM de tinción negativa, procedente de una dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo, a un porcentaje del 4%, basado en un una materia en polvo de micelas de proteínas de suero lácteo, secada mediante proyección pulverizada (spray), después de la dispersión, a una temperatura de 50°C, en agua desionizada.
- La figura 14, es un gráfico que muestra la distribución del tamaño de las micelas obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención, utilizando un 4% de aislamiento de proteína de suero lácteo Prolacta 90, tratado a un valor pH de 5,9.
  - La figura 15, es un micrográfico SEM, que muestra la estructura interna, después de cortar un granulado de materia en polvo secada mediante proyección pulverizada (spray), el cual se presenta en la figura 8.
  - La figura 16, es un micrográfico de tinción negativa de una dispersión de micelas de proteína de suero lácteo, basado en una materia en polvo de proteínas de suero lácteo, pura, secada mediante congelación (liofilizada), después exponerse a la temperatura ambiente, en agua desionizada. La barra de escalas, es de 0,5 micrómetros.

La figura 17, es una vista esquemática de un recubrimiento de WMP mediante SBO (oleato de butilo sulfatado – SBO, del inglés sulphated butyl oleate), después de incrementar el factor de relación de mezcla, a un valor pH de 3,0. Círculo gris: WPM con cambios de superficie positiva. Negro cabeza + cola: cabeza negativamente cargada y cola hidrofóbica procedente del SBO).

La figura 18, es una fotografía de concentrado de micelas de proteína de suero lácteo, a un porcentaje del 20%, después de la evaporación, en el cual se añade un porcentaje del 4% de NaCl.

#### Descripción detallada de la invención

5

10

15

20

25

30

45

55

60

65

La figura 7, es una representación esquemática de las micelas susceptibles de poderse obtener mediante el procedimiento de la presente invención, en donde, las proteínas de suero lácteo, se encuentran dispuestas en un orden de distribución, de tal forma que, las partes hidrofílicas de las proteínas, se encuentren orientadas hacia la parte exterior del aglomerado y que, las partes hidrofóbicas de las proteínas, se encuentren orientadas hacia el "núcleo" interior de la micela. Esta configuración energéticamente favorable, ofrece una buena estabilidad a estas estructuras, en un entorno medioambiental hidrofílico.

La estructura específica de las micelas, puede verse a partir de la figuras, de una forma particular, en las figuras 3, 9, 10, 13 y 15, en donde, las micelas de la presente invención, consisten esencialmente en aglomerados esféricos de proteínas de suero lácteo desnaturalizadas.

Debido a su carácter dual (hidrofílico e hidrofóbico), este estado desnaturalizado de las proteínas, parece permitir la interacción con una fase hidrofóbica, como por ejemplo, una gotita de grasa o de aire, y una fase hidrofóbica. Las micelas de proteína de suero lácteo, tienen así, por lo tanto, unas propiedades perfectas de emulsión y de espumación

Adicionalmente, además, las micelas producidas por el procedimiento de la presente invención, tienen una distribución del tamaño de partícula extremadamente afinada (véase la figura 14), de tal forma que, más de un porcentaje correspondiente a un 80% de las micelas producidas, tendrán un tamaño menor de 1 micrómetro, teniendo éstas, de una forma preferible, un tamaño correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 100 nm y 900 nm, de una forma más preferible, entre 100 y 770 nm y, de una forma mayormente preferible, entre 200 y 400 nm.

El diámetro medio de las micelas, puede determinarse utilizando microscopia electrónica de transmisión (TEM). Con objeto de proceder de este modo, las muestras líquidas de micelas, se encapsulan en tubos de gel de agar. La fijación, se lleva a cabo mediante la inmersión en una solución de 2,5% glutaraldehído en un tampón de cacodiato 0,1 M, y una post-fijación con tetraóxido de osmio al 2%, en el mismo tampón, conteniendo, ambos soluciones, un porcentaje del 0,04% de rojo rutenio. Después de la deshidratación en una serie graduada de etanol (70, 80, 90, 96, 100% de etanol), las muestras, se embeben en resina Spurr (Spurr / etanol 1 : 1, 2 : 1, 100%. Después de la polimerización de la resina (70%, 48 horas), se cortas secciones finas y ultra-finas, con un dispositivo del tipo "Leica ultracut UCT ultra-microtome". Las secciones ultra-finas, marcadas con acetato de uranilo acuoso, y citrato de plomo, se examinan, a continuación, mediante microscopia electrónica de transmisión (Philips CM12, 80 kv).

Sin pretender ligarlo a ninguna teoría, se cree que, durante la formación de las micelas en concordancia con el procedimiento de la presente invención, las micelas alcanzan un tamaño "máximo", debido a carga electrostática total de la micela que repele cualquier molécula de proteína adicional, de tal forma que, la micela, no pueda ya crecer más en tamaño. Esto, cuenta para la estrecha distribución del tamaño observada (compárese con la figura 14).

Las micelas descritas anteriormente, arriba, se producen mediante un procedimiento en concordancia con la presente invención, describiéndose, dicho procedimiento, en detalle, en la parte que sigue de este documento.

Como proteína de suero lácteo a ser utilizada en el presente procedimiento, pueden utilizarse cualesquiera aislamientos o concentrados de proteína de suero lácteo comercialmente disponibles en el mercado, a saber, proteína de suero lácteo obtenida mediante cualquier procedimiento para la preparación de proteína de suero lácteo conocido en el arte especializado de la técnica, así como las fracciones de proteínas preparadas a partir de ésta, o proteínas tales como la β-lactoglobulina (BLG), la α-lactoalbúmina, y la albúmina de suero lácteo. De una forma particular, el suero lácteo dulce, como sub-producto, en la fabricación de quesos, suero lácteo ácido (ácido láctico) del suero lácteo obtenido como sub-producto en la fabricación de la caseína, suero lácteo nativo obtenido mediante la microfiltración, o cuajo (requesón) de suero lácteo obtenido como sub-producto en la fabricación de caseína de requesón, pueden ser utilizados como fuentes de proteína. La proteína de suero lácteo, puede ser de una fuente individual o puede proceder de mezclas de cualesquiera fuentes.

La presente invención, no está restringida a aislamientos de suero lácteo de origen bovino, sino que, ésta, pertenece a aislamientos de suero lácteo procedentes de todas las especies de animales mamíferos, tales como ovejas, ca-

bras, caballos y camellos. El procedimiento en concordancia con la presente invención, se aplica a las preparaciones de suero lácteo desmineralizado.

Las proteínas de suero lácteo, son una excelente fuente de aminoácidos (AA) esenciales (45%). Comparadas con la caseína (que contiene 0,3 g de cisteína / 100 g de proteína), las proteínas de suero lácteo, contienen 7 veces más de cisteína, y el ácido de suero lácteo (ácido láctico), contiene 10 veces más de cisteína. La cisteína, es el aminoácido que limita para la síntesis del glutation (GSH), un tripéptido compuesto por cisteína glutamato y glicina, que tiene unas funciones primarias importantes en la defensa del cuerpo en el caso de estrés. Los requerimientos de los aminoácidos pueden incrementarse en el caso del estrés y en la población de avanzada edad. Asimismo, también, la suplementación oral del glutatión con proteína de suero lácteo, ha mostrado incrementar los niveles de GSH en plasma, de los pacientes infectados con HIV (Eur. J. Clin. Invest. 2001; 31, 171 – 178).

Otros beneficios para la salud proporcionados por las proteínas de suero lácteo, incluyen la mejora del desarrollo y del fortalecimiento del los músculos, así como el mantenimiento muscular, en los niños, en los adultos o en la población de edad avanzada, la mejora de la función inmune, la mejora de la función cognitiva, el control de la glucosa en sangre, de tal forma que, éstas, son apropiadas para los diabéticos, el control del peso y de la saciedad, los efectos anti-inflamatorios, la curación de las heridas y la reparación de la piel, reducción de la presión sanguínea, etc.

Las proteínas de suero lácteo, tienen un mejor factor de eficiencia de la proteína (PER = 118), comparado, por ejemplo, con la caseína (PER = 100). El PER, es una medida de una calidad de la proteína, asistida mediante la determinación consistente en de qué forma (qué bien), dicha proteína soporta una ganancia de peso. Éste puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

PER = crecimiento del peso corporal (g) / ingesta en peso de proteína (g).

25		•	
	Ejemplos:	PER	% Caseína
	Caseína	3,2	100
	Huevo	3,8	118
	Suero lácteo	3,8	118
30	Soja entera	2,5	78
	Gluten de trigo	0,3	9

10

15

35

40

45

50

55

60

65

Para el procedimiento de la presente invención, las proteínas de suero lácteo, pueden encontrarse presentes, en una solución acuosa, en una cantidad correspondiente a un porcentaje inferior a un 12%, en peso, de una forma preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0,1%, en peso, hasta menos de un 12%, en peso, preferiblemente, en una cantidad que va desde un 0,1%, en peso, hasta un 8%, en peso, de una forma más preferible, en una cantidad que va desde un 0,2%, en peso, hasta un 7%, en peso, de una forma todavía más preferible, en una cantidad que va desde un 0,5%, en peso, hasta un 6%, en peso, de una forma mayormente preferible, en una cantidad que va desde un 1%, en peso, hasta un 4%, en peso, en base al peso total de la solución.

La solución acuosa de la preparación se proteína de suero lácteo, tal y como se encuentra ésta presente antes de la etapa de micelación, puede también comprender compuestos adicionales, tales como sub-productos de los respectivos procedimientos de producción de suero lácteo, distintos de las proteínas, gomas o hidratos de carbono. La solución, puede también comprender otros ingredientes (grasas, hidratos de carbono, extractos de plantas, etc.). La cantidad de tales tipos de compuestos adicionales,, no debe exceder de un porcentaje del 10%, en peso, del peso total de la solución.

La proteína de suero lácteo, así como las fracciones y / o las proteínas principales de ésta, puede utilizarse en forma purificada. En concordancia con una forma preferida de presentación, el contenido de cationes divalentes, en la proteína de suero lácteo, para la preparación de concentrado de micelas de proteína de suero lácteo, debe ser el correspondiente a un porcentaje inferior a un 2,5%, en peso, de una forma más preferible, inferior a un porcentaje del 2%, y todavía de una forma más preferible, inferior a u n porcentaje del 0,2%. De la forma mayormente preferible, las proteínas de suero lácteo, se encuentran completamente desmineralizadas.

En concordancia con el presente descubrimiento, el valor pH y la fuerza iónica, son importantes factores en el presente procedimiento. Así, de este modo, para muestras extensamente dializadas que se encuentran virtualmente desprovistos o mermados de cationes libres, tales como Ca, K, Na, Mg, se ha encontrado que, cuando se realiza el tratamiento de calor, durante un transcurso de tiempo de 10 segundos a 2 horas, a un valor pH por debajo de 5,4, se obtiene cuajada, mientras que, a un valor pH que exceda de 6,8, se tiene como resultado proteína de suero lácteo, soluble (véase la figura 1). Así, de este modo, sólo en esta gama de valores pH, más bien estrecha, se obtendrán micelas de proteínas de suero lácteo que tengan un diámetro correspondiente a un valor inferior a 1 µm. Estas micelas, tendrán una carga total negativa. La misma forma de micela, puede también obtenerse simétricamente por debajo del valor pH isoeléctrico, es decir, de 3,5 a 5,0 y, de una forma más preferible, de 3,8 a 4,5, dando como resultado micelas que se encuentran positivamente cargadas (véase la figura 6).

Así, de este modo, en concordancia con una forma de presentación de referencia, con objeto de obtener micelas positivamente cargadas, puede llevarse a cabo una micelación de proteínas de suero lácteo, en una solución libre de sales, a un valor pH ajustado a un nivel comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3,8 y 4,5, en dependencia del contenido de minerales de la fuente de proteínas.

En concordancia con la presente invención, las micelas obtenidas, tendrán una carga total negativa, Así, de este modo, en una forma de presentación de referencia, el pH, se ajusta a un valor comprendido dentro de unos márgenes que va de 6,3 a 9,0, para un contenido de cationes divalentes comprendido entre un 0,2% y un 2,5%, en una proteína de suero lácteo en polvo.

10

15

20

25

30

35

40

55

60

A título de referencia, para obtener micelas negativamente cargadas, el pH, se ajusta a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 5,6 a 6,4, ajustándose éste, de una forma más preferible, a un valor comprendido dentro de unos márgenes que va de 5,8 a 6,0, para un reducido contenido de cationes divalentes (por ejemplo, para un contenido inferior a un porcentaje del 0,2% de la materia en polvo de proteína del suero lácteo inicial). El pH, puede aumentarse a un valor de 8,4, dependiendo del contenido de mineral de la fuente de proteína de suero lácteo (concentrado o aislamiento). De una forma particular, el pH, puede ser el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 7,8 a 8,4, situándose éste, de una forma preferible, dentro de unos márgenes que van de 7,6 a 8,0, para obtener micelas negativamente cargadas, en presencia de grandes cantidades de minerales libres y, el pH, puede ser el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 6,4 a 7,4, situándose éste, de una forma preferible, dentro de unos márgenes que van de 7,4 a 7,4, para obtener micelas negativamente cargadas, en presencia de moderadas cantidades de minerales libres. Como regla general, cuanto mayor es el contenido de calcio y / o de magnesio de la materia en polvo de proteína de suero lácteo, mayor es el valor pH de la micelación.

En concordancia con la presente invención, se requiere desmineralizar, mediante cualquiera de las técnicas conocidas de desmineralización (diálisis, ultrafiltración, osmosis inversa, cromatografía de intercambio de iones...), cualquier fuente de proteínas de suero lácteo nativa, líquida, con una concentración de proteínas correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes correspondientes a un valor que va desde el del suero lácteo dulce, del permeado de la leche o del suero lácteo ácido (ácido láctico) (0,9% de contenido de proteína), al de un concentrado a contenido de proteína del 30%. La diálisis, puede realizarse con agua (destilada, desionizada o blanda), pero como que, esto sólo permitirá la eliminación de los iones débilmente unidos a las proteínas de suero lácteo, es más preferible el dializar con un ácido a un valor pH que sea inferior a 4,0 (orgánico o inorgánico), para el mejor control de la composición iónica de las proteínas. En concordancia con la presente invención, el pH de la formación de micelas de proteínas de suero lácteo, será el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 5,8 a 6,6.

Previamente a proceder al calentado de la solución acuosa de proteína de suero lácteo, el valor pH, se ajusta, generalmente, mediante la adición de ácido, el cual, de una forma preferible, es del grado alimenticio, tal como, por ejemplo, el ácido clorhídrico, el ácido fosfórico, el ácido acético, el ácido cítrico, el ácido glucónico, ó el ácido láctico. Cuando el contenido de minerales es alto, el valor pH, se ajusta, generalmente, mediante la adición de una solución alcalina, la cual es, de una forma preferible, de grado alimenticio, tal como el hidróxido sódico, el hidróxido potásico o el hidróxido amónico.

De una forma alternativa, si no se desea una etapa de ajuste del valor pH, es posible el proceder a ajustar la fuerza iónica de la preparación de proteína de suero lácteo, manteniendo constante el valor pH. Entonces, la fuerza iónica, puede ajustarse mediante iones orgánicos o inorgánicos, de tal forma que, ésta permita la micelación de un valor pH constante de 7. La figura 4, representa una forma de presentación de la presente invención, en donde, las micelas, pueden formarse a un valor constante de 7,0, mientras que, la fuerza iónica, se varía mediante la adición de arginina HCI 70 – 80 mM.

Adicionalmente, además, puede añadirse un tampón, a la solución acuosa de proteína de suero lácteo, de tal forma que se evite una carga substancial del valor pH, durante el tratamiento de calor de la proteína de suero lácteo. En principio, el tampón, puede seleccionarse a partir de cualquier sistema tampón de grado alimenticio, a saber, el ácido acético o sus sales, tales como, por ejemplo, el acetato sódico o el acetato potásico, el ácido fosfórico y las sales de éste, como por ejemplo, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ó el ácido cítrico y las sales de éste, etc.

El ajuste del valor pH y de la fuerza iónica de la solución acuosa, en concordancia con la presente invención, tiene como resultado un procedimiento controlado que proporciona micelas que tienen un tamaño correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 100 nm – 900 nm, de una forma preferible, de 100 nm – 700 nm y, de una forma mayormente preferible, . De una forma preferible, la proporción de micelas con un tamaño medio comprendido dentro de unos márgenes de 100 nm -700 nm, es mayor de un porcentaje del 80%, cuando se lleva a cabo el procedimiento de la invención (véase la figura 14).

En una segunda etapa del procedimiento de la presente invención, la solución acuosa de partida de proteína de suero lácteo, se somete, a continuación, a un tratamiento de calor. A este respecto, se ha encontrado el hecho de que, para la obtención de micelas de proteína, es importante el tener una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 80 a 89°C, siendo ésta, de una forma más preferible, de un valor que va de 84°C a 87°C, y de una forma mayormente preferible, de 85°C.

Una vez se ha alcanzado la temperatura deseada, ésta de mantiene a esta temperatura, durante un transcurso de tiempo mínimo de 10 segundos y un máximo de 2 horas. De una forma preferible, el transcurso de tiempo durante el cual la solución acuosa de proteína de suero lácteo se mantiene a la temperatura deseada, es el correspondiente a período de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van de 12 a 25 minutos, siendo éste, de una forma más preferible, de 12 a 20 minutos, o de una forma mayormente preferible, de aproximadamente 15 minutos.

El tratamiento de calor, puede también realizarse en un horno microondas o en un equipo similar que permita el calentamiento por microondas, con una factor de relación tiempo / calidad, correspondiente a una valor de 10 s / 10 ml, para una solución de proteína al 4%, calentada en un aparato de una potencia de 1500 W, hasta la temperatura de ebullición (98°C, en una altitud de 833 m). Pude también procederse a la utilización de un procedimiento continuo, mediante la utilización de 8 ó más magnetrones, alrededor de un tubo de gas, potencialmente prolongado mediante un tubo de sostenimiento, para incrementar el tiempo de incubación.

Tal y como se muestra en la figura 2, las mediciones de turbidez son una indicación de la formación de micelas. En concordancia con la presente invención, la medición de la turbidez mediante absorbancia, a 500 nm, es de por lo menos 3 unidades de absorbancia para una solución de proteína al 1%, pero ésta puede alcanzar un valor de 16 unidades de absorbancia, cuando el rendimiento productivo de la micelación, es el correspondiente a una valor que se encuentre por encima de un 80% (véase la figura 2).

Con objeto de ilustrar adicionalmente el efecto de la formación de micelas, desde un punto de vista físico-químico, se procedió a calentar una dispersión de Bipro®, al 1% en peso, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 85°C, a unos valores pH de 6,0 y 6,8, en agua MilliQ. El diámetro hidrodinámico de los agregados obtenidos después del tratamiento de calor, se midió mediante dispersión dinámica de la luz. El peso molecular aparente de los agregados, se determinó mediante dispersión estática de la luz, utilizando el denominado "trazado de Debye". La hidrofobicidad superficial, se comprobó utilizando la sonda de ANS hidrofóbica, y los grupos tiol accesibles, se determinaron mediante el procedimiento de de DTNB, utilizando cisteína como aminoácido estándar. Finalmente, se estudió la morfología de los agregados, mediante TEM de tinción negativo. Los resultados obtenidos, se presentan en la tabla 1.

# Tabla 1:

10

15

30

35

40

Propiedades físico-químicas de agregados de proteína solubles, obtenidos mediante tratamiento de calor (85°C, 15 minutos) de una dispersión de proteína al 1%, en peso, en presencia o en ausencia de NaCl.

рН	Diámetro hidrodiná- mico (mm)	Peso mole- cular M <sub>w</sub> (10 <sup>6</sup> g mol <sup>-1</sup> )	Morfología	Potencial ζ (mV)	Hidrofobicidad superficial de la proteína (µg.mmol <sup>-1</sup> ANS)	Grupos SH accesibles (nmol SH.mg <sup>-1</sup> prot.)
6,0	120,3 ± 9,1	27,02 ± 8,0	Micelas esféricas	-31,8 ± 0,8	105,4	$3.5 \pm 0.4$
6,8	56,2 ± 4,6	0,64 ± 0,01	Agregado lineal	-27,9 ± 1,2	200,8	6,8 ± 0,5

A raíz de la tabla 1, queda claro el hecho de que, las micelas de proteína de suero lácteo que se formaron a un valor pH de 6,0, permiten que la proteína reduzca su hidrofobicidad de superficie ANS específica, en un factor de 2, comparado con la proteína de suero lácteo no micelada, calentada en la misma condición, pero a un valor pH de 6,8. La formación de micelas, puede también verse en el peso molecular muy alto de  $27 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>, comparado con el de  $0.64 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>, para la proteína no micelada, indicado un estado muy condensado de la materia, en el interior de la micela (reducido contenido de agua). De una forma lo suficientemente interesante, el potencial  $\zeta$  de las micelas, es incluso más negativo que el de las proteínas no miceladas, incluso en el caso de que éstas últimas se hayan formado a un valor pH más básico que las micelas. Esto es el resultado de que una superficie más hidrológica de las micelas, se encuentre expuesta al disolvente. Finalmente, debería prestarse especial atención en cuanto al hecho de que, la reactividad del tiol de las micelas, es mucho menor que de las proteína no micelada, debido a diferente valor pH del tratamiento de calor.

Se ha encontrado el hecho de que, el grado de conversión de la proteína de suero lácteo nativa a micelas, decrece, cuando la concentración inicial de las proteínas se incrementa, antes del ajuste del valor pH y del tratamiento con calor. Así, por ejemplo, cuando se inicia con un aislamiento de proteína de suero lácteo del tipo Prolacta 90 (lote 673 de Lactalis), el rendimiento productivo correspondiente al grado de formación de la proteína de micelas, desciende,

en un rendimiento productivo que va desde el 85% (cuando se inicia con un 4% de proteínas), hasta un rendimiento productivo del 50% (cuando se inicia con un 12% de proteínas). Con objeto de maximizar la formación de micelas de proteína de micelas de proteína de suero lácteo (> 85% del contenido inicial de proteína), es mejor empezar con una solución acuosa de proteína de suero lácteo, el cual tenga una concentración correspondiente a un porcentaje por debajo del 12%, de una forma preferible, por debajo del 4%. Dependiendo de las aplicaciones finales pretendidas, la concentración de proteína, se ajusta antes del tratamiento de calor, con objeto de poder controlar el rendimiento productivo óptimo de las micelas de proteína de suero lácteo.

Las micelas de proteínas de suero lácteo obtenidas en concordancia con el presente procedimiento, deberán tener un tamaño medio correspondiente a un valor de 1 µm, de una forma preferible, de 100 a 900 nm, de una forma más preferible, de 100 a 700 nm, y de una forma mayormente preferible, de 200 – 400 nm.

15

20

30

35

55

65

Dependiendo de la aplicación que se desee, el rendimiento productivo de las micelas, antes de la concentración, es de un porcentaje de por lo menos un 35%, siendo éste, de una forma preferible, de por lo menos un 50%, de una forma más preferible, de por lo menos un 80%, y los agregados solubles residuales o contenido de proteína soluble es, de una forma preferible, de un porcentaje que se encuentra por debajo de un 20%. El tamaño medio de las micelas, se caracteriza por un índice de polidispersión inferior a 0,200. Como consecuencia de ello, la suspensión blanca obtenida mediante el procedimiento de la presente inversión, es estable, y tiene una apariencia lechosa, en una amplia gama de márgenes del valor pH, siendo ésta la correspondiente a un valor de 2 – 8. Se ha observado el hecho de que, las micelas de proteína de suero lácteo, podrían formar agregados de un valor pH de alrededor de 4,5, y no obstante, sin signos de una separación macroscópica de fases, después de un transcurso de tiempo de por lo menos 12 horas, a una temperatura de 4°C.

La pureza de la proteína de suero lácteo producida en concordancia con el procedimiento de la presente invención, puede obtenerse procediendo a determinar la cantidad de proteínas solubles residuales. Las micelas, se eliminan mediante centrifugación, a una temperatura de 20°C y a 26.000 g, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos. El sobrenadante, se utiliza para determinar la cantidad de proteína, en cubetas de cuarzo, a 280 nm (1 cm de longitud de trayectoria de la luz). Los valores, se expresan como porcentaje del valor inicial, antes del tratamiento por calor.

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

Una ventaja del procedimiento de la presente invención, reside en el hecho de que, las micelas de proteínas de suero lácteo preparadas correspondientemente en concordancia, no han sido sometidas a ninguna tensión mecánica que conduzca a la reducción del tamaño de partícula, durante la formación, contrariamente a lo que acontece en los procedimientos convencionales. Este procedimiento, induce una micelación espontánea de las proteínas de suero lácteo, durante el tratamiento por calor, en ausencia de cizallamiento.

Las micelas de suero lácteo, pueden utilizarse como tales, en cualesquiera composiciones, tales como las consistentes en composiciones nutritivas, composiciones farmacéuticas, etc. Adicionalmente, además, las micelas de proteína de suero lácteo, pueden cargarse con componente activo. El citado componente, puede seleccionarse de entre café, cafeína, extractos de té verde, extractos de plantas, vitaminas, minerales, agentes bioactivos, sal, azúcar, edulcorantes, aroma, ácidos grasos, aceites, etc., y mezclas de éstos. Adicionalmente, además, las micelas de proteína de suero lácteo (puro, o cargado con componentes activos), puede recubrirse con un emulsionante, tal como fosfolípidos, por ejemplo, u otros agentes de recubrimiento, tales como la goma de acacia, con objeto de modular la funcionalidad y el sabor de las micelas de proteína. De una forma preferible, el recubrimiento, es el consistente en un emulsionante, seleccionado de entre oleato de butilo sulfatado, ésteres del ácido dietiltartárico de mono- y diglicéridos, ésteres del ácido cítrico de monoglicéridos, lactilatos de estearoílo, y mezclas de entre éstos. La figura 17, es una representación esquemática de tal tipo de recubrimiento con oleato de butilo sulfatado.

Las micelas de proteína de suero lácteo, han mostrado ser idealmente apropiadas, para su uso como un emulsionante, como sustituto de la grasa, como sustituto para la caseína micelar, o como agente espumante, puesto que, éstas, son capaces de estabilizar la grasa y / o el aire, en un sistema acuoso, durante un prolongado transcurso de tiempo.

La estabilidad de la espuma, se muestra en la figura 5, la cual compara el uso de la proteína de suero lácteo no micelada, versus la proteína de suero lácteo micelada de la presente invención.

Así, de este modo, las micelas de suero lácteo, pueden utilizarse como agente emulsionante, para lo cual, el material, es idealmente apropiado, puesto que, éste, tiene un sabor neutro y no se crea un sabor secundario o malo, mediante el uso del tal tipo material. Éstas pueden también utilizarse como sustituto de la caseína micelar.

Adicionalmente, además, las presentes micelas de proteína de suero lácteo, se encuentran todavía en condición de servir como agente blanqueante, de tal forma que, con un compuesto, pueden realizarse varias tascas y cumplir con

ellas. Puesto que, el suero lácteo, es un material disponible en abundancia, el uso de éste, reduce el coste de un producto que requiera un agente emulsionante, una carga, un agente blanqueante, o un agente espumante, añadiéndose, simultáneamente, a su valor nutritivo.

Correspondientemente en concordancia, las micelas de proteína de suero lácteo obtenidas en concordancia con el procedimiento de la presente invención, pueden utilizarse para la preparación de cualquier tipo de producto consumible, que requiera la estabilización de una emulsión o de una espuma, tal y como, por ejemplo, éste se encuentra presenta en la espuma o "moousse", o en una crema helada, en cremas de café, o también, en productos dietéticos de reducido contenido en grasas o que se encuentren esencialmente exentos de grasas, o también, allí en donde, éste encuentre aplicación, como sustituto de la caseína micelar. Como producto "consumible", se pretende dar a 10 entender cualquier producto alimenticio, en cualquier forma, incluyendo a las bebidas, las sopas, alimentos semisólidos, etc., los cuales pueden consumirse por parte de un humano o por parte de un animal. Los ejemplos para productos en donde, las presentes micelas de proteína de suero lácteo pueden encontrar aplicación son, por ejemplo, los productos dietéticos, la mayonesa, las salas o aderezos para ensaladas, la leche UHT pasteurizada, la leche 15 condensada dulce, el yogurt, las leches fermentadas, las salsas, las salsas con grasa reducida, tales como, por ejemplo, la salsa de besamel, los productos fermentados a base de leche, el chocolate con leche, el chocolate blanco, el chocolate negro, las espumas del tipo "mousse", las emulsiones, las cremas heladas, los productos a base de cereales fermentados, las materias en polvo a base de leche, fórmulas para lactantes, fortalecimientos dietéticos, alimentos para animales de compañía, suspensiones bacterianas líquidas, suplementos orales deshidratados o secos, suplementos orales húmedos, barras de altas prestaciones nutritivas, de materias alimenticias para expandir 20 o untar, bebidas a base de frutas, mezclas de cafés.

Adicionalmente, además, las presentes micelas de proteínas de suero lácteo, pueden utilizarse, bien ya sea solas, o bien ya sea ya sea conjuntamente con otros materiales activos, tales como los polisacáridos (como por ejemplo, la goma de acacia o los carragenanos, para estabilizar matrices y, por ejemplo, matrices de espumas lácteas. Debido a su sabor neutro, su poder blanqueante y su estabilidad después del tratamiento, las presentes proteínas de suero lácteo, pueden utilizarse para incrementar la blancura de la leche desnatada y el sabor o sensación en boca.

Al mismo tiempo que incrementar el poder blanqueante de los sistemas dietéticos, para el mismo contenido de proteínas totales, puede también reducirse el contenido de grasa, en una matriz alimenticia. Esta característica, representa una ventaja particular de las presentes micelas de proteínas de suero lácteo, puesto que, ésta, permite producir productos de reducido contenido en grasa, procediendo, por ejemplo, a añadir una crema de leche sin añadir grasa adicional derivada de la leche, tal cual.

En el procedimiento de la presente invención, la dispersión de micelas de suero lácteo obtenida después del tratamiento con calor, se concentra, para proporcionar un concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo.

Correspondientemente en concordancia, la etapa de concentración, puede llevarse a cabo mediante evaporación, centrifugación, sedimentación y / o mediante microfiltrado.

La evaporación, puede llevarse a cabo, en la dispersión de micelas, procediendo a introducir ésta en un evaporador, bajo la acción del vacío, que tenga una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados e3ntre los 50°C y los 85°C.

La centrifugación, puede llevarse a cabo mediante una alta tasa de centrifugación (más de 2000 g), o mediante una reducida tasa de centrifugación (menos de 500 g), después de la acidificación de la dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo, y a un valor pH inferior a 5, de una forma preferible, a un valor pH de 4,5.

La sedimentación espontánea, puede también llevarse a cabo, sobre la dispersión de micelas de proteína de suero lácteo, mediante acidificación. De una forma preferible, el valor pH, será de 4,5 y, el tiempo de sedimentación, es de más de 12 horas.

De una forma preferible, la concentración de las micelas de proteína de suero lácteo en concordancia con la presente invención, puede llevarse a cabo mediante microfiltración de la dispersión de micelas. Esta enriquecidora técnica, no únicamente posibilita el concentrar las micelas de proteína de suero lácteo mediante la eliminación del disolvente, sino que, asimismo además, ésta posibilita la eliminación de la proteína no micelada (tales como las proteínas nativas o los agregados solubles). Así, de este modo, el producto final, consiste únicamente en micelas (tal y como se comprueba mediante Microscopia Electrónica de Transmisión – compárese con la figuras 9 y 10). En este caso, el factor de concentración que es posible lograr, se obtiene después de que el caudal de flujo inicial del permeado a través de la membrana, se haya reducido en un 20% con respecto a un valor inicial.

El concentrado de proteínas de suero lácteo obtenido mediante el procedimiento de la presente invención, tendrá una concentración de proteínas correspondiente a un porcentaje de por lo menos un 12%. Adicionalmente, además, el concentrado, contendrá un porcentaje de por lo menos un 50% de la proteína, en forma de micelas.

60

55

25

30

Es interesante el tomar debida nota en cuanto al hecho de que, el concentrado, si se ajusta el contenido de proteína a un porcentaje del 10%, tiene la capacidad de resistir un tratamiento subsiguiente, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a un valor pH de 7,0, en presencia de una cantidad de hasta 0,15 M de cloruro sódico, tal y como se muestra en la figura 11. A título comparativo, una dispersión de proteína de suero lácteo (Prolacta 90, lote 500658, procedente de la firma Lactalis), forma un gel, en presencia de 0,1 M de cloruro sódico, a una concentración de proteínas de únicamente un 4% (compárese con la figura 12).

La presente invención, presenta también el beneficio de que, la alta estabilidad de la estructura de micelas, se preserva, durante la etapa de concentración. Adicionalmente, además, las micelas, tiene un factor de eficiencia de proteínica, de por lo menos 100, siendo éste, de una forma preferible, de por lo menos 110, lo cual convierte a éstas en ingredientes nutritivos importantes.

10

15

25

30

35

El enriquecimiento de las micelas de proteínas de suero lácteo, ofrece las excepcionales ventajas consistentes en el hecho de que, los productos enriquecidos con proteínas, pueden obtenerse a una concentración que previamente no era alcanzable. Adicionalmente, además, puesto que, el concentrado puede actuar como un sustituto de la grasa, al mismo tiempo que mantiene sus deseadas propiedades estructurales, de textura y organolépticas, puede obtenerse una variedad mucho más amplia de productos con reducido contenido en grasa.

Adicionalmente, además, ésta presenta la ventaja, en cuanto a lo referente a costes, consistente en el hecho de que se necesita una menor cantidad de concentrado, para obtener los efectos deseados.

El concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo (procedentes de la evaporación o del microfiltrado), pueden utilizarse en forma líquida, como una dispersión, o en forma semi-sólida, o en una forma seca o deshidratada. Ésta puede utilizarse en una gran variedad de aplicaciones, tales como las que se han Descrito anteriormente, arriba, con respecto a las aplicaciones de las micelas de proteínas de suero lácteo.

Así, por ejemplo, el concentrado al 20% de proteína obtenido mediante evaporación, tiene una textura cremosa, semisólida (véase la figura 18), y puede texturizarse en una textura susceptible de poderse extender (para untar), mediante acidificación, utilizando ácido láctico. Esta textura líquida, cremosa, pastosa, puede utilizarse para preparar consumibles ricos en proteínas que sean ácidos, dulces, salados, aromáticos.

El concentrado de proteínas de suero lácteo, en cualquier forma, puede mezclarse con un porcentaje del 5% de fruta ácida básica, y un 5% de sacarosa, con objeto de obtener una bebida estable, de frutas ácidas, enriquecida con proteína de suero lácteo. Éste puede también utilizarse en la fabricación de productos lácteos, cremas heladas, o puede utilizarse como blanqueante del café, entre otros.

Otras aplicaciones adicionales, incluyen al cuidado de la piel el cuidado de la cara, tal como, por ejemplo, la pasta dentífrica, las gomas de mascar, o agente de limpieza a base de gomas.

El poder blanqueante del concentrado, en cualquier forma, se incrementa de una forma tremenda, en comparación con las micelas no concentradas, o en comparación con las proteínas nativas en polvo. Así, por ejemplo, el poder blanqueante de 4 ml de concentrado de micelas de proteína de suero lácteo al 15%, es equivalente a un 0,3% de óxido de titanio en 100 ml de una copa de café soluble al 2%. De una forma interesante, es posible el proceder a dispersar café soluble o sacarosa, en un concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo, de tal forma que se obtenga un concentrado del tipo 3 en 1, que tenga una concentración de sólidos totales correspondiente a un porcentaje del 60%, sin grasa.

Este concentrado, puede utilizarse como tal, o diluirse, en dependencia de la aplicación.

Así, por ejemplo, el concentrado de micelas de proteína de suero lácteo, en forma líquida o en forma seca o deshidratada, puede diluirse a un contenido de proteínas correspondiente a un porcentaje del 9%, como en la leche dulce y condensada. Los minerales de la leche, la lactosa y la sacarosa, pueden añadirse, de tal forma que, el producto final, tenga un perfil nutritivo similar, al compararse con la leche, pero que tenga únicamente proteína de suero lácteo, como fuente de proteínas. Esta mezcla a base de proteínas de suero lácteo, es más estable que la leche condensada, dulce, en la reacción de Maillard (basada en la velocidad de desarrollo, de un color marrón), cuando se incuba durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a una temperatura de 98°C (temperatura de ebullición del agua, a una altitud de 833 m).

La forma seca o deshidratada del concentrado de proteínas de suero lácteo obtenido mediante el procedimiento de la presente invención, puede obtenerse mediante cualesquiera de las técnica conocidas, tales como las consistentes en el secado mediante proyección pulverizada (spray), secado mediante congelación (liofilización), secado mediante rodillos, etc. Así, de este modo, el concentrado de proteínas de suero lácteo, pude secarse mediante proyección pulverizada (spray), mediante la adición o in la adición de otros ingredientes adicionales, y puede utilizarse como un sistema de suministro o un bloque de formación, en una gran gama y variedad de procedimientos, como por ejemplo, en la producción de productos consumibles, aplicaciones cosméticas, etc.

La figura 8, muestra una materia en polvo obtenida mediante secado por proyección pulverizada (spray), sin la adición de ningún ingrediente adicional, y que tiene un diámetro medio de partícula mayor de 1 micrómetro, debido a la agregación de micelas que acontece durante el proceso de secado mediante proyección pulverizada (secado por spray). Un diámetro volumétrico medio que es típico (D<sub>43</sub>) de las materias en polvo de la presente invención, es el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 45 y 55 micrómetros, siendo éste, de una forma preferible, de 51 micrómetros. El diámetro medio de la superficie (D<sub>32</sub>) es, de una forma preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 3 y micrómetros, siendo éste, de una forma preferible, de 3,8 micrómetros.

10

El contenido de humedad de las materias en polvo obtenidas, después del proceso de secado mediante proyección pulverizada (spray) es, de una forma preferible, el correspondiente a un porcentaje menor de un 10%, siendo éste, de una forma preferible, menor de un 4%.

Tal tipo de materia en polvo a base de micelas de proteínas de suero lácteo, puede comprender un porcentaje de 15 por lo menos un 90% de proteína de suero lácteo, el cual, por lo menos un 20%, de una forma preferible, más de un 50%, de una forma mayormente preferible, más de un 80%, se encuentran en forma micelar.

Adicionalmente, además, las micelas de proteína de suero lácteo, en polvo, tiene una gran capacidad de enlace o 20 unión para disolventes, tales como los consistentes en agua, glicerina, etanol, aceite, disolventes orgánicos, etc. La capacidad de enlace o unión de las materias en polvo, al agua, es la correspondiente a un porcentaje de por lo menos un 50%, de una forma preferible, de por menos un 90% y, de una forma mayormente preferible, de por lo menos un 100%. Para los disolventes como el glicerol y el etanol, la capacidad de enlace, es de por lo menos un 50%. Para el aceite, la capacidad de enlace, es de por lo menos un 30%. Esta propiedad de las micelas de proteína 25 de suero lácteo en polvo, permite el que éstas puedan proyectar mediante pulverización (spray), o que éstas puedan cargarse con otros ingredientes funcionales adicionales, tales como el café, la cafeína, los extractos de café verde, los extractos de planta, las vitaminas, los minerales, los agentes bioactivos, la sal, el azúcar, los edulcorantes, los aromas, los ácidos grasos, los aceites, etc., y las mezcla de éstos.

30 Los ingredientes funcionales, pueden incluirse en la materia en polvo, en una cantidad correspondiente a un porcentaje del 0,1 - 50%. Así, de este modo, la materia en polvo, podrá actuar como un portador o soporte, para estos ingredientes funcionales. Esto presenta la ventaja de que, por ejemplo, se reduce el amargor de la cafeína, cuando éstos se cargan en las materia en polvo de la presente invención, y se utilizan en barras nutritivas cafeinadas, por eiemplo.

35

40

45

55

60

65

Pueden mezclarse ingredientes adicionales al concentrado de micelas de proteína de suero lácteo, previamente al secado mediante proyección pulverizada. Éstos, comprenden a las sales solubles o no solubles, a las bacterias prebióticas, a las tinturas o colorantes, a los aromas, a las maltodextrinas, a las grasas, a los emulsionantes, a los extractos de plantas, a los ligandos, a los agentes bioactivos, a la cafeína, a las vitaminas, a los minerales, a fármacos, y cualesquiera mezclas posibles de éstos. Las micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, comprenden a las micelas de proteínas de suero lácteo, y por lo menos un ingrediente adicional, en un factor de relación de peso correspondiente a un valor que va desde 1 : 1 hasta 1 : 1000.

Las micelas de proteínas de suero lácteo en polvo, se caracterizan por una muy alta fluidez, característica ésta, la cual ofrece unas ventajas, las cuales, anteriormente, no eran susceptibles de poder ser obtenidas. Así, por ejemplo, estas materias en polvo, se comportan casi como líquidos, y presentan unas ventajas consistentes en una fáciles capacidad de utilización y capacidad de transferencia. El ángulo de respuesta de estas materias en polvo es, de una forma preferible, el correspondiente a un valor inferior a 35°, siendo éste, de una forma mayormente preferible, de un valor inferior a 30°. Una respuesta de reducido ángulo, de este tipo, permite el hecho de que, las materias en polvo 50 de la presente invención, puedan utilizarse como agentes fluidificantes en aplicaciones alimenticias, por ejemplo.

Una característica muy importante de estas materias en polvo, mezcladas o "puras", reside en el hecho de que, la estructura micelar básica de las proteínas de suero lácteo, se conserva. La figura 15, muestra un grano de la materia en polvo de proteína de suero lácteo, la cual se ha seleccionado, y en donde, las micelas de proteínas de suero lácteo individuales, son susceptibles de poderse observar. Adicionalmente, además, la estructura de las micelas, puede reconstituirse fácilmente, en disolventes. Se mostrado el hecho de que, las materias en polvo susceptibles de poderse obtener a partir de un concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo, puede ser fácilmente redispersada en agua, a la temperatura ambiente o a una temperatura de 50°C. El tamaño y la estructura de las micelas de proteínas de suero lácteo, se conservan en su totalidad, comparado con el concentrado inicial. Así, por ejemplo, en la figura 13, el concentrado de proteína de suero lácteo que se secó mediante proyección pulverizada (spray), a una concentración de proteínas correspondiente a un porcentaje del 20%, se ha re-dispersado en agua desionizada, a una temperatura de 50°C, a una concentración de proteínas correspondiente a un porcentaje del 4%. La estructura de las micelas, ha sido probada mediante TEM, y puede compararse con la figura 10. Se obtuvo una forma similar de las micelas. El diámetro de las micelas, según se encontró, era de 315 nm, mediante dispersión dinámica de la luz, con un índice de polidispersión de 0,2. La figura 16, muestra, también, la dispersión de una materia en polvo secada por congelación (liofilizada) de micelas de proteínas de suero lácteo, en donde, las micelas, se encuentran reconstituidas.

- El hecho consistente en que se observaran únicamente micelas de proteínas de suero lácteo y únicamente una fracción menor de agregados, en solución, después de la reconstitución de la materia en polvo secada mediante proyección pulverizada (spray) o secada mediante congelación (liofilización), confirma que, las micelas de proteínas de suero lácteo, son fisiológicamente estables, con respecto al secado mediante proyección pulverizada o con respecto al secado mediante liofilización (secado mediante congelación).
- Las materias en polvo producidas en concordancia con la presente invención, pueden utilizarse en una amplia gama de aplicaciones, tales como todas aquéllas descritas anteriormente, arriba, en relación con las micelas de proteínas de suero lácteo y los concentrados de éstas. Así, por ejemplo, mediante la utilización de las materias en polvo concentradas de micelas, pueden producirse, fácilmente, productos consumibles enriquecidos en proteínas, tales como el chocolate, las barras nutritivas de altas prestaciones, los productos nutritivos culinarios, las gomas de mascar, etc.
  - Debido a su alta estabilidad, en procesado de éstos, las materias en polvo producidas en concordancia con la presente invención, pueden adicionalmente recubrirse, por ejemplo, mediante emulsionantes o gomas. Esto puede ser ventajoso, para modular la funcionalidad y el sabor de estas materias en polvo.
- 20 Los ejemplos que se facilitan a continuación, ilustran la presente invención, sin limitarla en absoluto.

#### **Ejemplos**

La invención, se define adicionalmente, con referencia a los ejemplos que se facilitan a continuación, los cuales describen, en detalle, la preparación de las micelas de la presente invención. La invención que se describe y se reivindica aquí, en este documento, no pretende quedar limitada en su ámbito o alcance, mediante las formas específica de presentación aquí incluidas, puesto que, estas formas de presentación, se pretende que sean ilustraciones de algunos aspectos de la invención. Se pretende el hecho de que, cualesquiera formas equivalentes de presentación, se encuentren dentro del ámbito de la presente invención. De hecho, varias modificaciones de la presente invención, con respecto a la que se muestran y se describen aquí, en este documento, resultarán evidentes, para aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, a raíz de la descripción anteriormente facilitada. Se pretende el hecho de que, tales tipos de modificaciones, caigan dentro del ámbito o alcance de las reivindicaciones anexas.

# 35 <u>Ejemplo 1:</u>

# Micelación de la β-Lactoglobulina, mediante el ajuste del valor pH

- La B-Lactoglobulina, (lote JE002 8 922, 13 12 2000), se obtuvo en el mercado, de procedencia de la firma Daviso (Le Sueur, MN, USA). La proteína, se purificó a partir de suero lácteo dulce, mediante micro-filtración y cromatografía de intercambio de iones. La composición de la materia en polvo, era la correspondiente a un 86% de proteína, un 8,85% de humedad, un 1,36% de cenizas (0,079% Ca²+, 0,013% Mg²+, 0,097% K+, 0,575 Na+, 0,050% Cl⁻). La totalidad de otros reactivos utilizados, eran de un grado analítico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- La solución de proteínas, se preparó a un concentración del 0,2%, en peso, mediante solvatación de la β-Lactoglobulina en agua MilliQ® (Millipore), y procediendo a agitar, a una temperatura de 20°C, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. El valor pH de los alícuotos, se ajustó a unos valores de 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8 y 7,0, mediante la adición de HCl. Las soluciones, se cargaron en viales de vidrio, de 20 ml de capacidad (Agilent Technologies), y se sellaron con cápsulas de aluminio, que contenían un sellante de silicona / PTFE. Las soluciones, se calentaron a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos (transcurso de tiempo para alcanzar la temperatura, 2,30 a 3,00 minutos). Después del tratamiento con calor, las muestras, se enfriaron en hielo-agua, a una temperatura de 20°C.
  - El aspecto visual de los productos (Figura 1), indica el hecho de que, el valor pH óptimo de la micelación, es de 5,89.

# Ejemplo 2:

55

# Micelación del aislamiento de proteína de suero lácteo

- 60 El aislamiento de proteínas de suero lácteo (WPI [del inglés Whey protein isolate) (Bipro®, Batch JE 032 1 420), se obtuvo en el mercado, de procedencia de la firma Davisco (Le Sueur, MN, USA). La composición de la materia en polvo, se reporta en la Tabla 2.
- La solución de proteínas, se preparó a un porcentaje de un 3,4% de proteínas, mediante solvatación de la proteína de suero lácteo, en polvo, en agua MilliQ® (Millipore), y mediante agitación, a una temperatura de 20°C, durante un

transcurso de tiempo de 2 horas. El valor pH inicial, era de 7,2. A continuación, el valor pH de los alícuotos, se ajustó a unos valores de 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,5, y 6,6, mediante la adición de HCl 0,1 N. Las soluciones, se cargaron en viales de vidrio, 20 ml de capacidad (Agilent Technologies), y se sellaron con cápsulas de aluminio, que contenían un sellante de silicona / PTFE. Las soluciones, se calentaron a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos (transcurso de tiempo para alcanzar la temperatura, 2,30 a 2,50 minutos). Después del tratamiento con calor, las muestras, se enfriaron en hielo-agua, a una temperatura de 20°C.

La turbidez de las proteínas de suero lácteo calentadas, se determinó a 500 nm y una temperatura de 25°C, las muestras, se diluyeron, con objeto de permitir la medición en unos márgenes de 0,1 – 3 unidades Abs (Espectrómetro Uvikon 810, Kontron Instrument). Los valores, se calcularon para una concentración inicial de proteínas del 3,4%).

El valor pH de la micelación, se consideró como habiéndose alcanzado, después de la estabilidad (menos de un 55 de variación del valor inicial) de la absorbancia, medida a un valor de 500 nm, dentro de un intervalo de tiempo de 10 minutos, para la misma muestra, según se ilustra mediante la figura 2. Para este producto, el valor pH óptimo para la micelación, era de un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un valor de 6,0 hasta un valor de 6,2. Para este valor pH, ajustado antes del tratamiento mediante calor, estable, la turbidez era de un valor de 21, y la proteína soluble residual, evaluada mediante absorbancia, a un valor de 280 nm, después de la centrifugación, era de un 1,9%. Podemos por lo tanto concluir el hecho de que, un porcentaje del 45% de las proteínas iniciales, se transformaron en micelas, a un valor pH de 6,0.

#### Tabla 2:

10

15

20

Composición de WPI (aislamiento de proteína de suero lácteo) y características de la muestra, después de la mice-25 lación

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

#### Ejemplo 3 (Referencia)

Observación microscópica de las micelas

# Producción de micelas:

La solución de proteínas, se preparó a un porcentaje del 2% de proteínas, mediante solvatación del las proteínas de suero lácteo en polvo (WPI lote 989/2, lactalis, Retier, Francia) en agua MilliQ® (Millipore), y mediante agitación, a una temperatura de 20°C, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. Los valores pH, se ajustaron utilizando HCI 0,1 N, ó NaOH 0,1 N.

Las soluciones, se cargaron en viales de vidrio, de 20 ml de capacidad (Agilent Technologies), y se sellaron con cápsulas de aluminio, que contenían un sellante de silicona / PTFE. Las soluciones, se calentaron a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos (transcurso de tiempo para alcanzar la temperatura, 2,30 a 3,00 minutos). Después del tratamiento con calor, las muestras, se enfriaron en hielo-agua, a una temperatura de 20°C. Para este producto, el valor pH óptimo para la micelación, era de 7,4.

# Observaciones microscópicas:

Las muestras de micelas líquidas, se encapsularon en tubos de gel de agar. La fijación, se realizó mediante inmersión, en una solución al 2,5% de glutaraldehído, en tampón de cacodilato 0,1 M, a un pH de 7,4, y la post-fijación, se realizó con un 2% de tetraóxido de osmio, en el mismo tampón, conteniendo, ambas soluciones, un 0,04% de rojo

14

45

50

rutenio. Después de la deshidratación, en series graduadas de etanol (70, 80, 90, 96 y 100% de etanol), las muestras, se embebieron en resina de Spurr (Spurr / etanol 1 : 1, 2 : 1, 100%). Después de la polimerización de la resina (a una temperatura de 70°C, durante un transcurso de tiempo de 48 horas), se cortaron secciones semi-finas y ultra-finas, con un dispositivo del tipo "Leica ultracat UCT ultra-microtome". Las secciones ultra-finas, teñidas con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo, se examinaron, en microscopia electrónica de transmisión (TEM)(Philips, CM12, 80 kV).

El micrográfico realizado mediante TEM, se representa en la figura 3. Las micelas obtenidas, presentan una forma esférica, con un diámetro de 200 nm.

#### Distribución del tamaño de partícula

10

15

20

25

30

45

50

55

60

La distribuciones del tamaño de las micelas, basados en la intensidad, se midieron, para aquéllas micelas obtenidas mediante tratamiento por calor, de una dispersión de β-lactoglobulina al 1%, en peso, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 85°C, a un valor pH de 4,25 (cargadas positivamente con un potencial zeta de aproximadamente +25 mV), y a un valor pH de -30 mV). El diámetro hidrodinámico de las micelas mediado con z, era el correspondiente a un valor de 229,3 mm, a un valor pH de 4,25, y de 227,2, a un valor pH de 6,0. Las agregaciones de la β-LG y de las proteínas de suero lácteo, se siguieron, procediendo a su medición mediante la utilización de dispersión dinámica de la luz. Se utilizó un aparato nanomedidor del tipo Nanosizer ZS (Malvern Instruments, UK), equipado con un láser que emitía a 633 nm y 4,0 mW de potencia. El instrumento, se utilizó en la configuración de la retrodispersión, en donde, la detección, se realiza a un ángulo de dispersión de 173°. Esto, permite una considerable reducción de las múltiples señales de dispersión encontradas en las muestras turbias. Las muestras, se emplazaron en una célula de cuarzo cuadrada (Hellma, longitud de trayectoria de la luz, 1 cm). La longitud de la trayectoria, se ajustó, de una forma automática, mediante el aparato, en dependencia de la turbidez (atenuación). La función de autocorrelación, de calculó a partir de la fluctuación de la intensidad de retrodispersión. Los resultados obtenidos, se presentan en la figura 6. En ésta, se muestra que el tamaño medio de partícula, se caracteriza por un índice de polidispersión muy estrecho (<0,200). Como consecuencia de ello, la suspensión blanca obtenida mediante la presente invención, es estable, y tiene una apariencia lechosa, en una amplia gama de valores pH, correspondiente a unos márgenes de 3 – 8.

#### Ejemplo 4 (Referencia)

# Micelación de la β-Lactoglobulina, a un valor pH constante

35 El procedimiento descrito en el ejemplo 1, se repitió, utilizando una solución acuosa al 2% de β-Lactoglobulina. El valor pH de esta solución, se ajustó un valor de 7,0, después de la adición de soluciones de Arginina HCl, para obtener a una concentración final de sales, correspondiente a un valor que va desde 5 a 200 mM, y una concentración final de β-Lactoglobulina correspondiente a un porcentaje de un 1%. Con objeto de producir micelas, se llevó a cabo el subsiguiente tratamiento por calor (a una temperatura de 80°C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, con aproximadamente 2 minutos de tiempo de subida de la temperatura).

Los resultados obtenidos, se muestran en la figura 4, y éstos indican claramente el hecho de que, únicamente en el rango de fuerza iónica correspondiente a unos márgenes que van desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 70 mM, puede observarse una turbidez substancial, indicando, ello, la presencia de micelas de proteína de suero lácteo.

# Ejemplo 5:

# Preparación de un agente blanqueante

Las proteínas nativas de suero lácteo nativo (WPI 95, lote 848, Lactalis; solución acuosa al 8%), se trataron en concordancia con el ejemplo 2. La claridad (luminosidad)(L) del producto resultante, se midió en modo de transreflectancia, utilizando un aparato del tipo MacBeth CE-XTH, D65 10° SCE, equipado con una célula de medición de 2 mm. La luminosidad resultante, era de L = 74,9, la cual podría compararse con el valor de L = 74,5, para leche (con grasa) entera.

#### Ejemplo 6:

# Preparación de una crema de café

Se procedió a mezclar proteínas de suero lácteo (Bipro®, lote JE 032 – 1 – 420, solución acuosa al 0,5%, en peso), a una temperatura de 50°C, con un aceite de palma parcialmente hidrogenado, a un porcentaje del 10%, en peso, maltodextrina al 14%, en peso (DE 21) y en presencia de tampón 50 mM de fosfato-citrato, al valor pH de micelación de 5,0, para este Bipro®. La mezcla, e homogeneizó bajo una presión de 400/50 bar, utilizando un homogeneizador

Rannie y un subsiguiente tratamiento por calor, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 85°C.

La emulsión obtenida, mostraba un alta estabilidad, en un transcurso de tiempo de por lo menos un mes, a unas condiciones de almacenaje de 4°C de temperatura, y proporcionó una blancura de L = 78, comparado con una crema líquida de referencia (Crème a Café, Emmi, Suiza), que tenía un contenido de grasa del 15%, y una claridad (luminosidad) de L = 75,9.

# Ejemplo 7 (Referencia):

Preparación de una espuma acuosa

10

15

20

25

30

35

50

55

Se procedió a mezclar β-lactoglobulina nativa (Biopur, Davisco, lote JE 002 – 9 – 922, solución acuosa al 2%), con una solución 120 mM de Arginina HCl, de tal forma que, la concentración final de β-Lactoglobulina, era de un 1%, en peso, y Argina HCl 60 mM. El valor pH, se ajustó, a continuación, a un valor de 7,0, mediante la adición de HCl 1N. La mezcla, se calentó entonces a una temperatura de 80°C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, de tal forma que, el 90% de la β-Lactoglobulina inicial, se convirtió en micelas que tenían un diámetro mediado con z, correspondiente a un valor de 130 nm. En este caso, el diámetro de las micelas, se determinó mediante la utilización de un aparato nano-medidor del tipo "Nanosizer ZS (Malvern Instruments, UK). La muestra, se vertió en una cubeta de cuarzo, y se registraron, de una forma automática, las variaciones de la luz dispersada. La función de autocorrelación obtenida, se fijó, utilizando el método de acumulantes, de tal forma que, el coeficiente de difusión de las partículas, pudiera calcularse y, después, también, asimismo, el diámetro hidrodinámico mediado por z, utilizando la ley de Stokes - Einstein. Para llevar a cabo esta medición, el índice de refracción del disolvente, se tomó como siendo de 1,33 y el de las micelas, como siendo de 1,45. Se procedió, a continuación, a espumar un volumen de 50 ml de la dispersión resultante de micelas de β-Lactoglobulina, mediante inyección de nitrógeno, a través de una frita de vidrio, generando con ello burbujas de 12 – 16 µm de tamaño, para producir un volumen de espuma de 180 cm<sup>3</sup>, utilizando un aparato estandarizado de espumación, del tipo Foamscan® (ITConcept). La estabilidad volumétrica de la espuma, se siguió, entonces, a través del tiempo, a una temperatura de 26°C, utilizando una análisis de las imágenes, y procediendo a la comparación con la estabilidad la espuma obtenida con β-Lactoglobulina tratada en las mismas condiciones, pero sin Arginina HCl, en donde, no se formaron micelas. La figura 5, muestra el hecho de que, la estabilidad volumétrica de la espuma, se mejora enormemente, mediante la presencia de las micelas de β-Lactoglobulina.

# Ejemplo 8:

Producto dietético fermentado, a base de suero lácteo - Ensayos de fermentación

#### **Material**

40 Se obtuvo un aislamiento de proteínas de suero lácteo (WPI) (Bipro®, de procedencia de la firma Davisco (Le Sueur, MN, USA) (concentración de proteínas, 92,7%). Permeado de suero lácteo secado mediante congelación (liofilizado) (Variolac 836): Concentración de lactosa: 83%, - Minerales: 8%, Ácido láctico 50%.

Lactosa comestible (Lactalis),

45 Agua desionizada.

# **Procedimiento**

Se procedió a disolver la materia en polvo de Bipro® en agua desionizada, con objeto de tener una concentración de proteínas de un porcentaje del 4,6%, es decir, por tres litros de solución, 154,5 g de materia en polvo de WPI, y 2845,5 g de agua. El tiempo de hidratación, fue de 3 horas. Después de la hidratación, esta solución, se dividió en muestras de 200 ml, con objeto de preparar las diferentes pruebas.

# Tabla 3

Prueba	Permeado de suero	Lactosa (%)	Ajuste del valor pH	Calentamiento
Trueba	lácteo (%)	Laciosa (70)	Ajuste del Valor pri	85°C / 15 minutos
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	+

Tabla 3 (continuación)

Prueba	Permeado de suero lácteo (%)	Lactosa (%)	Ajuste del valor pH	Calentamiento 85°C / 15 minutos
7	0	5 (añadido después del ajuste del pH)	6	-
8	0	6 (añadido después del aiuste del pH)	6	+

5 Para cada solución, se añadió ácido láctico, a un 50%, para ajustar el valor pH, antes del calentamiento.

Las muestras, se calentaron con la caldera doble, hasta una temperatura de 85°C, y éstas, se mantuvieron a esta temperatura, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos. Después del proceso de calentamiento, las soluciones, se enfriaron a una temperatura de 40°C, y se inocularon con Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus.

Las muestras, se incubaron durante un transcurso de tiempo de 5 horas 30 minutos, en un alojamiento de vapor, a una temperatura de 41°C, antes de emplazarse en un alojamiento frío, a una temperatura de 6°C.

Los resultados obtenidos, se presentan en la Tabla 4.

# Tabla 4

10

15

Prueba	Permeado de	Lactosa	рН	Calentamiento	pH des-	Aspecto
	suero lácteo		-		pués de 5	
					h.30 min.	
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 del ajuste del pH	6	-	4,87	Liquido con manchas blancas
8	-	- añadido después del ajuste del pH	6	-	4,77	Firme

# 20 Ejemplo 9:

Crema de helado reforzada con proteína de suero lácteo, con un reducido contenido en grasa

#### Material

25

Aislamiento de proteína de suero lácteo (WPI Prolacta90®, procedente de la firma Lactalis Rétiers, Francia), con un contenido de proteína del 90%

Sacarosa

Maltodextrinas DE39

30 Grasa de leche anhidra

Emulsionante

Agua desionizada

Ácido clorhídrico 1 M, comestible

# 35 Procedimiento

Mediante la utilización de un depósito de provisto de doble pared, de 80 l de capacidad, se procedió a dispersar el Prolacta 90® en polvo, a una temperatura de 50°C, en agua desionizada, a una concentración de proteínas del 9,67%, en peso, bajo régimen de una suave agitación, con objeto de evitar la formación de espuma, a saber, se procedió a dispersar 3,5 kg de Prolacta 90/R), en 31,05 kg de agua desionizada. Después de un transcurso de tiempo de 1 hora de dispersión, el valor pH de la dispersión, se ajustó al pH de micelación, mediante la adición de HCl. La temperatura de la dispersión, se elevó a un nivel de 85°C, y se mantuvo durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, con objeto de generar las micelas de proteína de suero lácteo. Después de un transcurso de tiempo de

15 minutos, la temperatura, se redujo a un nivel de 50°C, y se añadieron secuencialmente los ingredientes adicionales, a la dispersión de micelas (es decir, leche descremada en polvo, maltodextrinas DE39, sacarosa, emulsionante y grasa de leche anhidra). La cantidad final de la mezcla, era de 50 kg, con un contenido total de sólidos del 39,5%, y un contenido de grasa del 5%, en peso. Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos de hidratación, la mezcla, se homogenizó en dos etapas (80 / 20 bar) y se pasteurizó (86°C / 30 segundos), antes de envejecimiento durante el transcurso de toda la noche.

Al día siguiente, se procedió a congelar la mezcla de crema helada, en una cobertura del 100%, utilizando un aparato del tipo Hoyer MP50, y se endureció a una a una temperatura de -40°C, antes de proceder al almacenaje, a una temperatura de -20°C. La crema helada final, contenía un 8%, en peso, de proteínas (20% de caseínas, 80% de proteínas de suero lácteo), y un 5% de grasa, en base a la mezcla de la crema helada.

#### Ejemplo 10:

15 Micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, obtenidas mediante proyección pulverizada (spray)

#### **Material**

10

20

25

30

35

40

55

60

Aislamiento de proteína de suero lácteo (WPI Prolacta90®, procedente de la firma Lactalis Rétiers, Francia), con un contenido de proteína del 90%

Lactosa comestible Maltodextrinas DE39 Agua desionizada Ácido clorhídrico 1M, comestible

# Procedimiento

Mediante la utilización de un depósito de provisto de doble pared, de 100 l de capacidad, se procedió a dispersar el Prolacta 90® en polvo, a una temperatura de 50°C, en agua desionizada, a una concentración de proteínas del 10,0%, en peso, bajo régimen de una suave agitación, con objeto de evitar la formación de espuma, a saber, se procedió a dispersar 11 kg de Prolacta 90/R), en 89 kg de agua desionizada. Después de un transcurso de tiempo de 1 hora de dispersión, el valor pH de la dispersión, se ajustó al pH de micelación (alrededor de 6,3, en este caso), mediante la adición de HCl. La temperatura de la dispersión, se elevó a un nivel de 85°C, y se mantuvo durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, con objeto de generar las micelas de proteína de suero lácteo. Después de un transcurso de tiempo de 15 minutos, la temperatura, se redujo a un nivel de 50°C, y la dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo, se dividió en dos lotes de 50 kg. En una primera prueba, se procedió a dispersar 20 kg de lactosa, en 50 kg de dispersión de micelas, a una temperatura de 50°C, y se agitó durante un transcurso de tiempo de 15 minutos. De una forma similar, se procedió a añadir 20 kg de maltodextrinas DE39 a los restantes 50 kg de dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo.

Las dos mezclas, se secaron, a continuación, mediante proyección pulverizada (spray), en una torre del tipo NIRO SD6.3N, a un caudal de flujo de 15 l/h. La temperatura del aire de entrada, era de 140°C, y la temperatura de salida del aire, era de 80°C. El contenido de agua de las materias en polvo obtenidas, era inferior a un porcentaje del 5%.

El tamaño de las micelas de proteína de suero lácteo, se determinó en presencia de lactosa y maltodextrina (DE39) en agua, utilizando dispersión dinámica de la luz, antes y después del secado mediante proyección pulverizada. La concentración total de proteína, se ajustó a un valor del 0,4%, en peso, mediante dilución de la dispersión, antes del secado mediante proyección pulverizada o reconstitución de la materia en polvo, con objeto de estar en el régimen diluido de viscosidad, para las micelas de proteínas de suero lácteo. Se utilizó un aparato de nano-medición, del tipo Nanosizer ZS (Malvern Instruments), y se calculó el diámetro de medio de las micelas, a partir de 20 mediciones.

El diámetro de partícula determinado para las micelas de proteínas de suero lácteo, en presencia de lactosa y maltodextrinas (DE39), era de 310,4 nm y 306,6, respectivamente. Después de la reconstitución de las materias en polvo, se encontró que, los respectivos diámetros, eran de 265,3 nm y 268,5, respectivamente. Estas mediciones, confirman el hecho de que, las micelas de proteínas de suero lácteo, eran físicamente estables, con respecto al secado por proyección pulverizada. Los resultados obtenidos, se corroboraron mediante observaciones de microscopia TEM de dispersiones de micelas de proteínas de suero lácteo al 0,1%, en peso, en agua, utilizando una tinción negativa, en presencia de ácido fosfotúngstico al 1%, a un valor pH de 7. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión del tipo Philips CM12, operando a 80 kV. Las proteínas de suero lácteo, se observaron en solución, antes del secado mediante proyección pulverizada (spray), y después de la reconstitución de la materia en polvo secado mediante proyección pulverizada. No se detectó ninguna diferencia en morfología y estructura.

#### Ejemplo 11:

# Concentración mediante evaporación

Se procedió a reconstituir un aislamiento de proteína de suero lácteo Prolacta 90, procedente de la firma Lactalis (lote 500648), a una temperatura de 15°C, en agua blanda, a una concentración de proteína del 4%, para alcanzar un tamaño final del lote de 2500 kg. El valor pH, se ajustó mediante la adición de ácido clorhídrico 1M, de tal forma que, el pH final, fuera de un valor de 5,90. La dispersión de proteínas de suero lácteo, se bombeó a través de un intercambiador de calor placa - placa APV-mezcla, a un caudal de flujo de 500 l/h. A un precalentamiento a una temperatura de 60°C, le siguió un tratamiento de calor, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos. La formación de micelas de proteínas de suero lácteo, se controló mediante la medición del tamaño de partícula, utilizando dispersión dinámica de la luz, así como la medición de la turbidez, a 500 nm. La dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo al 4% obtenida, se caracterizaba por un radio hidrodinámico de las partículas de 250 nm, a un índice de polidispersión de 0,13, y una turbidez de 80. La dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo, se utilizó, a continuación, para alimentar un evaporador del tipo Scheffers, a un caudal de flujo de 500 15 I/h. La temperatura y el vacío del evaporador, se adaptaron de tal forma que se pudieron producir alrededor de 500 kg de concentrado de micelas de proteína de suero lácteo que tenían una concentración de proteínas del 20%, y se enfriaron a una temperatura de 4°C.

#### 20 Ejemplo 12:

25

40

50

55

#### Enriquecimiento mediante microfiltrado

Se procedió a reconstituir un aislamiento de proteína de suero lácteo Prolacta 90, procedente de la firma Lactalis (lote 500648), a una temperatura de 15°C, en agua blanda, a una concentración de proteína del 4%, para alcanzar un tamaño final del lote de 2500 kg. El valor pH, se ajustó mediante la adición de ácido clorhídrico 1M, de tal forma que, el pH final, fuera de un valor de 5,90. La dispersión de proteínas de suero lácteo, se bombeó a través de un intercambiador de calor placa - placa APV-mezcla, a un caudal de flujo de 500 l/h. A un precalentamiento a una temperatura de 60°C, le siguió un tratamiento de calor, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo 30 de 15 minutos. La formación de micelas de proteínas de suero lácteo, se controló mediante la medición del tamaño de partícula, utilizando dispersión dinámica de la luz, así como la medición de la turbidez, a 500 nm. La dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo al 4% obtenida, se caracterizaba por un radio hidrodinámico de las partículas de 260 nm, a un índice de polidispersión de 0,07, y una turbidez de 80. La forma de las micelas de las proteínas, se controló, también, mediante TEM, y las estructuras de micelas con diámetro medio de 150 - 200 nm, eran claramente visibles (Figura 9). La dispersión de micelas de proteínas de suero lácteo, se enfrió a una temperatura de 4°C, y se utilizó para alimentar una unidad de filtración, equipada con una membrana de Carbosep M14 de 6,8 m<sup>2</sup>, a un caudal de flujo de 180 l/h. En este caso, la concentración de las micelas de proteínas de suero lácteo, se realizó a una temperatura de 10°C, hasta que, el caudal de flujo del permeado, alcanzara los 70 l/h. En este caso, el concentrado final de proteínas de suero lácteo, contenía un porcentaje del 20% de proteínas. La estructura de las micelas, en el concentrado, se controló mediante TEM, y claramente, no era visible ningún cambio significativo, en comparación con la dispersión de proteínas de suero lácteo al 4%, antes del microfiltrado (Figura 10).

#### Ejemplo 13:

#### 45 Micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, que comprenden por lo menos un porcentaje del 90% de proteína de suero lácteo

Se procedió a inyectar 200 kg de un concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo obtenidas mediante microfiltrado, a un porcentaje de proteínas del 20% (véase el ejemplo anterior de arriba), a una torre del tipo Niro SD6.3N, utilizando una tobera de inyección por atomización (Ø = 0,5 mm, ángulo de inyección por proyección pulverizada = 65°, presión = 40 bar), a un caudal de flujo del producto de 25 kg/h. La temperatura de entrada del producto, en la torre, era de 150°C y la temperatura de salida, era de 75°C. El flujo de aire, en la torre, era de 150 m<sup>3</sup>/h. El contenido de humedad, en la materia en polvo, era inferior a un porcentaje del 4%, y la materia en polvo, se caracterizaba por una capacidad de fluio muy alta. La microscopia electrónica de exploración de la materia en polyo, exhibía unas partículas muy esféricas, que tenían un diámetro aparente correspondiente a un tamaño que iba desde 10 µm hasta 100 µm (Figura 8).

# Ejemplo 14:

60

# Mezcla de micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo

Se procedió a mezclar 20 kg de un concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo, con 1,7 kg de maltodextrinas con un DE de 39, de tal forma que, el valor de relación final de micelas de proteínas de suero lácteo, con respecto a la maltodextrina, fuera de 70/30. Esta mezcla, se inyectó en una torre del tipo Niro SD6.3N, utilizando una tobera de inyección por atomización (Ø = 0,5 mm, ángulo de inyección por proyección pulverizada = 65°, presión = 40 bar), a un caudal de flujo del producto de 25 kg/h. La temperatura de entrada del producto, en la torre, era de 150°C y, la temperatura de salida, era de 75°C. El flujo de aire, en la torre, era de 150 m³/h. El contenido de humedad, en la materia en polvo, era inferior a un porcentaje del 4%, y la materia en polvo, se caracterizaba por una capacidad de flujo muy alta.

Las materias en polvo de los ejemplos 13 y 14, al reconstituirse en agua, comprendían esencialmente micelas que tenían la misma estructura y morfología que el concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo.

#### Eiemplo 15

Micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, obtenidas mediante secado por congelación (liofilización)

#### 15 Material

Concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo, al 20% de proteínas, producido mediante microfiltrado en el ejemplo 12, con un contenido de proteínas del 90%

# 20 Procedimiento

Se procedió a introducir 100 g de concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo, en una probeta de plástico, y se secó, a una temperatura de -25°C, durante un transcurso de tiempo de una semana. Esta probeta, se emplazó, a continuación, en secador por congelación (secador de liofilización) a escala de laboratorio, del tipo Virtis, equipado con una bomba de vacío. La muestra, se dejó, durante un transcurso de tiempo de 7 días, hasta que, la presión, en el secador por congelación, permaneciera constante, a un valor de aproximadamente 30 mbar. Se recuperaron aproximadamente 20 g de micelas de proteínas de suero lácteo, secadas por congelación (liofilizadas).

#### Ejemplo 16:

Un chocolate negro, enriquecido con proteína de suero lácteo, sin sacarosa

#### Material

<u>Ingredientes</u>	<u>Porcentaje</u>
Micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, procedentes de ejemplo 13, con un contenido de proteína del 90%	40 – 50%
Sucralosa	0,05 – 0,1%
Grasa de leche anhidra	3 – 5%
Licor de cacao	30 – 40%
Manteca de cacao	5 – 15%
Vainillina	0,005 - 0,015%
Lecitina	0,1 – 1%

# Procedimiento

Se procede a mezclar manteca de cacao, con grasa de mantequilla, micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, sucralosa, vainillina y lecitina. Esta mezcla, se procesa en una concha de agitación, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 65°C, hasta la obtención de una pasta homogénea. Esta masa de chocolate, se moldea, a continuación, en placas de chocolate, y se enfría. El chocolate negro, se caracteriza por un contenido final de proteínas de suero lácteo, correspondiente a un porcentaje del 45 – 50%.

# Ejemplo 17:

Chocolate blanco, enriquecido con proteína de suero lácteo

#### Material

Ingredientes	Procedi-miento 1	Procedi-miento 2	Procedi-miento 3
Micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, procedentes de ejemplo 13, con un contenido de proteína del 90%	12 – 25%	25 – 35%	35 - 40%
Sucrosa	40 – 45%	30 – 35%	30 – 35%
Grasa de leche anhidra	1 – 10%	1 – 10%	1 – 10%

20

10

35

40

45

30

Suero lácteo en polvo	2 – 10%	2 – 10%	2 – 10%
Manteca de cacao	20 – 30%	20 – 30%	20 – 30%
Vainillina	0,01 – 0,1%	0,01 – 0,1%	0,01 – 0,1%
Lecitina	0,1 – 1%	0,1 – 1%	0,1 – 1%

# Procedimiento 1

Se procede a mezclar las micelas de proteínas de suero lácteo, suero lácteo en polvo, sacarosa y vainillina, y se muelen, hasta que se haya obtenido la distribución del tamaño de partícula deseada. Esta mezcla, se procesa en una concha de agitación, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 65°C, con manteca de cacao, grasa de leche anhidra y lecitina, hasta la obtención de una pasta homogénea. Esta masa de chocolate, se moldea, a continuación, en placas de chocolate, y se enfría. Este chocolate blanco, se caracteriza por un contenido final de proteínas de suero lácteo, correspondiente a un porcentaje del 20%.

#### Procedimiento 2

10

15

25

30

40

45

60

Se procede a mezclar las micelas de proteínas de suero lácteo, suero lácteo en polvo, sacarosa y vainillina, y se muelen, hasta que se haya obtenido la distribución del tamaño de partícula deseada. Esta mezcla, se procesa en una concha de agitación, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 65°C, con manteca de cacao, grasa de leche anhidra y lecitina, hasta la obtención de una pasta homogénea. Esta masa de chocolate, se moldea, a continuación, en placas de chocolate, y se enfría. Este chocolate blanco, se caracteriza por un contenido final de proteínas de suero lácteo, correspondiente a un porcentaje del 30%.

# 20 Procedimiento 3

Se procede a mezclar las micelas de proteínas de suero lácteo, sacarosa y vainillina, y se muelen, hasta que se haya obtenido la distribución del tamaño de partícula deseada. Esta mezcla, se procesa en una concha de agitación, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 65°C, con manteca de cacao, grasa de leche anhidra y lecitina, hasta la obtención de una pasta homogénea. Esta masa de chocolate, se moldea, a continuación, en placas de chocolate, y se enfría. Este chocolate blanco, se caracteriza por un contenido final de proteínas de suero lácteo, correspondiente a un porcentaje del 30 -35%.

#### Eiemplo 18:

Dispersión anhidra de micelas de proteínas de suero lácteo, recubiertas con oleado de butilo sulfatado (SBO), o cualquier otro emulsionante cargado negativamente

#### **Material**

35

Micelas de proteínas de suero lácteo (WPM), en polvo, procedentes de ejemplo 13, con un contenido de proteína del 90%

SBO

Ácido clorhídrico (1M)

# **Procedimiento**

Se procedió a dispersar las WPM descritas en el ejemplo 13, en agua MilliQ, con objeto de conseguir una concentración final de proteínas, correspondiente a un valor del 0,1%, en peso.

Esta dispersión, se filtra en filtros de 0,45 μm, con objeto de eliminar posibles agregados de WPM. El pH de esta dispersión de WPM, se reduce a un valor de 3,0, mediante la adición de ácido clorhídrico 1M. Se prepara una dispersión de SBO 1M, a un valor pH de 3,0.

El radio hidrodinámico y el potencial z de estas WPM, se determinó utilizando un aparato de medición de tamaños a escalas de nanometros, del tipo "Nanosizer ZS apparatus" (Malvern Instruments Ltd.). El diámetro, era de 250 nm y, la movilidad electroforética, de + 2,5 μm.cm.V<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. El radio hidrodinámico y la movilidad electroforética de la dispersión de SBO, a un valor pH de 3,0, eran, respectivamente, las correspondientes a unos valores de 4 nm y - 1,5 / -2,0 μm.cm.V<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.

Después de haber procedido a realizar esta caracterización preliminar, el SBO, se utilizó para valorar el título de las WPM, al mismo tiempo que se seguía la evolución del radio hidrodinámico y la movilidad electroforética de la mezcla. Se encontró el hecho de que, el radio hidrodinámico, era constante, de alrededor de 250 – 300 nm, hasta que se hubo alcanzado un factor de relación de la mezcla de WPM /SBO, correspondiente a un valor de 5 : 1. En este punto, el radio hidrodinámico, diverge de una forma dramática, a un valor de 20.000 nm, y tiene lugar la igualación o encuentro de los complejos de WPM SBO. Después de haber procedido a la adición adicional de SBO, a un valor de

relación de mezcla mayor de 5 : 1, el radio hidrodinámico, descendió, progresivamente, a un valor de 250 nm, tal y como se encontró, inicialmente, para las WPM, nivelándose a partir de un factor de relación de 4:1. A continuación, la movilidad electroforética de la mezcla, mostró que ésta se reducía, mediante la adición de SBO, alcanzando un valor de cero, para una relación de mezcla de 5 : 1. A continuación, ésta continuó bajando, mediante la adición de SBO, empezando a nivelarse a – 3,0 μm.cm.V<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, a partir de un factor de relación de 4 : 1.

La explicación para estos resultados, es que, las WPM positivamente cargadas, en una primera etapa, se recubren electroestáticamente, con una cabeza negativa del SBO, hasta que se alcanza la neutralización total de la carga (factor de relación de mezcla 5 : 1). En este punto, las colas hidrofóbicas procedentes del SBO, tienen capacidad para auto-asociarse, conduciendo a una auto-agregación, con un diámetro hidrodinámico muy amplio y precipitación de los complejos. Después de la adición adicional de SBO, las colas hidrofóbicas, se asocian adicionalmente, para formar un doble recubrimiento, exponiendo su cabeza negativa al disolvente. Esto conduce a unas WPM negativamente cargadas, con un doble recubrimiento de SBO (véase la figura 17), comparable a un liposoma con núcleo de proteína completo.

Se han obtenido unos resultados similares, con otros emulsionantes ácidos, de grado alimenticio, tales como los consistentes en los DATEM, CITREN, SSL (de la firma Danisco), en solución acuosa, a un valor pH de 4,2, en donde, éstos, se encentran en su mayor parte ionizados en su forma aniónica (funciones químicas -COO).

#### 20 Ejemplo 19:

#### Salsa besamel enriquecida con proteínas

#### Material

25

10

15

Mezcla de micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, procedentes de ejemplo 14, con un contenido de proteína

Mantequilla

Harina

30 Leche descremada

# Procedimiento

Se procede a dispersar una mezcla en polvo de proteínas de suero lácteo, en 1 litro de leche descremada, bajo la 35 acción de calor. Se procede, a continuación, a añadir 30 g de mantequilla y 80 g de harina, conjuntamente con 2,85 q de sal. A continuación, la mezcla, se hierve, con objeto de producir una salsa de besamel, que tiene un contenido de proteínas de suero lácteo de aproximadamente 3 g / 100 g.

#### 40 Ejemplo 20:

Una base enriquecida con proteínas de suero lácteo, para una barra de altas prestaciones nutritivas

Ingredientes	<u>Porcentaje</u>
Mezcla de micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, procedentes de ejemplo 13, con un contenido de proteína del 90% (con un contenido de humedad del 3,5%)	40 – 50%
Jarabe de arroz moreno	35 – 45%
Maltitol	5 – 10%
Glicerol	10 – 15%

#### 45 **Procedimiento**

50

Se procede a mezclar jarabe de arroz moreno, con maltitol y glicerol, a una temperatura de 25°C. A continuación, se procede a añadir micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, y se lleva a cabo un proceso de mezclado, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. Se obtiene, entonces, una base enriquecida con proteínas de suero lácteo, para una barra de altas prestaciones nutritivas, y ésta puede mezclarse con otros ingredientes (minerales, vitaminas, saborizantes [condimentos]). Esta preparación, contiene más proteínas que leche (38%).

#### Ejemplo 21:

55 Determinación del ángulo de respuesta para micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, secadas mediante proyección pulverizada (spray), mezcla de micelas de proteínas de suero lácteo en polvo, aislamiento de proteínas de suero lácteo en polvo, y leche descremada en polvo de reducidas calorías

# **Material**

Micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, procedentes de ejemplo 12, con un contenido de proteínas del 90% (con un contenido de humedad del 3,5%)

Mezcla de micelas de proteínas de suero lácteo, en polvo, procedentes de ejemplo 13, con un contenido de proteínas del 90% (con un contenido de humedad del 3,5%)

Aislamiento de proteínas de suero lácteo, en polvo, Prolacta 90 (lote 500658, procedente de Lactalis, Francia; con un contenido de humedad del 4%)

Leche descremada en polvo, de reducidas calorías (lote 334314. procedente de la firma Emmi, Suiza; con un contenido de humedad del 3,5%)

Dispositivo de medición descrito para medir el ángulo de respuesta para materias en polvo, según la norma ISO 4324.

#### 15 Procedimiento

20

25

Se procede a emplazar la materia en polvo, en un embudo, con un diámetro de tubo de 99 mm y, el tubo, se fuerza a fluir, utilizando el agitador. La materia en polvo, cae sobre una probeta de plástico, transparente, con un diámetro de 100 mm, y una altura de 25 mm. El ángulo de respuesta Ø, se mide a partir de la siguiente ecuación:

Ángulo de respuesta  $\emptyset$  = ARCTAN (2h/100)

en donde, h, es la altura máxima del cono de materia en polvo que puede obtenerse, cubriéndose, toda la superficie de la probeta de plástico, con la materia en polvo.

Resultados del test de ensayo del ángulo de respuesta (los valores, son la media de 3 mediciones y se indica la desviación standard).

	Micelas de proteínas de suero lácteo, en	Mezcla de micelas de proteínas de suero	Aislamiento de proteínas de suero	Leche descremada en polvo, de reduci-
	polvo	lácteo, en polvo	lácteo	das calorías
Ángulo de respuesta (°)	24,6 ± 1,1	27,3 ± 0,7	34,3 ± 0,5	43,8 ± 2,8

Los resultados del ángulo de respuesta, muestran claramente el hecho de que, las micelas de proteínas de suero lácteo en polvo, puras o mezcladas con maltodextrinas, exhiben un ángulo significativamente más reducido que el de las proteínas de suero lácteo en polvo, o incluso de la leche descremada en polvo. Un ángulo de respuesta más bajo que 35°, es característico de las materias en polvo que fluyen muy bien.

# **REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para la producción de concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo, consistente en las etapas de:
- a. Ajustar el valor pH de una solución acuosa de proteínas de suero lácteo, desmineralizada, a un valor pH comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5,8 y 6,6, en donde, la concentración de la solución acuosa de proteínas de suero lácteo, es menor de un 12%, en donde, si la solución acuosa de proteínas de suero lácteo comprende compuestos adicionales, la cantidad de los citados compuestos adicionales, no excede de un 10%, en peso, del peso total de la solución.
- b. Someter la solución acuosa, a una temperatura situada entre 80 y 90°C, en donde, el calentamiento, se lleva a cabo durante un transcurso de tiempo comprendido entre los 10 segundos y las 2 horas.
  - c. Concentrar la dispersión obtenida en la etapa b, y
  - d. Opcionalmente, secar mediante proyección pulverizada o liofilización, el concentrado de micelas de proteínas de suero lácteo.
  - 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, la concentración de la solución acuosa de proteínas de suero lácteo, es menor de un 4%.
  - 3.- Procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, el tiempo de calentamiento, es de 15 minutos,
  - 4.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, el calentamiento, se realiza mediante microondas.
- 5.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, el rendimiento productivo de las micelas, antes de la concentración, es de por lo menos un 35%.
  - 6.- Procedimiento, según la reivindicación 5, en donde, el rendimiento productivo de las micelas, antes de la concentración, es de por lo menos un 50%.
- 30 7.- Procedimiento, según las reivindicaciones 5 y 6, en donde, el rendimiento productivo de las micelas, antes de la concentración, es de por lo menos un 80%.
  - 8.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, las micelas, tienen un tamaño medio de por lo menos 1 micrómetro.
  - 9.- Procedimiento, según la reivindicación 8, en donde, la micelas, tienen un tamaño medio de 100 900 nm, de una forma preferible, de 100 700 nm, de una forma mayormente preferible, de 200 400 nm.
- 10.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la proporción de micelas con un tamaño medio comprendido entre 100 nm y 700 nm, es mayor de un 80%.
  - 11.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, la concentración, se lleva a cabo mediante evaporación, centrifugación, sedimentación, ó microfiltrado.
- 45 12.- Procedimiento, según la reivindicación 11, en donde, la centrifugación, se lleva a cabo a una alta tasa o a una reducida tasa de aceleración, después de la acidificación a un valor pH de 4,5.
  - 13.- Procedimiento, según la reivindicación 11, en donde, la sedimentación espontánea, se lleva a cabo a un valor pH de 4,5.
  - 14.- Procedimiento, según la reivindicación 13, en donde, el tiempo de sedimentación, es mayor de 12 horas.

55

50

15

20

35



Figura 1

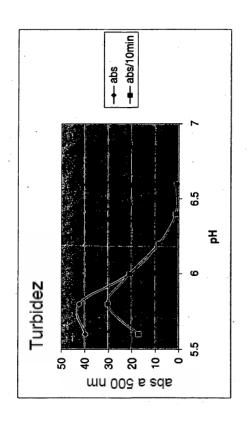
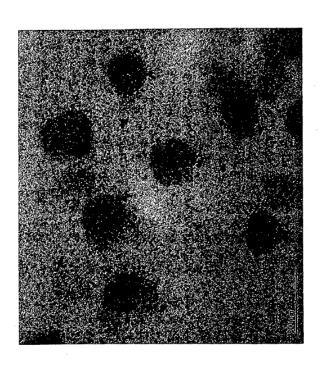
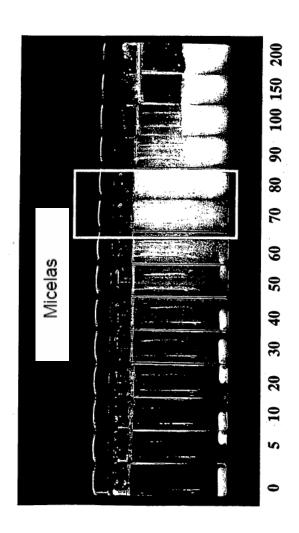


Figura 2



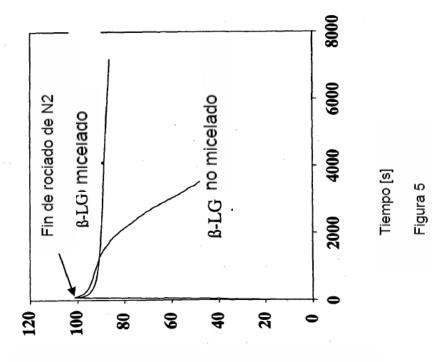
igura (



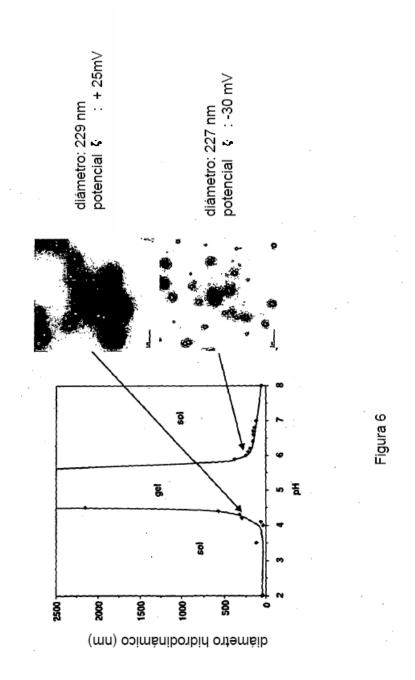
nM Arginina HCI

Figura 4

28



Estabildad volumétrica de la espuma (FVS) [%]



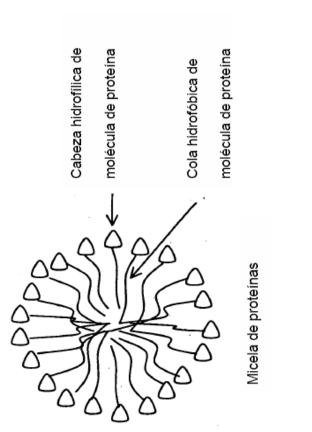
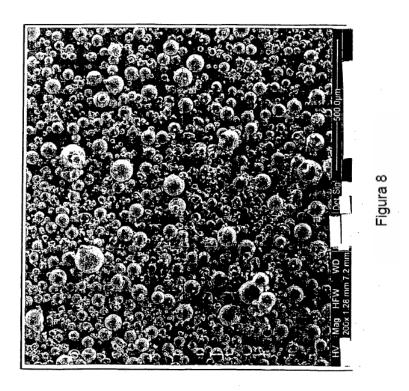
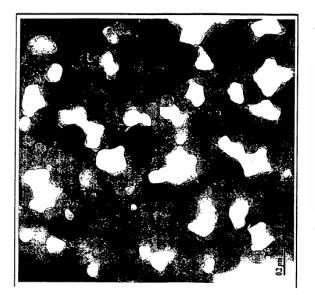
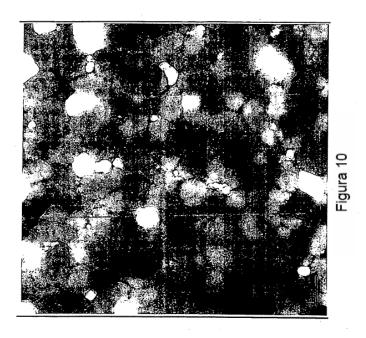


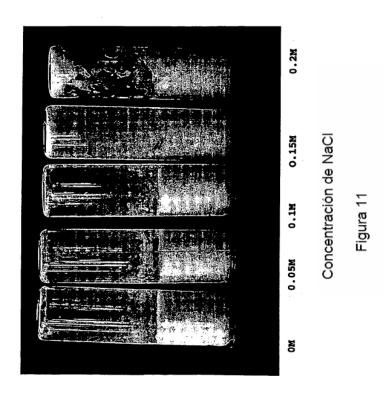
Figura 7





igura 9





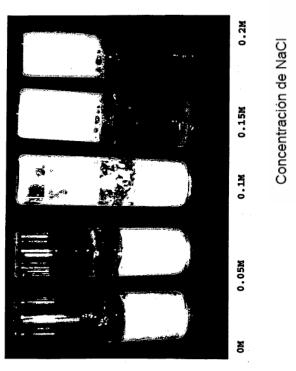


Figura 12

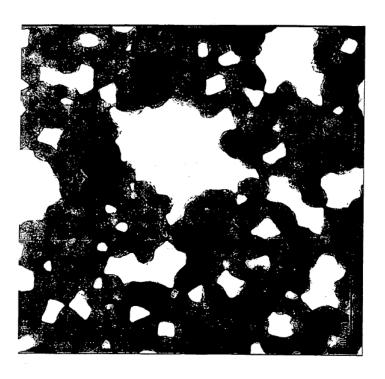
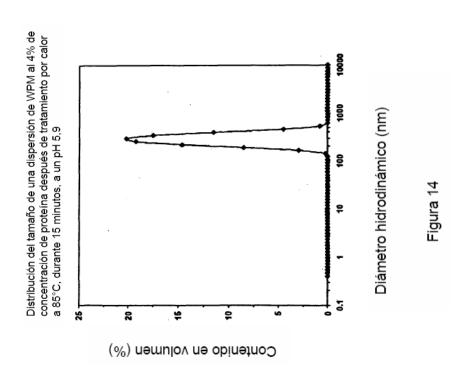
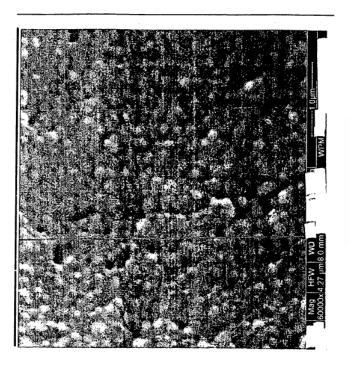
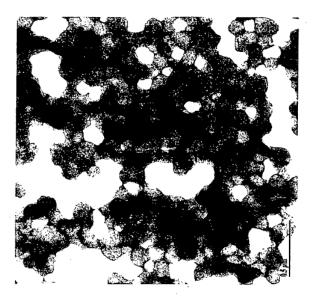


Figura 13





igura 15



igura16

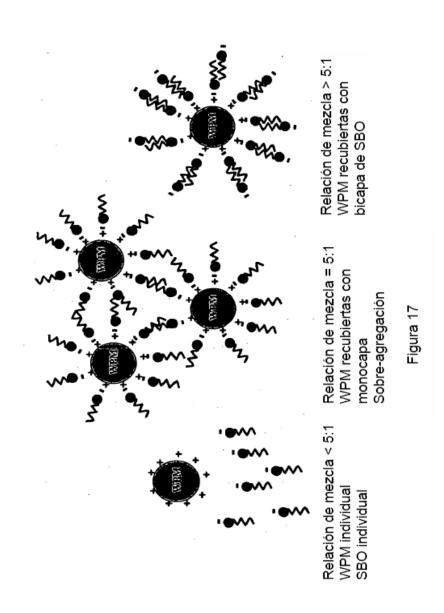




Figura 18