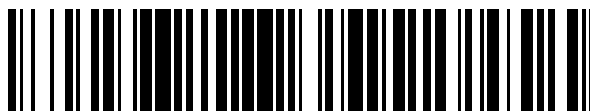


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 670**

51 Int. Cl.:  
**A23J 3/08**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07804218 .1**

96 Fecha de presentación: **12.09.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2104433**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2009**

54 Título: **Control de desnaturalización de proteínas**

30 Prioridad:  
**13.09.2006 GB 0617978**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.11.2012**

73 Titular/es:  
**NANDI PROTEINS LIMITED (100.0%)  
107 GEORGE STREET  
EDINBURGH MIDLOTHIAN EH2 3ES, GB**

72 Inventor/es:  
**CAMPBELL, LYDIA JOHANNA**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 391 670 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Control de desnaturalización de proteínas

La presente invención se refiere al tratamiento por calor de soluciones proteicas, y, más particularmente a el control del grado de desnaturalización y tamaño de partículas de las soluciones proteicas calentadas.

5 El tratamiento por calor de soluciones proteicas globulares, tales como clara de huevo, proteínas de la soja y el suero está relativamente extendido en la industria alimentaria, y se ha usado para una diversidad de fines a lo largo de los años. Dicho tratamiento implica generalmente tratamiento por calor más o menos extenso, que con frecuencia da como resultado desnaturalización completa de las moléculas proteicas, dando como resultado de la agregación extensa de las proteínas la formación de grandes agregados en el caso de soluciones más diluidas y gelificación en el caso de soluciones más concentradas. De hecho, diversos procedimientos para la preparación de agregados de proteínas del suero de suero dulce y ácido con tamaños que varían de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$  han sido el objeto de muchas solicitudes de patente en los últimos 10 años. Puede encontrarse un sumario de diversos procedimientos de la técnica anterior en la patente de Estados Unidos N° 6.767.575. Se analiza la importancia de diversas variables diferentes tales como temperatura de calentamiento, tiempos de mantenimiento, valores de pH y diferentes procedimientos de calentamiento. Ninguna de estas divulgaciones anteriores describe la preparación de agregados de proteínas del suero a partir de una solución de proteínas del suero que tenga una concentración proteica >15% en peso de agua, es decir una concentración proteica de más de 15 g por 100 g de solución. El tratamiento por calor de suero líquido a concentraciones proteicas >15% presenta un problema particular puesto que con frecuencia conduce a gelificación incontrolada. Por otro lado, la dilución del suero líquido a concentraciones proteicas <15% requiere evaporación después de desnaturalización por calor a 15-28% de proteína (correspondiente a 25-30% de sólidos totales (TS)), para permitir un secado por pulverización económico, que aumenta considerablemente los costes de procesamiento.

En general, el control de la desnaturalización no ha sido muy eficaz debido a la falta de procedimientos adecuados para supervisar el grado de desnaturalización durante el procesamiento comercial y el entendimiento un tanto limitado de los diversos procedimientos implicados en la desnaturalización inducida por calor de proteínas globulares, y en particular la importancia de la formación inicial (incluyendo exposición) de grupos -SH reactivos y la reacción de estos en procedimientos de agregación posteriores.

La patente de Estados Unidos N° 6.767.575 expone que "El control del procedimiento de la invención conseguido estableciendo el grado de desnaturalización representa la diferencia significativa entre el procedimiento de la invención y los procedimientos conocidos por los expertos en la materia". Y además: "Si la desnaturalización por calor no se lleva a cabo de una manera controlada, incluso variaciones muy pequeñas de la composición de los materiales de partida, por ejemplo diferentes contenidos de las fracciones proteicas presentes en la solución de partida, por ejemplo leche o suero, en el pH de la solución de partida y similares significan que el contenido deseado de agregados proteicos desnaturalizados (de suero) no se consigue. Como resultado, el producto obtenido no tiene por lo tanto las propiedades deseadas y no puede usarse para el fin pretendido".

La medición del grado de desnaturalización de acuerdo con la presente patente es laboriosa y consume tiempo y tendrá una duración de al menos 30 minutos hasta su compleción: En primer lugar la proteína desnaturalizada se precipita añadiendo ácido a pH 4,6 seguido de filtración; la solución filtrada se analiza por cromatografía de HPLC de fase inversa y el grado de desnaturalización se calcula mediante la relación de áreas de pico de la muestra tratada con calor y la no calentada. Esto es claramente poco práctico en el contexto de cualquier procedimiento de producción comercial, dado que con frecuencia un cambio de solamente uno o dos  $^{\circ}\text{C}$  en la temperatura de procesamiento pueden suponer la diferencia entre tratamiento satisfactorio y gelificación catastrófica, y que pueden pasarse volúmenes relativamente grandes de fluido (típicamente decenas o cientos de litros) a través de la sección de calentamiento de la planta de producción durante cada minuto de operación.

También se conocen diversos otros procedimientos de medición del grado de desnaturalización, todos los cuales padecen desventajas significativas:

## Calorimetría de exploración diferencial (DSC):

## Desventajas:

- Duración de las mediciones: al menos 30 minutos;
- No diferencia entre tamaños de partículas;
- No diferencia entre agregados solubles e insolubles.

## Hidrofobicidad:

## Desventajas:

- Sensibilidad limitada;
- No diferencia tamaño de partícula.

Dicroísmo circular (CD)

Desventajas:

- La muestra necesita lavarse abundantemente con nitrógeno durante el análisis;
- Duración: puesto que debe escanearse la solución proteica, la duración del análisis tarda de 30 minutos a 1 hora;
- Como DSC, la determinación de grupos SH, e hidrofobicidad solamente mide el grado de desnaturalización y no mide el tamaño de partículas o agregados.

Cromatografía de exclusión molecular

Desventajas:

- Duración del análisis: al menos 10 minutos;
- Requiere equipamiento complejo en planta de procesamiento. Espectroscopía: Absorbancia a 600 nm

Desventajas:

- No diferencia tamaño de partícula;
- Sensibilidad limitada.

Electroforesis en gel

Desventajas:

- Duración: 5-24 horas;
- Insensible.

Como se describe en el documento WO0249442, el presente inventor ha descubierto recientemente que, por medio de una desnaturalización inducida por calor cuidadosamente controlada de soluciones proteicas globulares, es posible obtener nuevos productos basados en proteínas con propiedades valiosas significativamente diferentes de los que pueden obtenerse por procedimientos de tratamiento térmico previamente conocidos. En más detalle, el inventor ha descubierto que, para proporcionar una limitación eficaz del procedimiento de tratamiento por calor, es necesario supervisar la cantidad de grupos -SH reactivos. Sin embargo, para facilitar la utilización comercial más eficaz de un procedimiento tal, que en la práctica generalmente implicaría procesamiento de flujo continuo de volúmenes muy grandes (típicamente miles de litros), existe la necesidad de proporcionar un medio rápido y sencillo de supervisar de forma eficaz la cantidad de grupos -SH reactivos formados en el procedimiento de tratamiento por calor, y la agregación de las moléculas proteicas desnaturalizadas resultantes de la reacción de estos grupos -SH reactivos en el transcurso del procedimiento de tratamiento por calor, para permitir un control eficaz, más o menos en tiempo real, del procedimiento de tratamiento por calor. Los problemas prácticos principales que con frecuencia pueden encontrarse en el tratamiento por calor de soluciones proteicas, en ausencia de dicho control cuidadoso del procedimiento de tratamiento térmico, incluyen bloqueos de las líneas del procedimiento por gelificación (es decir "solidificación" sustancialmente completa de la solución proteica) o acumulaciones de agregados precipitados, y quemado de tales agregados en superficies de intercambio de calor, que pueden dar como resultado pérdida sustancial o completa de material procesado, y tiempo de detención del aparato de producción sustancial para limpieza y reparación. También se apreciará que con cualquier procesamiento que implique productos naturales (tales como materiales de proteínas del suero), pueden encontrarse variaciones muy considerables en las propiedades de la solución (tales como concentración de proteínas, contenido de TS, pH, fuerza iónica, etc.) para procesar, que pueden afectar significativamente a las condiciones de procesamiento (tales como temperatura, tiempo de tratamiento, etc.), que pueden requerirse para conseguir el grado de procesamiento necesario para obtener una cualidad o propiedad deseada particular en el producto del procedimiento. Además, sucede también con frecuencia que cuando se encuentran las condiciones adecuadas en laboratorio y ensayos a pequeña escala de procedimientos de producción para producir proteínas tratadas con calor con propiedades funcionales específicas, se encuentran dificultades considerables en el aumento de la escala del procedimiento a escala industrial manteniendo las propiedades funcionales deseadas. Esto se debe entre otras cosas a cambios en propiedades de la transferencia de calor tras cambiar las proporciones de equipamiento de procesamiento térmico.

Una técnica analítica que se ha usado para supervisar la presencia de agregados en soluciones proteicas es la medición de turbidez. En la práctica, sin embargo, se llevan a cabo generalmente procedimientos de tratamiento por calor comerciales en concentraciones de proteínas relativamente diluidas (5-10% (p/v)) para evitar la gelificación. Es considerablemente ventajoso económicamente, si el tratamiento por calor pudiera llevarse a cabo de forma segura a soluciones proteicas más concentradas, que pueden contener típicamente del orden de 15 a 28% p/v de proteína, que es equivalente a 20-30% p/v TS (Sólidos Totales) (dependiendo de la fuente particular o tipo del material proteico), para evitar el requisito de una etapa de procesamiento adicional de evaporación antes de secado por pulverización. Con tales soluciones concentradas, no es posible obtener mediciones de turbidez precisas, y es necesario diluir sustancialmente la solución de muestra para permitir que se obtengan mediciones de turbidez que

sean suficientemente precisas para proporcionar indicios útiles en la práctica del nivel de agregación y tamaño de partículas agregadas, antes de intentar medir la turbidez. Tal dilución da como resultado, sin embargo, cambios sustanciales de pH y fuerza iónica, que pueden afectar considerablemente al comportamiento de las moléculas proteicas y cambiar la agregación de las mismas, dando como resultado de este modo distorsión sustancial de cualquier medición de turbidez. Otro problema con las mediciones de turbidez en tales casos es que incluso agregados relativamente pequeños pueden precipitar desde la solución (especialmente una solución sustancialmente diluida) tan rápidamente que no es posible capturar una medición de turbidez precisa y significativa.

Es un objeto de la presente invención evitar o minimizar una o más de las desventajas o los problemas descritos en el presente documento.

Se ha descubierto ahora por el presente inventor que, por medio de un procedimiento más o menos altamente sensible para determinar la turbidez de la solución proteica tratada por calor, que puede correlacionarse bien con el tamaño de los agregados formados por las moléculas proteicas desnaturalizadas, y la medición del grado de desnaturalización de las proteínas por medio del grado de formación de grupos -SH reactivo en las moléculas proteicas desnaturalizadas, pueden fabricarse agregados de tamaño y funcionalidad deseados de corrientes de suero líquido con concentraciones proteicas de hasta 28% p/v o hasta el 30% TS, con alta fiabilidad y reproducibilidad, proporcionando de este modo un procedimiento muy útil y práctico para control de calidad eficaz durante el procesamiento comercial.

En un aspecto la invención proporciona un procedimiento para supervisar el grado de desnaturalización y agregación proteica durante el transcurso de un procedimiento de tratamiento por calor que comprende las etapas de: calentar un fluido que contiene proteína acuosa a una temperatura correspondiente a una intensidad de tratamiento por calor en proximidad a una intensidad de tratamiento por calor esperada previamente establecida; recoger una muestra de la solución proteica calentada; diluir dicha muestra o dichas muestras en un tampón formulado de modo que:

el pH en dicha muestra esté sustancialmente sin cambios,  
 las condiciones iónicas en dicha muestra estén sustancialmente sin cambios, y  
 la viscosidad de dicha muestra se mantenga al menos sustancialmente, todo en relación con la muestra no diluida,  
 medir la turbidez de dicha muestra en relación con una muestra de control no tratada;  
 comparar la medición de turbidez obtenida con los límites de medición de turbidez previamente establecidos correspondientes a un intervalo de tamaño de agregados proteicos medio deseado;  
 recoger una muestra de la solución de proteínas calentada;  
 mezclar dicha muestra o dichas muestras con un sistema de medición de reacción de grupo -SH químico; y  
 comparar la medición del grupo SH obtenido con límites de medición de grupos SH previamente establecidos correspondientes a un grado deseado de desnaturalización.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un procedimiento para controlar la intensidad del tratamiento por calor para soluciones proteicas acuosas de modo que se produzcan agregados proteicos desnaturalizados por calor de tamaño de partículas y funcionalidad deseados que comprende las etapas de:

calentar la solución proteica a una temperatura correspondiente a una intensidad de tratamiento por calor próxima a una intensidad de tratamiento por calor esperada previamente establecida;  
 recoger una muestra de la solución proteica calentada;  
 diluir dicha muestra o dichas muestras en un tampón formulado de modo que:

el pH en dicha muestra esté sustancialmente sin cambios,  
 las condiciones iónicas de dicha muestra estén sustancialmente sin cambios y,  
 la viscosidad de dicha muestra se mantenga al menos sustancialmente, todo en relación con la muestra no diluida,  
 medir la turbidez de dicha muestra en relación con una muestra de control no tratada;  
 comparar la medición de turbidez obtenida con límites de medición de turbidez previamente establecidos correspondientes a un intervalo de tamaños de agregados proteicos medios deseado;  
 recoger una muestra de la solución proteica calentada;  
 mezclar dicha muestra o dichas muestras con un sistema de medición de reacción de grupo -SH químico;  
 comparar la medición del grupo SH obtenido con límites de medición de grupo SH previamente establecidos correspondientes a un grado deseado de desnaturalización; y  
 en el caso de cualquier desviación del tamaño de partícula y grado de desnaturalización deseados, ajustar la intensidad del tratamiento por calor para conformar estos al valor o los valores deseados.

Por lo tanto la presente invención puede usarse para controlar la intensidad del tratamiento por calor en relación con uno o más de establecimiento de esto para un procedimiento para un producto nuevo, un procedimiento para un producto existente cuando se usa un nuevo lote de material de partida (fluido de procedimiento) y/o para supervisar un procedimiento en el transcurso de un ciclo de producción sencillo en caso de que pudiera haber cualquier

desviación inesperada por cualquier razón, en las condiciones o parámetros del procedimiento, para que la intensidad del tratamiento por calor pueda ajustarse de modo que se contrarresten tales desviaciones.

5 En el caso de que se use el procedimiento para establecer intensidad de tratamiento por calor, entonces la solución proteica inicialmente se calentaría a una temperatura (preferentemente a una compensación pequeña) por debajo de una intensidad de tratamiento por calor esperada previamente establecida y el procedimiento incluiría las etapas de:

    aumentar la intensidad del tratamiento por calor y repetir las etapas precedentes para cada aumento de intensidad del tratamiento por calor;

    y

10     discontinuar dicho incremento de intensidad del tratamiento por calor cuando dichas comparaciones indican que:

        las mediciones tanto de grado de desnaturalización como de turbidez están dentro del intervalo deseado.

15 Típicamente esta compensación sería tal que la solución proteica se calienta a aproximadamente 5 °C por debajo de una intensidad de tratamiento por calor previamente establecida, por ejemplo se calienta por debajo de aproximadamente 3 °C, o 2 °C por debajo de una intensidad de tratamiento por calor previamente establecida, y la intensidad de tratamiento por calor se aumenta para aumentar, o reducir, la temperatura de la solución proteica de incrementos de aproximadamente 0,5 a 1 °C.

20 Cuando se usa el procedimiento para supervisar un procedimiento durante el transcurso de ejecución del mismo, entonces la solución proteica se calentaría a una temperatura sustancialmente directamente próxima a una intensidad de tratamiento por calor previamente establecida.

25 Con un procedimiento de la presente invención, es típicamente posible recoger y procesar una muestra, en un periodo de menos de 5 minutos, por ejemplo en un periodo de menos de 2 minutos, preferentemente menos de un minuto, por ejemplo menos de 30 segundos, permitiendo de este modo una detección rápida del nivel de agregación proteica y un tamaño de agregado proteico, y el grado de desnaturalización, permitiendo de este modo por un lado que la intensidad de tratamiento por calor se aumente de forma relativamente rápida hacia la intensidad requerida para obtener un producto con el grado deseado de desnaturalización y un intervalo de tamaños de agregados proteicos medios deseado, minimizando de este modo los residuos de producto subóptimo, y por otro lado, proporcionar advertencia previa rápida de acercamiento próximo a una intensidad de tratamiento por calor que daría como resultado gelificación de la solución proteica o agregación y precipitación excesivas, que puede dar como resultado interrupción de la planta de procesamiento más o menos grave. Además, las mediciones anteriores pueden realizarse fácilmente con el uso de procesamiento relativamente simple e instrumentación compacta, que puede integrarse fácilmente en un ambiente de planta de producción.

30 La presente invención también facilita considerablemente el tratamiento por calor de soluciones proteicas con concentraciones proteicas >15% p/v que es, desde un punto de vista económico, significativamente más ventajoso que el tratamiento por calor de soluciones <15% p/v, pero con frecuencia se evita en la práctica debido a los riesgos significativos de interrupción del procedimiento de producción y la planta asociada con el mismo.

35 En relación con el control de la intensidad del tratamiento por calor en el procedimiento de tratamiento por calor, se apreciará por supuesto que la intensidad del tratamiento por calor eficaz puede cambiarse de diversas maneras diferentes incluyendo entre otras ajuste de la entrada de energía en el calentador, modulación adecuada de cualquier intercambio de calor o sistema de transferencia de calor usado para transferir calor del calentador a la solución proteica, y cambiar la duración del tratamiento por calor (mediante ajuste del caudal de la solución proteica a través de la zona de tratamiento por calor en el caso de un procedimiento de flujo continuo). En ciertas realizaciones de la invención el tratamiento por calor se efectúa por inyección de vapor. Típicamente, por inyección de vapor, la temperatura máxima de tratamiento por calor de la fase acuosa es hasta 200 °C.

40 Se apreciará que el grado de desnaturalización, e intervalo de tamaños de agregados proteicos, también se verá afectado por diferentes formas de cambio de intensidad de tratamiento por calor. Por lo tanto aunque será generalmente más conveniente usar un periodo de tratamiento por calor generalmente constante (correspondiente a un caudal de solución proteica constante en un procedimiento de flujo continuo), la presente invención también puede usarse en el control de procedimientos de tratamiento por calor en los que la temperatura de tratamiento por calor se mantiene sustancialmente constante, y el periodo de tratamiento por calor aumenta progresivamente hacia el nivel de funcionamiento requerido.

También se entenderá que aunque el procedimiento de la presente invención es especialmente conveniente para su uso en el control de procedimientos de producción de flujo continuo, también puede ser útil en la preparación de procedimientos de producción discontinuos.

55 En relación con lo anterior, se apreciará que en el contexto de la presente invención, la expresión "solución proteica" indica/se pretende que abarque fluidos acuosos en los que la proteína está sustancialmente completamente disuelta. Los ejemplos de fluidos típicos incluyen soluciones, dispersiones y suspensiones acuosas de proteínas.

En relación con la medición del grado de desnaturalización, es importante medir la cantidad de grupos –SH que son de hecho reactivos, es decir disponibles para reacción química, lo que requiere el uso de un sistema de reacción química en el que el nivel de grupos reactivos se indica por el alcance de la reacción con el sistema de reacción químico, que puede medirse fácilmente por ejemplo por medio de mediciones espectrofotométricas. Un sistema de medición de reacción de grupo –SH químico adecuado tal se ha descrito por Shimada, K., Cheftel, J. C. (1988) "Determination of sulf-hydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate" Journal of Agriculture and Food Chemistry, 36, 147-153. En el caso de este sistema puede observarse que una concentración proteica de 0,5-1 g/50 ml proporciona un intervalo lineal de lectura de absorción a 412 nm, y es por lo tanto deseable que cuando este sistema de reacción químico se añada a la muestra, la concentración proteica en la mezcla resultante deba ser del orden de 1 a 2% p/v. Dependiendo de la concentración proteica en la muestra original, esta puede requerir un grado de dilución mayor o menor. Este puede conseguirse convenientemente formulando el sistema de reacción química que se añade, de modo que cuando se mezcle con la muestra, la concentración proteica se diluya eficazmente a la concentración deseada. Sin embargo también sería posible usar una solución de dilución separada.

Se entenderá que aunque diversos productos proteicos desnaturalizados por tratamiento por calor generalmente tendrán un grado deseado de desnaturalización correspondiente a un nivel del grupo –SH reactivo del orden de 50 a 100% (en relación con una muestra de control no desnaturalizada por calor, que representa 0% de desnaturalización y en relación con un control de proteína del suero desnaturalizada completamente (100%) en la que los grupos SH internados están completamente expuestos, antes del inicio de la gelificación), diferentes productos proteicos desnaturalizados por tratamiento por calor pueden tener una variación significativamente mayor en el intervalo de tamaños de agregados proteicos deseados. Esto a su vez puede afectar al grado de dilución de la muestra requerido para obtener mediciones de nivel de turbidez suficientemente precisas. En general, debería usarse un grado de dilución tal que los niveles de turbidez correspondientes al intervalo de tamaños de agregados proteicos medios deseados, no debería exceder 10000 UTN (unidades de turbidez nefelométricas), preferentemente no más de 6000 UTN. Se apreciará por supuesto que los niveles de turbidez obtenidos dependerán en un grado significativo de la concentración proteica en la solución proteica y que, en consecuencia, el grado de dilución requerido también estará relacionado en general con la concentración proteica original, y en consecuencia podría estar también relacionado con un nivel de concentración proteica deseado en la solución diluida. Típicamente este sería menor del 1% p/v, preferentemente no menos de 0,1% p/v, idealmente en el intervalo de 0,2 a 0,6% p/v. En la práctica esto implicaría generalmente el uso de diluciones del orden de 10 a 100 veces para suero 15-30% TS, y de 0 a 10 veces para suero del 5 al 15% TS. (El suero del 5 al 15% TS típicamente tiene una concentración proteica de aproximadamente 50 a 90%).

Se conocen bien en la técnica diversos tampones compatibles con solución proteica para mantener el pH y la fuerza iónica. Preferentemente el tampón no da lugar a un cambio de pH de más de aproximadamente  $\pm 0,5$ , por ejemplo menos de aproximadamente  $\pm 0,3$ . Con respecto a las condiciones iónicas, estas permanecen preferentemente relativamente constantes tras adición del tampón, por ejemplo varían menos de aproximadamente  $\pm 0,1$  micromolar, por ejemplo menos de aproximadamente  $\pm 0,05$  micromolar.

En relación con la viscosidad, se entenderá que la tasa de sedimentación de partículas aumenta significativamente con aumento del tamaño de partículas agregadas por lo que una proporción sustancial de las partículas puede retirarse de la solución de muestra antes de que pueda completarse la medición de turbidez, afectando de forma negativa de este modo a la validez de la medición. En consecuencia, será generalmente necesario controlar la viscosidad de la solución de muestra en mayor o menor grado, y más particularmente, de modo que el tiempo de sedimentación de las partículas agregadas de mayor tamaño esperadas en las condiciones del procedimiento de interés, no debería ser menos de 1 minuto, preferentemente no menos de 5 minutos. En general la viscosidad de la muestra diluida está dentro de aproximadamente  $\pm 0,5$  cP de la muestra no diluida, por ejemplo dentro de aproximadamente 0,3 cP. Las condiciones de viscosidad adecuadas pueden determinarse fácilmente como se explicará ahora con referencia a un tamaño de partícula agregada mayor de 100  $\mu\text{m}$ .

Las fórmulas usadas para calcular la sedimentación de partículas se basan en la ley de Stoke que se formula para determinar el tamaño de partículas esféricas midiendo el tiempo requerido para que las partículas sedimenten una distancia conocida en fluido de viscosidad y densidad conocidas. Una fórmula usada para calcular la distancia que viajarían las partículas con tamaño que varía de 0,1-100  $\mu\text{m}$  es como sigue:

$$d = 18 \eta_c h / (\rho_1 - \rho_2)gt$$

(en la que:

h = desplazamiento (cm)

t = tiempo (s)

g = constante gravitacional

$\rho_1 - \rho_2$  = densidad diferencial entre partículas dispersadas y el líquido ( $\text{g}/\text{cm}^{-3}$ )

d = diámetro de partícula ( $\mu\text{m}$ )

$\eta_c$  = viscosidad de fase continua (poise)).

## ES 2 391 670 T3

Otra fórmula usada para calcular la distancia que viajarían las partículas con tamaño que varía de 0,1 a 100  $\mu\text{m}$  es como sigue:

$$v_s = [d^2 \rho_s - \rho_o]g / [18 \eta_o]$$

(en la que:

- 5  $v_s$  es la velocidad de sedimentación en cm/s  
d = Diámetro de partícula = 100  $\mu\text{m}$  (100 x 10<sup>-4</sup> cm)  
 $\eta_o$  = viscosidad de 10% de solución de sacarosa = 1,167 cP  
 $\rho_o$  = densidad de 10% de solución de sacarosa = 1,036 g/cm<sup>3</sup>  
 $\rho_s$  = densidad de partículas proteicas de suero = 1,050 g/cm<sup>3</sup>).

- 10 Pueden usarse diversos materiales en el tampón de dilución para aumentar la viscosidad de la muestra diluida a un nivel adecuado sin afectar significativamente a los agregados proteicos (aparte de afectar a su tasa de sedimentación). Los materiales adecuados incluyen azúcares, por ejemplo, sacarosa, lactosa o glucosa. En el caso de sacarosa, una concentración adecuada para su uso al llevar a cabo mediciones turbidimétricas en muestras que contienen partículas de agregados proteicos que tienen un tamaño menor de 50  $\mu\text{m}$ , generalmente sería del orden de 5 a 20% p/v, preferentemente de 5 a 10% p/v.

Usando la segunda fórmula anterior se estimaría que una partícula de 100  $\mu\text{m}$  en una solución de sacarosa 10% sedimentaría a una velocidad de 0,003924 cm en 1 minuto.

- En la práctica, el procedimiento de la presente invención generalmente implicará una etapa de calibración preliminar para proporcionar dichos límites de medición de turbidez previamente establecidos correspondientes al intervalo de tamaños de agregados proteicos medidos deseado, y dichos límites de medición de grupos SH previamente establecidos correspondientes al grado deseado de desnaturalización usando un procesamiento de tratamiento por calor de una muestra representativa de la solución proteica para procesar. Normalmente se llevaría a cabo una etapa de calibración tal usando un procesamiento por tratamiento por calor a escala de laboratorio de la solución proteica, obteniéndose mediciones de turbidez y grupo -SH reactivo a través de un intervalo extendido de intensidades de tratamiento por calor progresivamente crecientes, así como obteniéndose mediciones de tamaño de partícula (directo) a través de dicho intervalo. Las mediciones de tamaño de partícula pueden obtenerse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. En la práctica estos tienden a ser relativamente incómodos y consumen tiempo, y por lo tanto son bastante inadecuados para su uso directamente en un procedimiento de producción comercial. Estos inconvenientes pueden, sin embargo, tolerarse en un procedimiento de calibración a escala de laboratorio. Una técnica conveniente que puede mencionarse en relación con esto, es el análisis de difracción de láser, que se basa en diferentes grados de difracción asociados con diferentes tamaños de partículas, y se conoce bien para la medición de tamaños de partículas de, entre otras, partículas proteicas en solución, estando fácilmente disponibles instrumentos adecuados en el mercado.

- Como se analiza posteriormente en el presente documento, el presente inventor ha descubierto que cuando se obtienen mediciones de turbidez más o menos altamente precisas, en particular mediciones de turbidez nefelométricas, entonces se encuentra una relación sustancialmente lineal entre el tamaño de partícula medio, en el que "medio" significa que el 50% (por volumen) de una población de partículas está por debajo del diámetro dado, y el nivel de medición de turbidez, por lo que puede obtenerse un buen indicio del tamaño de partículas de agregados proteicos rápida y fácilmente a partir de una medición de turbidez relativamente simple, en particular una medición de turbidez nefelométrica, sin la necesidad de llevar a cabo mediciones directas del tamaño de partícula relativamente incómodas y que consumen tiempo.

- Extendiendo dicho intervalo a una región de intensidades de tratamiento por calor progresivamente crecientes en las que tiene lugar gelificación y/o agregación excesiva, que por supuesto sería bastante inaceptable en un procedimiento de producción, es posible identificar niveles de medición de turbidez y grupo -SH reactivo, que se asocian con intensidades de tratamiento por calor estrechamente cercanas a intensidades de tratamiento por calor en las que tiene lugar gelificación y/o agregación excesiva, proporcionando de este modo advertencia previa de estas.

- Se apreciará que el intervalo de tamaño de partícula deseado y propiedades de funcionalidad, puede variar de acuerdo con los requisitos del usuario del producto de agregado proteico. Además la sensibilidad del procedimiento de agregación a cambios de la intensidad del tratamiento por calor, puede variar significativamente de una solución proteica a otra. Como ilustración puede observarse que en el caso de un producto de agregado proteico del suero desnaturalizado por calor pretendido para su uso como un reemplazo de caseinato de sodio, este tendría idealmente un intervalo de tamaño de partícula tal que al menos 50% de las partículas (en volumen) tengan un tamaño de partícula de 0,1 a 50  $\mu\text{m}$ . (En más detalle un intervalo de tamaño de partícula de 0,1-1  $\mu\text{m}$  sería útil para reemplazo de caseinato de sodio, en bebidas ácidas tales como bebidas de frutas (batidos) y reemplazo de grasas en leche desnatada pasteurizada; un intervalo de tamaño de partícula de 1-10  $\mu\text{m}$  para reemplazo de caseinato de sodio, reemplazo de grasas en yogures, aumento de viscosidad en bebidas sanas, texturización en barras dietéticas; y un intervalo de tamaño de partícula de 10-50  $\mu\text{m}$  para reemplazo de caseinato de sodio, reemplazo de grasas en

mayonesas, como un agente gelificante en postres ácidos y en análogos de embutidos, y para texturización en barras dietéticas).

5 Cuando se usa una concentración proteica del 20% p/v con un pH de 7, a un caudal de 1000 litros/hora y un tiempo de tratamiento por calor de 1 minuto, la temperatura generalmente debería estar dentro del intervalo de 68 a 72 °C. A la vista del hecho de que la aparición de gelificación de una solución proteica tal generalmente se produciría a aproximadamente 74 °C, puede verse que hay solamente un margen de aproximadamente 2 °C entre el límite superior de la temperatura de funcionamiento deseada y la aparición de gelificación. En este caso un intervalo de incremento de la temperatura adecuado generalmente sería de 1 a 2 °C, convenientemente aproximadamente 1 °C.

10 En otro aspecto la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de un producto de agregado proteico desnaturalizado por tratamiento por calor con un tamaño de partícula y funcionalidad deseados, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una solución proteica que tenga un pH en el intervalo de 6 a 9 a una concentración proteica de hasta 30 de proteína p/p, por ejemplo, hasta 20% de proteína p/p y
- b) tratamiento por calor de dicha solución a una intensidad de tratamiento por calor correspondiente a un periodo de tiempo a una temperatura elevada,

15 en el que dicha intensidad de tratamiento por calor se establece con la ayuda de un procedimiento de control de la presente invención, en el que la intensidad de tratamiento por calor se aumenta progresivamente hasta que las mediciones tanto de grado de desnaturalización como de turbidez están dentro del intervalo deseado correspondiente a la funcionalidad y tamaño de partícula deseados.

20 La presente invención puede usarse en relación con procedimientos y productos basados en una diversidad de diferentes proteínas, tales como proteínas globulares o globulinas, preferentemente proteínas globulinas, especialmente proteínas globulinas que se usan en la industria alimentaria. Las proteínas particulares que pueden mencionarse en relación con esto incluyen proteínas del suero, clara de huevo o albúmina, huevo completo, y proteína de soja. La proteína de soja en ocasiones se denomina proteína de la soja. Otras proteínas incluyen proteínas de semillas. Otras proteínas incluyen proteínas de guisantes, proteínas de judía *Jatropha*, proteína de trigo y proteína de cebada.

25 En un aspecto adicional la presente invención también proporciona un procedimiento para supervisar el grado de desnaturalización y agregación de proteínas durante el transcurso de un procedimiento de tratamiento por calor. Este puede llevarse a cabo con tanta frecuencia como se desee, por ejemplo cada pocos minutos, pero en la práctica los inventores han descubierto que generalmente es suficiente hacerlo a intervalos del orden de 1 a 4 horas.

30 En otro aspecto más la presente invención proporciona un agregado de proteínas desnaturalizadas por calor de tamaño de partícula y funcionalidad deseados, obtenido con la ayuda del procedimiento de control de la presente invención.

35 Aparecerán características y ventajas preferidas adicionales de la presente invención a partir de la siguiente descripción detallada proporcionada como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

Las Figuras 1 y 2 muestran gráficas de mediciones obtenidas de ensayos a escala de laboratorio de tratamiento por calor de solución de proteína WPC70 líquida y solución de proteína de clara de huevo a 20% y 10% TS, respectivamente.

### **Ejemplo 1 Desnaturalización de solución de proteína WPC70 a 20% TS**

#### **A. Ensayo de calibración en laboratorio**

40 El pH de 200 ml de Solución de Proteína acuosa WPC70 líquida a 25% p/v TS se ajustó a pH 6,5 y se calentó agitando a la vez en un baño de agua establecido en 75 °C. [WPC70 es proteína de suero concentrada que consiste en 70% de proteína, 15-20% de lactosa, 3-5% de grasa y 3-5% de minerales]. Se recogieron dos muestras de 200 µl después de cada aumento de 1 °C de temperatura y se diluyeron en tampón de dilución de "turbidez" (descrito adicionalmente posteriormente en el presente documento) y sistema de reacción química de grupo -SH como se describe posteriormente. Las muestras diluidas se analizaron con respecto a turbidez y grupos de sulfhidrilo libres como se describe posteriormente adicionalmente en el presente documento. Después de cada incremento de temperatura de 1 °C, se diluyó una muestra de 5 ml 3 veces en tampón de turbidez y se puso en hielo para análisis de tamaño de partícula. Como alternativa, la muestra de 5 ml puede almacenarse en hielo para análisis de tamaño de partícula posterior, que generalmente se lleva a cabo en un periodo de 1 hora. La duración del análisis de muestra con respecto a turbidez y mediciones de grupo SH reactivo no fue mayor de 1-2 minutos.

#### **Medición de turbidez.**

El medido de turbidez usado fue un Nefelómetro de Luz Blanca de Relación (operable en modos de relación y sin relación). Este equipamiento usa un detector nefelométrico a 90° de la luz incidente como el detector primario, e



incluye otros detectores para minimizar la interferencia. Además este equipamiento es portátil y de un tamaño relativamente pequeño que puede situarse fácilmente cerca del sitio en el que tiene lugar el procesamiento.

#### Procedimiento

5 Se añadieron 200  $\mu$ l de solución proteica calentada a 30 ml de tampón de dilución de "turbidez" que tenía la siguiente composición: sacarosa 10% p/v, NaCl 1% p/v y Tris 0,1% p/v, pH 6,5. En un tampón de dilución de "turbidez" alternativo el % p/v de NaCl puede omitirse. La muestra diluida puede introducirse en una cubeta de vidrio de 30 cm de longitud para análisis en el medidor de turbidez. La cubeta de vidrio se tapó y se invirtió dos veces para mezclar la solución y la turbidez se midió inmediatamente. Se usó una muestra de suero no tratado por calor como control.

#### 10 Medición de grupos sulfhidrilo

El equipamiento usado fue un colorímetro portátil que puede asirse y transportarse fácilmente al sitio en el que tiene lugar el procesamiento.

#### Procedimiento

15 Se añadieron 200  $\mu$ l de solución proteica calentada a 30 ml de "tampón de sulfhidrilo" (sistema de reacción química de grupo -SH) que tenía la siguiente composición Tris 0,086 M, EDTA 4 mM, Glicina 0,09 M, DTNB 3  $\mu$ M (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)). La muestra diluida se introdujo en una cubeta de vidrio para el fotómetro. La cubeta de vidrio se tapó y se invirtió dos veces para mezclar la solución y la absorbancia se midió inmediatamente a 412 nm. Como alternativa, la absorbancia puede medirse después de un periodo corto de tiempo, por ejemplo, en un periodo de 5 minutos, generalmente en un periodo de 1 minuto. Se usó una muestra de suero no tratado por calor como un control como anteriormente.

20 Los grupos de sulfhidrilo "totales" de la muestra de proteína de suero WPC65 no tratada por calor se determinaron antes a la misma concentración proteica y el mismo "tampón de sulfhidrilo" que anteriormente que contenía urea y SDS para desnaturalizar completamente la proteína. Este valor se tomó como 100% de desnaturalización y se calculó el porcentaje disponible de grupo sulfhidrilo usando los grupos SH "totales" como 100% de valor de desnaturalización. Como alternativa, se estableció una curva patrón antes tratando con calor WPC70 a 25% TS a pH 6,5 a temperaturas crecientes durante 1 minuto para calcular el % de desnaturalización. En esta alternativa, el patrón para desnaturalización 100% (exposición total de grupos SH internados) fue WPC70 calentada durante 1 minuto a 79 °C a 25% TS, disuelta en tampón de SH que contenía urea 6 M y SDS 0,5%. El porcentaje disponible de grupos sulfhidrilo de las muestras de ensayo se derivó de la curva patrón establecida. En este ensayo la lectura de absorbancia obtenida a 412 nm para grupos SH totales fue igual a 1, que cuando se multiplicó por 100, dio 100 unidades de absorbancia. Usando este valor, se calculó el porcentaje de desnaturalización de una muestra dada como:

$$\text{(Absorbancia de muestra de ensayo / absorbancia de muestra con grupos SH "totales")} \times 100$$

35 Si se requería, se calcularon los micromoles de SH / gramo de proteína usando un coeficiente de extinción molar de  $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  después de las mediciones.

#### Análisis del tamaño de partícula

40 Las muestras recogidas en tampón de turbidez durante las diferentes etapas de calentamiento se analizaron después (típicamente en un periodo de 1 hora) con respecto a distribución de tamaño de partícula por análisis de difracción de láser usando un Malvern Mastersizer 2000 (disponible de Malvern Ltd.) a un índice refractario de 1,47 y valor de ocultación de 6,8%.

#### Resultados

Los resultados de las diversas mediciones anteriormente descritas se representaron gráficamente en la Figura 1. Los resultados indicaron un aumento brusco de la turbidez a 73 °C, 74 °C y 75 °C (Figura 1). Se produjo gelificación a 76 °C momento en el cual no era posible por supuesto obtener ninguna medición.

45 El % de grupos SH reactivos ya comenzó a aumentar a 68 °C y alcanzó un máximo a 75 °C lo que indica desplegamiento de la estructura terciaria de la proteína. Un aumento brusco de la absorbancia a 64 y 65 °C indicó la formación de agregados. También sirvió como una advertencia previa de que la gelificación era inminente.

50 Los valores obtenidos y mostrados en la gráfica, representan la diferencia de propiedades entre proteína del suero a temperatura ambiente (no tratada con calor) y a cada aumento de temperatura indicado. Los valores de turbidez y tamaño de partícula (x100) se representan frente a la escala del eje y de la izquierda y el % de grupos SH reactivos se representan frente a la escala del eje y de la derecha.

El tamaño de partícula medio  $d(0,5)$ , que se representa en la gráfica en ( $\mu\text{m} \times 100$ ), muestra un aumento gradual

correspondiente al aumento de turbidez, alcanzando un máximo de 5,2  $\mu\text{m}$ . La gelificación se inició a 76 °C, momento en el cual fue imposible tomar muestras para mediciones de tamaño de partículas.

**B. Establecimiento de temperatura de tratamiento por calor para procedimiento de ensayo de escala piloto para producción de WPC70 tratada por calor de solución de 20% TS**

5 El material de partida para el ensayo fue 1 tonelada de WPC70 líquida obtenida después de ultrafiltración de suero ácido de fabricación de caseína. El contenido de sólidos totales (TS) fue del 20%. El pH se ajustó a 6,5 con hidróxido sódico 30%.

10 El líquido se pasó a través de un intercambiador de calor a un caudal de 1500 litros/hora. La temperatura se estableció inicialmente a 70 °C a un tiempo de mantenimiento de 1 minuto a esta temperatura, antes de enfriarse rápidamente hasta 10 °C. Esta se consideró la “etapa de precalentamiento”.

15 Aunque se había determinado en el ensayo de laboratorio que la temperatura de gelificación era de 76 °C, la validez de esta en un procedimiento de fabricación a escala de piloto aún tenía que confirmarse. Por lo tanto el líquido se precalentó a 70 °C después de lo cual la temperatura de tratamiento se aumentó progresivamente a una serie de temperaturas más altas a intervalos de 1 °C. Se recogió una muestra inmediatamente después de enfriar a cada incremento gradual de temperatura y se llevaron a cabo mediciones de turbidez y grupos sulfhidrilo reactivos como anteriormente.

**Resultados**

20 Los resultados indicaron un aumento brusco de la turbidez a 72 °C y 73 °C, similar al de la Figura 1, lo que indica que la gelificación podría ser inminente. Para los fines de confirmación de la validez de procedimiento de la presente invención, la temperatura de tratamiento por calor se aumentó adicionalmente hasta la primera señal de gelificación que se produjo a 74 °C. El procedimiento de calentamiento se detuvo entonces inmediatamente y el equipamiento de procesamiento se lavó abundantemente con agua para retirar cualquier material gelificado.

Como se confirmó que la temperatura de desnaturalización máxima para estas condiciones de procesamiento era 73 °C, el procesamiento por calor pudo repetirse y el resto de la tonelada de WPC70 líquida se trató por calor a 73 °C.

25 El material desnaturalizado tratado por calor se recogió en un recipiente de almacenamiento enfriado a 10 °C. El suero líquido tratado por calor se secó por pulverización a continuación al mismo 20% de TS, sin la necesidad de ninguna evaporación previa. El polvo secado por pulverización se analizó con respecto a tamaño de partícula (después de suspensión en agua) así como con respecto a grupos SH reactivos.

**Ejemplo 2 Desnaturalización de solución de proteína de clara de huevo a 10% TS**

30 **A. Ensayo de calibración en laboratorio**

35 El procedimiento se repitió como en el ejemplo 1, excepto que el líquido consistía en clara de huevo 8%, azúcar 1% y NaCl 1%, con sólidos totales (TS) de 10% y el pH no se ajustó puesto que el pH de la clara de huevo es normalmente aproximadamente 8. Se añadieron seiscientos microlitros (600  $\mu\text{l}$ ) del mismo al tampón de turbidez (pH 8) y se usaron 600  $\mu\text{l}$  para medición de grupos SH (puesto que se requería solamente un grado menor de dilución). Para análisis de tamaño de partícula, se diluyeron muestras de 5 ml dos veces en tampón de turbidez y se pusieron en hielo. Después del ensayo de laboratorio, se dibujó una gráfica de turbidez, grupos SH y tamaño de partículas como se muestra en la Figura 2.

**Resultados**

40 Como con la Figura 1, los valores obtenidos y mostrados en la gráfica, representan la diferencia de propiedades entre proteína del suero a temperatura ambiente (no tratada con calor) y a cada incremento de temperatura indicado. Los valores de turbidez y tamaño de partícula ( $\times 100$ ) se representan frente a la escala del eje y de la izquierda, y el % de grupos SH reactivos se representa frente a la escala del eje y de la derecha.

45 En el gráfico de la Figura 2 el nivel de los grupos SH reactivos comienza a aumentar significativamente a aproximadamente 54 °C y la turbidez comienza a aumentar significativamente a 59 °C. El nivel de los grupos SH reactivos comienza a disminuir después de 61 °C lo que indica gelificación debida a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. La lectura de turbidez alcanza un máximo a 62 °C y las partículas alcanzan un tamaño medio de 30  $\mu\text{m}$  (Figura 2)). A 63 °C la turbidez se reduce puesto que las partículas mayores de 50  $\mu\text{m}$  se hunden hasta el fondo de la cubeta. Se forma una concentración mayor de agregados mayores en comparación con el ejemplo 1, puesto que más moléculas proteicas tienen tiempo de desplegarse cuando se calientan a una concentración más diluida antes de que se establezca la gelificación como se indica por 72% de grupos SH en comparación con 63% de grupos SH en el ejemplo 1. El tamaño de partícula medio mayor se indica por una turbidez máxima de 4500 en la Figura 2 en comparación con solamente 810 en la Figura 1.

**B. Establecimiento de temperatura de tratamiento de molienda para procedimiento de ensayo a escala de piloto para producción de yema de huevo tratada por calor a solución de 10% TS**

Se pasaron 5000 kg de yema de huevo líquida que contenía azúcar 1% y sal 1%, a 10% p/v TS, a través de un intercambiador de calor a 1000 litros/hora en un tiempo de mantenimiento (tratamiento por calor) de 1 minuto. Puesto que los ensayos de laboratorio proporcionaron un indicio de que la temperatura de precipitación podría estar cerca de 63 °C, el intercambiador de calor se estableció inicialmente para calentar el líquido del procedimiento a 56 °C. La temperatura se incrementó progresivamente en intervalos de 1 °C, y la turbidez y los grupos SH se midieron en cada incremento gradual de temperatura y los valores se compararon con los del gráfico de la Figura 2. A una temperatura de 60 °C, el valor de turbidez alcanzó ya 4000 UTN y en comparación con la gráfica de la Figura 2, esto daría como resultado un tamaño de partícula de aproximadamente 30 µm. A 60 °C, el grado de desnaturalización era del 72%. Puesto que tanto el grado de desnaturalización como el valor de turbidez era satisfactorio a 60 °C, la temperatura no se aumentó más y el resto del suero líquido se trató con por calor a esta temperatura. El producto enfriado se recogió en contenedores con agitación, se evaporó a 25% TS y se secó por pulverización. El polvo se analizó con respecto a tamaño de partículas (después de suspensión en agua) así como grupos SH disponibles.

**Resultados**

Las diferencias entre las propiedades de los productos secados por pulverización finales obtenidos en los Ejemplos 1 y 2 se resumen en la siguiente Tabla.

**Tabla 1. Comparación de tamaño de partícula y grupos SH reactivos entre polvo secado por pulverización del ejemplo 1 y 2.**

	WPC70, 20% TS (Ejemplo 1)	Yema de huevo, 10% TS (Ejemplo 2)
Tamaño de Partícula medio (µm)	4,57	19,20
Grupos SH reactivos (%)	65	72

Estos resultados muestran las siguientes características del procedimiento de control de la presente invención:

- El valor de turbidez se correlaciona con tamaño de partícula medio en soluciones proteicas calentadas,
- El valor de grupo SH proporcionar un indicio reproducible del grado de desnaturalización de las proteínas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para supervisar el grado de desnaturalización y agregación de proteínas durante el transcurso de un procedimiento de tratamiento por calor que comprende las etapas de:
  - 5           calentar un fluido que contiene proteína acuosa a una temperatura correspondiente a una intensidad de tratamiento por calor próxima a una intensidad de tratamiento por calor esperada previamente establecida; recoger una muestra de la solución proteica calentada; diluir dicha muestra o muestras en un tampón formulado de modo que:
    - 10           el pH en dicha muestra esté sustancialmente sin cambios, las condiciones iónicas en dicha muestra estén sustancialmente sin cambios, y la viscosidad de dicha muestra se mantenga al menos sustancialmente, todo en relación con la muestra no diluida,
    - 15           medir la turbidez de dicha muestra en relación con una muestra de control no tratada; comparar la medición de turbidez obtenida con los límites de medición de turbidez previamente establecidos correspondientes a un intervalo de tamaño de agregados proteicos medios deseado; recoger una muestra de la solución proteica calentada; mezclar dicha muestra o muestras con un sistema de medición de reacción de grupo –SH químico; y
    - 20           comparar la medición del grupo SH obtenido con límites de medición de grupos SH previamente establecidos correspondientes a un grado deseado de desnaturalización.
  - 20       2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la proteína es una globulina o proteína globular.
  3. El procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que la proteína es una proteína del suero, yema de huevo o albúmina, huevo completo o proteína de soja.
  4. El procedimiento de una reivindicación precedente cualquiera en la que el fluido que contiene proteína acuosa comprende una concentración de proteínas de 1 a 28% p/v.
  - 25       5. El procedimiento de una reivindicación precedente cualquiera en la que el fluido que contiene proteína acuosa comprende una concentración proteica de más del 15% p/v.
  6. Un procedimiento para controlar la intensidad del tratamiento por calor para fluidos que contienen proteína acuosa en los que la proteína está disuelta de forma sustancialmente completa de modo que se produzcan agregados proteicos desnaturalizados por calor de tamaño de partícula y funcionalidad deseados, que comprende las etapas de:
    - 30           supervisar el grado de desnaturalización y agregación de proteínas durante el transcurso de un procedimiento de tratamiento por calor como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
    - 35           en el caso de cualquier desviación del tamaño de partícula o grado de desnaturalización deseado, ajustar la intensidad del tratamiento por calor para conformarla al valor o los valores deseados.
  7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que la intensidad del tratamiento por calor es ajustado para conformar el tamaño de partícula y grado de desnaturalización al valor o valores deseados en caso de cualquier desviación del tamaño de partícula y grado de desnaturalización de los valores deseados.
  - 40       8. El procedimiento de la reivindicación 6 o reivindicación 7 cuando se usa para controlar la intensidad del tratamiento por calor en relación con establecimiento de una intensidad de tratamiento por calor para un nuevo producto; establecimiento de una intensidad de tratamiento por calor para un procedimiento para un producto existente cuando se usa un nuevo lote de material de partida; o para supervisar un procedimiento existente.
  9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el fluido que contiene proteína acuosa se calienta inicialmente a una temperatura por debajo de una intensidad de tratamiento por calor esperada previamente establecida, y el procedimiento incluye las etapas de:
    - 45           aumentar el ajuste a la intensidad de tratamiento por calor,
    - 50           y repetir las etapas precedentes para cada incremento de intensidad de tratamiento por calor; y
    - 50           discontinuar dicho aumento de intensidad del tratamiento por calor cuando dichas comparaciones indican que tanto el grado de desnaturalización como las mediciones de turbidez están dentro del intervalo deseado.
  10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que el fluido es calentado inicialmente a una temperatura menor que o igual a 5 °C por debajo de una intensidad de tratamiento por calor esperada previamente establecida.
  11. El procedimiento de la reivindicación 9 o reivindicación 10 en el que dicho aumento de dicha intensidad de tratamiento por calor sirve para aumentar la temperatura de la solución proteica en incrementos de

aproximadamente 0,5 a 1 °C.

5 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 en el que la intensidad del tratamiento por calor, si se ajusta, es cambiado por ajuste de la entrada de energía al calentador, modulación de cualquier sistema de transferencia de calor o intercambio de calor usado para transferir calor del calentador a la solución proteica, o cambiando la duración del tratamiento por calor.

13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 cuando se usa para controlar un procedimiento de producción de flujo continuo o un procedimiento discontinuo.

14. Un procedimiento para preparar un producto de agregado proteico desnaturalizado por tratamiento por calor con un tamaño de partícula y funcionalidad deseados, que comprende las etapas de:

10 a) proporcionar una solución proteica con un pH en el intervalo de 6 a 9 a una concentración proteica de hasta 30 de proteína p/p; y  
b) tratamiento por calor de dicha solución a una intensidad de tratamiento por calor correspondiente a un periodo de tiempo a una temperatura elevada,  
15 en el que dicha intensidad de tratamiento por calor se establece con la ayuda de un procedimiento de control como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en el que la intensidad de tratamiento por calor se aumenta progresivamente hasta que las mediciones de tanto el grado de desnaturalización como turbidez están dentro del intervalo deseado correspondiente a la funcionalidad y tamaño de partícula deseados.

15. El procedimiento de la reivindicación 14 en el que dicha concentración proteica es de hasta 20% p/p.

20

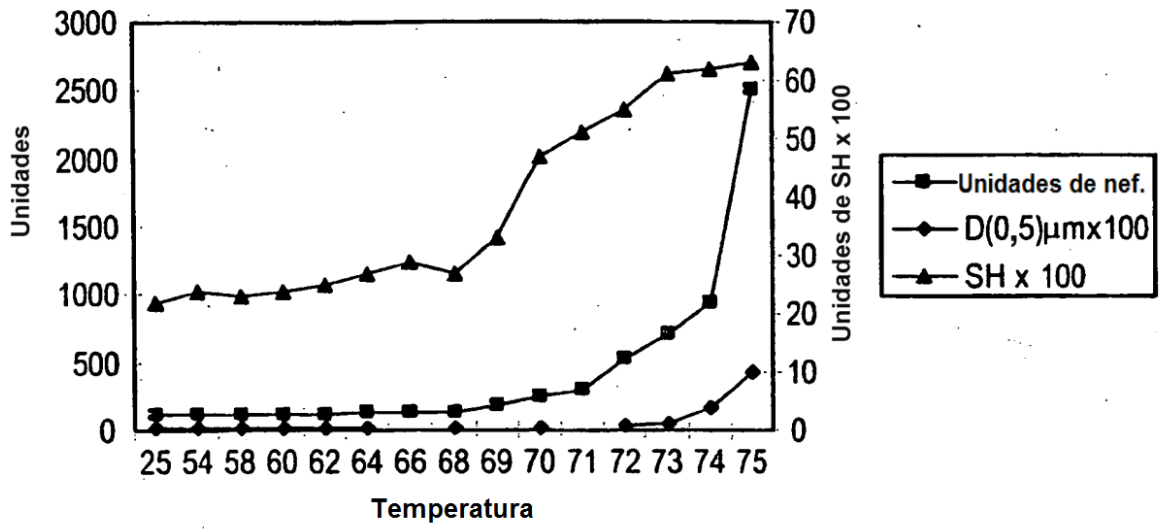


FIG. 1

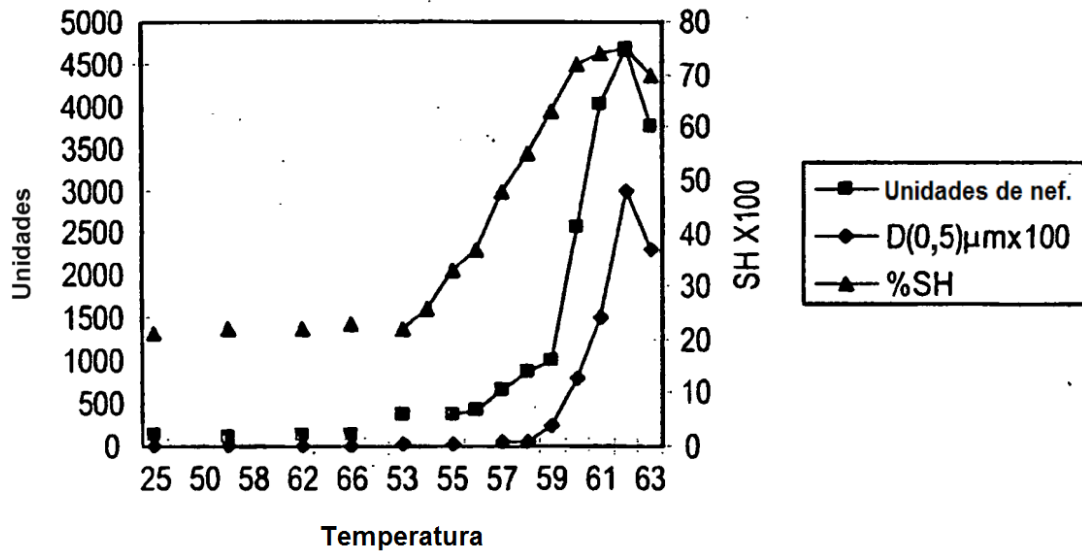


FIG. 2