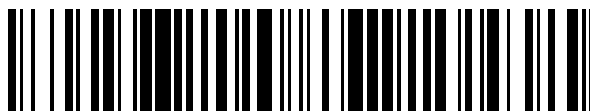


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 338**

51 Int. Cl.:

A23C 7/04 (2006.01)
A23C 9/142 (2006.01)
A23C 17/00 (2006.01)
A23C 9/14 (2006.01)
A23C 9/20 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A23L 33/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2005** **PCT/NZ2005/000262**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.04.2006** **WO06041316**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2005** **E 05801035 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016** **EP 1814399**

54 Título: **Productos lácteos de beta-suero, productos lácteos con depleción de lípidos neutros y/o enriquecidos en lípidos polares y procesos para su producción**

30 Prioridad:

12.10.2004 NZ 53589404
13.10.2004 NZ 53592004
31.05.2005 NZ 54044505

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2016

73 Titular/es:

FONTERRA CO-OPERATIVE GROUP LIMITED
(100.0%)
9 PRINCES STREET
AUCKLAND, NZ

72 Inventor/es:

FLETCHER, KATRINA;
CATCHPOLE, OWEN;
GREY, JOHN, BERTRAM y
PRITCHARD, MARK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 587 338 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

Productos lácteos de beta-suero, productos lácteos con depleción de lípidos neutros y/o enriquecidos en lípidos polares y procesos para su producción

Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos para preparar fórmulas para lactantes que comprenden beta-suero.

Antecedentes

Las fórmulas para lactantes disponibles comercialmente se producen típicamente a partir de leche no humana. Sin embargo, la composición nutricional de la leche humana difiere en algunos aspectos de la de la leche no humana (tal como de vaca, de oveja, de búfala o de cabra).

La leche entera no humana, tales como la leche de vaca, de cabra o de oveja, contiene una mayor proporción de ácidos grasos saturados que la leche humana y es deficiente en ácido linoleico y ácido alfa-linolénico, ácidos grasos poliinsaturados que son esenciales para el crecimiento y el desarrollo normales de los lactantes. Además, el ácido butírico que se encuentra en la grasa de la leche puede causar vómito pútrido en los lactantes.

Por lo tanto, las fórmulas para lactantes estándar normalmente se producen usando productos lácteos bajos en grasa, tal como la leche desgrasada. El uso de un producto lácteo bajo en grasa significa que los componentes no deseados de la grasa de la leche no están incluidos en la fórmula para lactantes, pero también significa que los niveles de fosfolípidos y (glico)esfingolípidos son significativamente inferiores a los de la leche humana.

Las investigaciones realizadas durante los últimos 5-10 años han demostrado que el aumento de los niveles de fosfolípidos y (glico)esfingolípidos en las formulaciones para lactantes a niveles encontrados en la leche humana (en particular, gangliósidos GM₃, gangliósidos GD₃, ceramidas y esfingomielina) pueden producir:

- mejora de la maduración del intestino, reduciendo de este modo el riesgo de infección;
- prevención de las infecciones mediante la modificación de la flora intestinal la unión competitiva de antígenos;
- prevención del desarrollo de alergias; y
- desarrollo neural óptimo.

Por tanto, es deseable producir una fórmula para lactantes que contenga niveles suficientes de lípidos deseables al tiempo que se minimizan o eliminan los ingredientes no deseados.

Uno de los medios utilizados actualmente para lograr esto es añadir extractos que contienen lípidos y otros ingredientes individuales a una formulación base, de modo que se produce una fórmula para lactantes con el perfil nutricional deseado. Los extractos de lípidos se pueden producir usando disolventes de extracción convencionales (por ejemplo, en el documento WO 94/18289 se describe un método para la extracción de esfingomielina partir de un concentrado de grasa que contiene fosfolípidos usando técnicas de extracción con disolventes). Tales extractos de lípidos son caros de producir. Adicionalmente es necesario realizar extensos estudios de toxicidad y seguridad antes de que se pueda obtener la aprobación regulatoria para su uso en algunas jurisdicciones.

Otro medio utilizado para lograr este objetivo es incluir suero de manteca en las fórmulas para lactantes. El suero de manteca es la corriente acuosa de subproducto producida durante uno de tres procesos:

- (1) Fabricación de mantequilla tradicional utilizando el proceso de fabricación de mantequilla de Fritz o el proceso de fabricación de mantequilla por lotes;
- (2) Producción tradicional de aceite de mantequilla (también conocido como grasa de leche anhidra o GLA) de la crema, como se muestra en la Figura 1;
- (3) Producción de aceite de mantequilla de la crema usando un proceso de dos sueros como se muestra en la Figura 2, en el que el suero de manteca se produce mediante la mezcla de las corrientes secundarias de leche desgrasada y de beta-suero.

Las fórmulas para lactantes que contienen suero de manteca contienen cantidades menores de componentes no deseados de la grasa de la leche que la leche no humana, pero niveles más altos de fosfolípidos y (glico)esfingolípidos que los productos lácteos bajos en grasa. Sin embargo, los niveles de estos lípidos deseables no son lo suficientemente altos para el suero de manteca que se va a usar en una fórmula para lactantes de suero dominante en suero de la leche con el fin de lograr los niveles de fosfolípidos y (glico)esfingolípidos similares a los de la leche humana.

Se sabe que la extracción supercrítica usando dióxido de carbono como disolvente extrae lípidos neutros a partir de polvos de suero de manteca. Astaire J. C., Ward R., German J. B. y Jimenez-Flores R. (2003) Concentration of

Polar MFGM Lipids from Buttermilk by Microfiltration and Supercritical Fluid Extraction J. Dairy Sci. 86, 2297–2307 describe la extracción supercrítica de suero de manteca usando dióxido de carbono como disolvente para producir un producto rico en proteínas y mayores niveles de lípidos polares. Sin embargo, el suero de manteca en polvo producido de este modo todavía tiene niveles bajos de lípidos polares, en un máximo de 2 % de la masa de polvo seco y es, por lo tanto, inadecuado para la fórmula para lactantes.

Una forma posible de proporcionar un producto adecuado sería separar los componentes proteicos de los componentes lipídicos en un producto lácteo.

El éter de dimetilo (DME) se ha utilizado anteriormente en la extracción de lípidos de la yema de huevo cruda (Yano et al., documento US 4.157.404) y polvo de huevo seco (Yano et al., documento US 4.234.619). El proceso hace que el fraccionamiento de los componentes lipídicos y proteicos en corrientes separadas. En el documento US 4.157.404, Yano declara que mientras que los lípidos pueden extraerse de las yemas de huevo crudas (75 % de humedad), las proteínas se desnaturalizan. En el documento US 4.234.619, Yano declara que las proteínas no se desnaturalizan si la yema de huevo está seca, pero los fosfolípidos solo pueden extraerse parcialmente.

En el documento WO 2004/066744 se describe la extracción de lípidos a partir de una corriente láctea acuosa utilizando una extracción casi crítica en la que el éter de dimetilo es el disolvente. En el documento WO 2004/066744 también se divulga que el CO₂ supercrítico o el éter dimetílico subcrítico pueden extraer lípidos con rendimientos útiles a partir de polvos lácteos de concentrado de proteínas del suero de la leche (CPS). Sin embargo, en este documento no se divulga la extracción de lípidos a partir de polvos ricos en material de la membrana de los glóbulos grasos de la leche.

La solicitud de patente europea publicada EP 1623717 informa sobre el uso de una fracción retenida de microfiltración de suero de leche o una solución obtenida mediante tratamiento mediante certificación y/o precipitación con sulfato amónico para prevenir la infección por rotavirus.

En el documento US 5.518.751 se informa sobre la producción de un producto de leche evaporada producido mediante la adición de una fracción de grasa a un líquido de leche en uno o más efectos de un evaporador.

La solicitud de patente japonesa publicada JP 5-30903 informa sobre la producción de un producto lácteo que incorpora suero de mantequilla para reforzar el producto lácteo con colesterol y fosfolípidos, que lo aproxima a la leche materna.

La solicitud de patente china publicada CN 1489914 informa sobre una leche líquida adecuada para el lactante preparada a partir de leche fresca, polvo de suero de leche desalado, lactoalbúmina concentrada, mantequilla diluida, lecitina, aceite de maíz, aceite de soja, azúcar de caña, oligosa, dextrina de malta, nutrientes y agua blanda a través de la mezcla y esterilización a temperatura ultraalta.

La solicitud japonesa publicada JP 2000-350563 informa sobre una composición nutritiva para lactantes que comprende esfingomielina o fosfolípidos que contienen esfingomielina. Preferiblemente, la esfingomielina deriva de la leche o de un concentrado de proteína de suero de la leche.

Los intentos para extraer los lípidos de las corrientes de productos lácteos en polvo con alto contenido en lactosa (donde alto es de al menos 30 % en masa del polvo total) mediante extracción con éter de dimetilo licuado no han tenido éxito.

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar productos lácteos mejorados o alternativos que se puedan utilizar en formulaciones para lactantes y/o al menos proporcionar al público una opción útil.

Divulgación de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier objeto que no entre dentro del ámbito de las reivindicaciones es únicamente para fines informativos.

El término "beta-suero", como se usa en el presente documento, significa un ingrediente lácteo acuoso separado de las corrientes lácteas que contienen más de 60 % de grasa que han pasado por inversión de fase de una emulsión de aceite en agua a una emulsión de agua en aceite. La crema es el material de partida preferido para la producción de beta-suero. Por ejemplo, el beta-suero se produce durante la producción tradicional de aceite de mantequilla (también conocido como grasa de leche anhidra o GLA) de la crema, como se muestra en la Figura 2.

El término "bajo en lactosa" significa que el contenido en lactosa es menor o igual a 30 % (sobre una base de peso seco). Más preferiblemente, el contenido en lactosa es menor o igual al 25 % (sobre una base de peso seco). Más preferiblemente, el contenido en lactosa es menor o igual al 20 % (sobre una base de peso seco). Lo más preferiblemente, el contenido en lactosa es menor o igual al 10 % (sobre una base de peso seco).

La expresión "fórmula para lactantes" como se usa en el presente documento incluye fórmulas diseñadas para lactantes de 0–12 meses de edad, fórmulas diseñadas para lactantes de 6-12 meses de edad (fórmula de seguimiento) y fórmulas diseñadas para niños y niños pequeños (1-7 años de edad, leches/leches en polvo de crecimiento).

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para preparar una fórmula para lactantes que comprende beta-suero, comprendiendo el método el aislamiento de beta-suero de una corriente láctea que contiene más de 60 % de grasa, obteniéndose la corriente láctea después de la inversión de fase de crema de una emulsión de aceite en agua a una emulsión de agua en aceite durante la producción de aceite de mantequilla o de grasa de leche anhidra a partir de crema y proporcionando el beta-suero como ingrediente en la fórmula para lactantes.

Preferentemente, la fórmula para lactantes comprende:

- (a) 30 – 60 % de lactosa
- (b) 15 – 35 % de aceites vegetales
- (c) 0 – 40 % de leche desgrasada en polvo
- (d) 0 – 40 % de concentrado de proteína de suero de la leche
- (e) 1 – 50 % de polvo de beta-suero.

Ventajosamente, la fórmula para lactantes comprende:

- (a) 40 – 60 % de lactosa
- (b) 20 – 30 % de aceites vegetales
- (c) 10 – 15 % de leche desgrasada en polvo
- (d) 6 – 8 % de concentrado de proteína de suero de la leche al 80 %
- (e) 1 – 10 % de polvo de beta-suero.

Convenientemente, la fórmula para lactantes comprende:

- (a) 40 – 60 % de lactosa
- (b) 20 – 30 % de aceites vegetales
- (c) 10 – 15 % de leche desgrasada en polvo
- (d) 6 – 8 % de concentrado de proteína de suero de la leche al 80 %
- (e) 2 – 5 % de polvo de beta-suero.

Preferentemente, la fórmula para lactantes comprende:

- (a) 40 – 60 % de lactosa
- (b) 20 – 30 % de aceites vegetales
- (c) 10 – 15 % de leche desgrasada en polvo
- (d) 6 – 8 % de concentrado de proteína de suero de la leche al 80 %
- (e) 1 – 5 % de polvo de beta-suero.

Preferiblemente, la fórmula para lactantes comprende además 2 – 4 % de al menos uno de los siguientes:

- (a) premezcla de vitaminas
- (b) premezcla de minerales
- (c) lecitina
- (d) antioxidante
- (e) estabilizante
- (f) nucleótidos.

Convenientemente, la fórmula para lactantes proporciona entre 2.700 y 3.000 kJ/l.

Los productos, composiciones y fórmulas para lactantes de la presente invención pueden ser para administración para proporcionar beneficios para la salud.

Por ejemplo, se contemplan los siguientes beneficios para la salud:

- mejora de la maduración del intestino
- reducción del riesgo de infección
- modificación de flora intestinal y unión competitiva a antígenos
- la prevención de infecciones
- prevención del desarrollo de alergias
- optimización del desarrollo neural

- tratamiento de una afección dermatológica
- optimización del desarrollo del sistema inmunológico
- mantenimiento de la función inmune óptima
- prevención o tratamiento de cáncer de colon.

5

Los inventores han descubierto que los niveles de fosfolípidos y gangliósidos en beta-suero lo hacen adecuado para su uso en el refuerzo de las fórmulas para lactantes. Los inventores también han descubierto que los productos lácteos que son altos en grasa y bajos en lactosa (incluyendo, beta-suero bajo en lactosa) pueden procesarse para reducir los niveles de lípidos neutros o aumentar los niveles de lípidos polares, o ambos, creando de este modo

10

productos que son incluso más adecuados para el refuerzo de las fórmulas para lactantes.

Los procesos descritos en la invención utilizan técnicas de procesamiento y extracción que no dejan residuos tóxicos, por lo tanto, no se requiere el procesamiento adicional del producto lácteo final.

15

Además, el uso de ultrafiltración y extracción casi crítica con dióxido de carbono como disolvente significa que debe ser más fácil obtener la aprobación regulatoria para el uso de este producto, ya que hay residuo mínimo o nada de disolvente en el producto en comparación con el uso de disolventes convencionales tales como acetona y etanol. Adicionalmente, los disolventes convencionales desnaturalizan extensamente las proteínas, lo que hace que el uso de estos disolventes no sea adecuado para la producción de productos lácteos para aplicaciones de fórmula para lactantes.

20

El término "lácteo", como se usa en el presente documento significa que contiene o se refiere a la leche y sus productos. Incluye la leche producida por seres humanos, vacas, búfalas y cabras, pero no se limita a estos animales.

25

Cada sustancia tiene su propio punto "crítico" en el que el estado líquido y de vapor de la sustancia se hacen idénticos. Por encima pero cerca del punto crítico de una sustancia, la sustancia está en un estado fluido que tiene propiedades tanto de líquidos como de gases. El fluido tiene una densidad similar a un líquido, y una viscosidad y difusibilidad similares a las de un gas. El término "supercrítico" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la región de presión-temperatura por encima del punto crítico de una sustancia. El término "subcrítico" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la región de presión-temperatura igual a o por encima de la presión de vapor para el líquido, pero por debajo de la temperatura crítica. El término "casi crítico", como se usa en el presente documento abarca las regiones tanto "supercríticas" como "subcríticas" y se refiere a las presiones y temperaturas próximas del punto crítico.

35

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un dibujo esquemático del proceso tradicional para la producción de aceite de mantequilla a partir de crema y la producción de suero de manteca durante este proceso.

40

La figura 2 muestra un dibujo esquemático del proceso para la producción de aceite de mantequilla a partir de crema y la producción de suero de manteca durante este proceso.

Ejemplos

45

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la práctica de la presente invención. Cualquier ejemplo que no entra dentro del ámbito de las reivindicaciones es únicamente para fines informativos.

Ejemplo 1: Extracción de concentrado de proteínas del suero de leche en polvo

50

Este ejemplo muestra que la extracción de lípidos a partir de polvo con altas concentraciones de proteínas de suero de leche da lugar a rendimientos muy bajos de lípidos. Los polvos de concentrado de proteína de suero de leche que contienen 80,26 % en proteína en masa, 6,83 % en masa de lípidos y 3,57 % de humedad se extrajeron con los disolventes casi críticos dióxido de carbono, propano, y éter de dimetilo (DME). El disolvente, la presión, la temperatura, la masa de sólidos usada, la masa de disolvente utilizado y los rendimientos de lípidos y sólidos extraídos se dan en la tabla 1.

55

Tabla 1: Rendimientos de lípidos para la extracción de sólidos WPC con diversos disolventes

Disolvente	Presión MPa	Temperatura C	Masa de sólidos g	Masa de disolvente usado, kg	Masa de extracto, g	Rendimiento, % de sólidos	Rendimiento, % de lípidos
CO ₂	30	44	3600,0	18,9	2,69	0,07	1,05
Propano	0,32	41	3600,0	11,8	3,97	0,11	1,56
DME	0,32	41	3600,0	10,9	4,58	0,13	1,80
DME	0,55	50,75	129,2	0,41	0,34	0,26	3,60
DME	0,55	59,95	129,1	0,42	0,56	0,43	5,95

Los rendimientos de lípidos son muy bajos y un aumento en la temperatura de extracción no aumenta el rendimiento de extracción a niveles deseados.

Ejemplo 2: Extracción de polvos de beta-suero de lactosa estándar con CO₂ supercrítico

Este ejemplo muestra que la extracción de lípidos neutros es posible a partir de polvo de beta-suero con contenido en lactosa estándar, pero que el rendimiento es significativamente menor que con los polvos cuando el contenido de lactosa se ha reducido. El contenido de proteínas y fosfolípidos totales del polvo final es bajo. Los polvos de suero beta con las siguientes composiciones se extrajeron con CO₂ supercrítico a 30 MPa y 39,85 °C: Lote, proteína total del 29,4 %, 42,5 % de lactosa, 19,7 % de grasa total, 3,1 % de humedad y 6 % de ceniza; lote 2, 31,7 % de proteína total, 44,6 % de lactosa, 20,6 % de grasa total, 2,3 % de humedad y 6,1 % de cenizas. La grasa total se compone de lípidos neutros, fosfolípidos, gangliósidos, ceramidas y cerebrósidos, tal como lactosilceramida. Los resultados de la extracción de grasa y la masa de fosfolípidos en el extracto se muestran en la tabla 2. Solo los lípidos neutros se extraen con CO₂ supercrítico, dado que los otros tipos de grasa, y especialmente los fosfolípidos, no son solubles en este disolvente.

Tabla 2: Rendimientos de lípidos para la extracción de polvos de-suero beta de lactosa estándar con CO₂

Lote	Masa de sólidos g	CO ₂ usado kg	Masa de extracto, g	Masa de fosfolípidos, g	% de rendimiento, lípidos totales	% de rendimiento, lípidos neutros
1	11108,3	73,305	944,1	0	43,14	72,3
2	9618,4	69,894	714,3	0	36,05	62,6

Las composiciones en polvo después de la extracción fueron: Lote 1, proteína total del 32,0 %, 47,9 % de lactosa, 13,6 % de grasa total, 3,8 % de humedad y 3 % de ceniza; lote 2, 34,2 % de proteína total, 44,2 % de lactosa, 11,3 % de grasa total, 3,5 % de humedad y 6,3 % de cenizas.

El polvo del lote 2 se analizó para la desnaturalización de las proteínas del suero de leche. Se asumió que las proteínas de caseína no se desnaturalizaron. Se tomó una muestra representativa de polvo y se mezcló con agua para dar aproximadamente 3 % de proteínas de suero de la leche en solución. Las caseínas se precipitaron a pH 4,6 con ácido clorhídrico y se retiraron de la solución por centrifugación. La composición de las proteínas del suero de la leche solubles restantes se determinó mediante cromatografía de fase inversa. Las proteínas del suero de la leche solubles disminuyeron de 13,43 g/100 g de proteína en la alimentación a 8,39 g/100 g de proteína en el polvo extraído. Hubo una disminución muy grande de la beta-lactoglobulina nativa (no desnaturalizada). La desnaturalización de la proteína hace que el polvo sea menos adecuado para la fórmula para lactantes que los productos que se describen en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3: Extracción de polvos de beta-suero bajos en lactosa con CO₂ supercrítico

Este ejemplo muestra que la extracción de lípidos neutros con un rendimiento superior al 90 % es posible a partir de polvos de suero beta bajos en lactosa. La reducción en el contenido de lactosa del beta suero se llevó a cabo mediante ultrafiltración a un factor de concentración de volumen de 8. El contenido de proteínas y fosfolípidos totales del polvo final es alto. Los polvos de suero beta bajos en lactosa con las siguientes composiciones se extrajeron con CO₂ supercrítico a 30 MPa y 39,85 °C: Lote 3 bajo en lactosa, proteína total del 48,3 %, 14,4 % de lactosa, 30,1 % de grasa total, 3,0 % de humedad y 4,8 % de ceniza; lote 4, 52,0 % de proteína total, 7,8 % de lactosa, 31,9 % de grasa total, 2,7 % de humedad y 4,8 % de cenizas. Los resultados de la extracción de grasa y la masa de fosfolípidos en el extracto se muestran en la tabla 3. Solo los lípidos neutros se extraen con CO₂ supercrítico, dado que los otros tipos de grasa, y especialmente los fosfolípidos, no son solubles en este disolvente.

Tabla 3 Rendimientos de lípidos para la extracción de polvos de beta-suero bajo en lactosa con CO₂

Lote	Masa de sólidos g	CO ₂ usado kg	Masa de extracto, g	Masa de fosfolípidos, en extracto, g	% de rendimiento, lípidos totales	% de rendimiento, lípidos neutros
3	6981,2	80,399	1085,7	0	51,6	90,2
4	6375,2	79,601	1085,4	0	53,4	94,0

Las composiciones en polvo después de la extracción fueron: Lote 3, 57,3 % de proteína total, 15,1 % de lactosa, 18,7 % de grasa total, 14,4 % de fosfolípidos totales, 4,1 % de humedad y 5,7 % de ceniza; lote 4, 61,6 % de proteína total, 10,1 % de lactosa, 21,9 % de grasa total, 16,8 % de fosfolípidos totales, 4,5 % de humedad y 5,6 % de cenizas. Los lotes 3 y 4 extraídos con CO₂ supercrítico también tenían niveles aumentados de gangliósidos a ~ 0,7 % en masa. La diferencia restante entre la grasa total en el polvo residual y contenido de fosfolípidos y gangliósidos se compone en su mayoría de ceramidas y cerebrósidos, especialmente lactosilceramida.

El polvo de los lotes 3 (bajos en lactosa) y 4 (muy bajo en lactosa) se analizaron para determinar la desnaturalización de proteínas para asegurar que era adecuada para su uso en la fórmula para lactantes según el ejemplo 2. Las proteínas del suero de leche solubles *aumentaron* de 12,20 g/100 g de proteína en la alimentación a 13,57 g/100 g de proteína en el polvo extraído para el lote 3; y de 12,44 g/100 g de proteína en la alimentación a 12,94 g/100 g de proteína en el polvo extraído para el lote 4. La falta de la desnaturalización de la proteína y el alto contenido de proteínas y fosfolípidos de los polvos extraídos bajos en lactosa los hacen muy adecuados para la fórmula para lactantes.

Ejemplo 4: Extracción de polvos de suero beta estándar y bajos en lactosa con CO₂ supercrítico, seguido de éter de dimetilo casi crítico

Este ejemplo muestra que la extracción de fosfolípidos con un rendimiento alto a partir de polvo de suero beta que se ha extraído previamente con CO₂ supercrítico solo es posible cuando el contenido en lactosa del polvo se ha reducido; y que la temperatura de extracción en éter de dimetilo influye en el rendimiento de la extracción. El ejemplo también muestra que es posible controlar el contenido final de fosfolípidos en el polvo después de la extracción mediante el control de la temperatura de extracción. Los lotes de polvo parcialmente desgrasado 2 (contenido en lactosa estándar, masa de alimentación 4318,7 g), 3 (bajo en lactosa, masa de alimentación 2952,6 g) y 4 (muy bajo en lactosa, masa de alimentación 2668,2 g) producidos en los ejemplos 2 y 3 se volvieron a extraer con éter de dimetilo a 4 MPa y 19,85 °C usando 12,236, 13,828 and 5,117 kg respectivamente; y después se volvieron a extraer con éter de dimetilo a 4 MPa y 49,85 °C usando 13,037, 10,962 y 6,965 kg respectivamente. Los resultados del rendimiento de extracción se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Rendimientos de fosfolípidos y lípidos totales a partir de polvos estándar y bajos en lactosa utilizando éter de dimetilo después de la extracción en CO₂ supercrítico

Lote	Contenido en lactosa	Rendimientos de la extracción en DIME a 293 °C		Rendimientos de la extracción en DME a 323 °C		Rendimientos de lípidos totales, %	
		Lípidos totales, g	% de fosfolípidos	Lípidos totales, g	% de fosfolípidos	Fosfolípido	Lípidos totales
2	47,9	56,1	64,3	14,5	63,7	14,2	61,0
3	15,1	338,6	76,8	38,9	75,5	69,1	82,6
4	10,1	318,8	77,8	32,2	77,3	60,3	82,1

El extracto de lípidos totales también contenía niveles significativos de gangliósidos, en el 2,5 % en masa para el lote 4 a 19,85 °C; y el 1 % en masa para el lote 4 a 49,85 °C. El contenido de proteínas de todos los polvos aumentó en relación con la alimentación después de la extracción en éter de dimetilo. Las composiciones en polvo después de las extracciones en CO₂ y éter de dimetilo fueron: lote 2, 34,6 % de proteína total, 47,1 % de lactosa, 8,9 % de grasa total, 6,3 % de fosfolípidos totales, 2,7 % de humedad y 6,7 % de cenizas; lote 3, 64,4 % de proteína total, 17,9 % de lactosa, 8,4 % de grasa total, 5,7 % de fosfolípidos totales, 3,6 % de humedad y 5,4 % de cenizas; lote 4, 73,2 % de proteína total, 8,7 % de lactosa, 7,6 % de grasa total, 4,3 % de humedad y 5,1 % de cenizas. Ambos polvos tenían niveles significativos de gangliósidos a aproximadamente 0,4 % en masa. La diferencia restante entre la grasa total en el polvo residual y contenido de fosfolípidos y gangliósidos se compone en su mayoría de ceramidas y cerebrósidos, especialmente lactosilceramida.

El polvo de los lotes 2 (contenido estándar de lactosa), 3 (bajo en lactosa) y 4 (muy bajo en lactosa) después de la extracción en CO₂ supercrítico y con éter de dimetilo se ensayaron para determinar la desnaturalización de proteínas según el ejemplo 2. Las proteínas del suero de la leche solubles disminuyeron de 13,43 g/100 g de la proteína para el lote 2 a 8,00 g/100 g de la proteína en el polvo extraído en DME. Las proteínas del suero de leche solubles *aumentaron* de 12,20 g/100 g de la proteína en la alimentación a 15,23 g/100 g de proteína en el polvo extraído para el lote 3; y de 12,44 g/100 g de proteína en la alimentación a 16,98 g/100 g de proteína en el polvo extraído para el lote 4. La falta de desnaturalización proteica y los contenidos altos de proteínas y fosfolípidos de los polvos bajos en

lactosa extraídos los convierten en muy adecuados para la fórmula para lactantes. La extracción con éter de dimetilo ha tenido el efecto inesperado de aumentar la solubilidad aparente de la proteína del suero de leche, que inicialmente se disminuyó mediante la retirada de la lactosa de la alimentación.

5 Ejemplo 5: Extracción de polvos de lactosa estándar y bajos en lactosa con éter de dimetilo

Este ejemplo muestra que la extracción de lípidos neutros y fosfolípidos con un rendimiento alto a partir de polvo de suero beta solo es posible cuando el contenido de lactosa del polvo se ha reducido al usar éter de dimetilo como el disolvente sin extraer previamente el polvo con CO₂ supercrítico; y que la temperatura de extracción en éter dimetílico influye en el rendimiento de la extracción. El ejemplo también muestra que es posible controlar el contenido final de fosfolípidos en el polvo después de la extracción mediante el control de la temperatura de extracción. El lote 2 (contenido en lactosa estándar, masa de alimentación 4.245,6 g) con la composición como se indica en el ejemplo 2; y los lotes 3 (bajo en lactosa, masa de alimentación 3.407,5 g) y 4 (muy bajo en lactosa, masa de alimentación 3.204,4 g) con las composiciones como se da en el ejemplo 3 se extrajeron con éter de dimetilo a 4 MPa y -0,15 - 19,85 °C usando 13,426, 12,666 y 13,938 kg respectivamente; y después se volvió a extraer con éter de dimetilo a 4 MPa y 49,85 °C usando 15,727, 11,673 y 11,123 kg respectivamente. Los resultados del rendimiento de extracción se muestran en la tabla 5.

20 Tabla 5 Rendimientos de fosfolípidos y lípidos totales a partir de polvos estándar y bajos en lactosa utilizando éter de dimetilo a 19,85 °C y 49,85 °C

Lote	Contenido en lactosa %	Rendimientos de la extracción en DME a 293 °C		Rendimientos de la extracción en DME a 323 °C		Rendimientos de lípidos totales, %	
		Lípidos totales, g	% de fosfolípidos	Lípidos totales, g	% de fosfolípidos	Fosfolípidos, %	Total
2	44,6	189,4	21,8	50,7	27,3	14,9	26,9
3	14,4	752,9	27,5	101,9	66,8	62,9	82,3
4	7,8	869,1	31,6	72,7	69,9	67,4	85,3

El contenido de proteínas de todos los polvos se incrementó en relación con la alimentación después de la extracción con éter de dimetilo. Las composiciones en polvo después de las extracciones en éter de dimetilo fueron: lote 2, 34,8 % de proteína total, 44,2 % de lactosa, 16,3 % de grasa total, 8,3 % de fosfolípidos, 2,3 % de humedad y 6,2 % de cenizas; lote 3, 65,1 % de proteína total, 15,3 % de lactosa, 8,3 % de grasa total, 5,7 % de fosfolípidos, 2,2 % de humedad y 5,3 % de cenizas; lote 4, 73,3 % de proteína total, 8,8 % de lactosa, 8,3 % de grasa total, 6,8 % de fosfolípidos totales, 2,6 % de humedad y 5,2 % de cenizas. Para los lotes 3 y 4, la diferencia entre el contenido de grasa total y fosfolípidos se compone de gangliosidos, ceramidas y cerebrósidos.

El polvo de los lotes 2 (contenido de lactosa estándar), 3 (bajo en lactosa) y 4 (muy bajo en lactosa) después de extracción con éter de dimetilo se analizó para la desnaturalización de proteínas según el ejemplo 2. Las proteínas del suero de la leche solubles aumentaron de 13,43 g/100 g de proteína a 14,38 g/100 g para el lote 1; de 12,20 g/100 g de proteína en la alimentación a 15,47 g/100 g de proteína en el polvo extraído para el lote 3; y de 12,44 g/100 g de proteína en la alimentación a 15,55 g/100 g de proteína en el polvo extraído para el lote 4. La falta de desnaturalización de proteínas y el alto contenido de proteínas de los polvos bajos en lactosa extraídos con DME los hacen adecuados para una amplia gama de aplicaciones de alimentos, especialmente nutrición deportiva. La extracción con éter de dimetilo ha tenido el efecto inesperado de aumentar la solubilidad aparente de la proteína del suero de leche, que inicialmente se disminuyó mediante la retirada de la lactosa de la alimentación. El rendimiento de la extracción de lípidos totales y fosfolípidos es muy bajo para polvo con alto contenido en lactosa (lote 2) cuando se utiliza el éter de dimetilo solo como el disolvente de extracción. El alto contenido de lípidos neutros hace que este polvo sea menos adecuado para la fórmula para lactantes.

Ejemplo 6: Niveles de fosfolípidos y gangliosidos en productos lácteos seleccionados

45 El contenido de fosfolípidos de la leche humana oscila típicamente de 200–400 mg/l (Jensen RG (1989) Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy, 2ª Edición, E. Lebenthal (Ed), Raven Press Ltd, New York, 157–208).

De acuerdo con Harzer G, Haug M, Dieterich I y Gentner PR (1983) Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. American Journal of Clinical Nutrition, 37, 612–621, la composición de fosfolípidos de la leche humana 36 días después del parto es fosfatidilcolina (PC) 24,9 %, fosfatidiletanolamina (PE) 27,7 %, fosfatidilserina (PS) 9,3 %, fosfatidilinositol (PI) 5,4 % y esfingomielina (SM) 32,4 %.

En la tabla 6 se muestra el contenido de fosfolípidos de:

- 55 – polvo de beta-suero (producto A),
- polvo de beta-suero bajo en lactosa (producto B),
- polvo de suero beta con depleción de lípidos neutros (producto C), y
- el extracto lipídico (producto D) y el polvo residual (producto E) de producto C después de la extracción en DME.

Estos productos son derivados de leche bovina.

El producto A (polvo de beta-suero) se produjo usando el método ilustrado en la Figura 2. El producto B (polvo de beta-suero bajo en lactosa) se produjo mediante ultrafiltración del producto A. El producto C se produjo usando el proceso como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los productos D y E se produjeron usando el proceso como se ha descrito para el lote 4 en el ejemplo 4, excepto que se llevó a cabo una extracción en DME de una sola etapa a 55 °C.

El contenido de fosfolípidos totales se calculó mediante el método de Röse–Gottlieb modificado cuando los extractos lipídicos se evaporaron al vacío y se liofilizaron, véase secado en horno (el secado a temperatura baja minimiza la hidrólisis de los fosfolípidos que se produce durante el secado en horno debido a la presencia de amoníaco en los extractos lipídicos). El contenido de fosfolípidos totales se calculó multiplicando el contenido de fósforo en el extracto de grasa de Röse–Gottlieb modificado por 25,5 (véase McDowell AKR (1958) Phospholipids in New Zealand dairy products. Journal of Dairy Research, 25, 192–202.)

Los fosfolípidos individuales se midieron mediante RMN de ^{31}P .

Pan XL & Izumi T (2000) Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas. Early Human Development, 57, 25–31 muestran que el gangliósido GD3 y el gangliósido GM3 representan aproximadamente el 60 % de los gangliósidos totales en la leche humana y que el contenido de gangliósidos totales de la fórmula para lactantes, tal como se mide mediante el contenido de ácido siálico unido a lípidos (LBSA), es significativamente menor que el de la leche humana. El contenido de gangliósido GD3 más gangliósido GM3 en intervalos de leche humana 10-16 mg/l en función de la etapa de lactancia (Nakano et al., 2001 Sialic acid in human milk: Composition and functions. Acta Paediatrica Taiwanica, 42, 11–17). En la tabla 6 se muestran los contenidos en el gangliósido GD3 y el gangliósido GM3 del producto A, el producto B, el producto C, el producto D y el producto E. Los niveles de gangliósido GD3 y de gangliósido GM3 se calcularon del siguiente modo: Se disolvieron muestras en cloroformo/metanol/agua 6:3:0,45 y se filtraron. Después, los gangliósidos se separaron en fracciones de GM3 y GD3 mediante extracción en fase sólida de intercambio de aniones fuertes y el ácido siálico se cuantificó mediante el método de resorcinol de Svennerholm (Svennerholm, L. 1957. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol–hydrochloric acid method. Biochim. Biophys. Acta. 24:604–611). Los niveles de ácido siálico se utilizaron después para calcular las concentraciones de GM3 y GD3.

Tabla 6 - Composiciones de lípidos polares de los productos A-E

Componente (% p/p)	A	B	C	D	E
Lípidos totales	20,6	33,9	20,9	86,1	6,3
Fosfolípidos totales	9,7	15,1	17,5	66,6	5,2
Fosfatidilcolina	2,61	4,1	4,9	13,3	1,7
Fosfatidiletanolamina	2,71	4,2	4,8	22,0	1,0
Fosfatidilserina	0,81	1,3	1,7	8,2	0,36
Fosfatidilinositol	0,61	1,0	1,2	6,1	0,35
Esfingomielina	2,71	4,2	4,4	15,1	1,8
Gangliósido GD3	0,36	0,582	0,663	2,09	0,28
Gangliósido GM3	0,04	0,062	0,053	0,34	0,0
¹ Estimado a partir de LOS valores medidos para LLBSP.					
² Estimado a partir de los valores medios para el polvo de suero beta estándar.					
³ Estimado. Estos son los resultados de otra muestra BPC60.					

Ejemplo 7: Fórmulas para lactantes que contienen productos lácteos

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de cada producto (A, B, C, D y E) que debe añadirse a la fórmula para lactantes en una base en polvo con el fin de aumentar el contenido de gangliósido "total" (gangliósido GD3 más gangliósido GM3) de la fórmula para lactantes (FI) lista para alimentación (LPA) en 16 mg/l.

Se supone que los niveles basales de estos componentes en la fórmula para lactantes estándar son 0 %, que el polvo de la fórmula para lactantes se reconstituye a 13 % de sólidos totales y que la densidad de la FI LPA es de 1,0 kg/l.

Las velocidades de adición del productos de suero beta que se muestran en la Tabla 7 también aumentan el contenido de fosfolípidos individuales de la fórmula para lactantes a niveles mayores que los encontrados en la leche humana, siendo la única excepción el producto E, en el que los niveles de PE y PS añadidos son ligeramente inferiores a los encontrados en la leche humana (los niveles basales de estos componentes en la fórmula para lactantes estándar probablemente compensen estas carencias). Obsérvese que podría usarse producto D en lugar

de lecitina de soja, que se utiliza habitualmente para fórmulas para lactantes instantáneas, lo que facilita su reconstitución.

Tabla 7 Niveles añadidos de componentes DE lípidos polares en FI LPA a 13 % de sólidos totales

Componente añadido (mg/l)	Leche materna	A	B	C	D	E
Velocidad de adición (% de fórmula para lactantes en polvo)	NA	3,08	1,92	1,73	0,51	4,40
Fosfolípidos totales	3004	388	377	394	442	297
Fosfatidilcolina	75	105	102	110	88	97
Fosfatidiletanolamina	83	109	105	108	146	57
Fosfatidilserina	28	34	32	38	54	21
Fosfatidilinositol	16	26	25	27	40	20
Esfingomielina	97	108	105	99	100	103
Gangliósido GD3+GM3	16	16	16	16	16	16
Lípido neutro añadido ⁵	NA	436	469	76	129	63

4 Media del intervalo notificada por Jensen (1989). Los fosfolípidos individuales se calculan en función de este valor medio y los porcentajes notificados por Harzer et al. (1983).
⁵ Los lípidos neutros se calculan como la diferencia entre los lípidos totales y los fosfolípidos. Sin embargo, esto es una sobreestimación, ya que incluye los glicolípidos (por ejemplo ceramidas, gangliósidos). Para poner la cantidad añadida de lípidos neutros en perspectiva, la gama ANZFA para grasa en la FI LPA es 21.600 a 45.000 mg/kg, es decir, el impacto de los lípidos neutros añadidos sobre el perfil de ácidos grasos equilibrado de la FI es pequeño, sobre todo con los productos C, D y E.
⁶ Sobre la base de Similac Advance con Iron y Enfamil LIPIL con niveles de hierro, señalando que Enfamil LIPIL Enfamil con niveles de hierro se indicaba como g por 100 cal (véase, g/100 g) de modo que se ha asumido un contenido energético de LPA de 2.800 kJ/l para este producto.
⁷ Niveles estimados de los productos de Similac y Enfamil, respectivamente.

- 5 Ejemplo 8: Fórmulas para lactantes
- Sólidos totales listos para alimentación = 13,0 %
 Proporción suero de la leche-caseína = 60:40 (proteína del suero de la leche de al menos el 60,0 % de la proteína total)
 10 Proteína objetivo⁶ = 14 g/l
 Grasa objetivo^{6,7} = 35,4 a 37,6 g/L
 Carbohidratos objetivo⁶ = 72,1 a 72,9 g/l
- 15 Estos niveles objetivo cumplen los requisitos de energía de ANZFA de la fórmula para lactantes (2.700-3.000 kJ/l). La diferencia entre la suma de los niveles de proteínas, carbohidratos y grasas y el objetivo de sólidos totales del 13 % se supuso que es las premezclas de vitaminas y minerales, antioxidantes, lecitina (utilizada para la fórmula para lactantes final instantánea), y posiblemente nucleótidos/nucleósidos. Estos componentes normalmente ascendieron a aproximadamente el 3 % de la fórmula para lactantes en polvo.
- 20 La mezcla de aceite usada en la preparación de fórmulas para lactantes comprende típicamente una mezcla de aceites vegetales con el fin de lograr un perfil de ácidos grasos similar al de la leche humana. Los aceites vegetales que se utilizan habitualmente en la fórmula para lactantes son oleína de palma rica en oleico, aceite de girasol rico en oleico, aceite de cártamo rico en oleico, aceite de coco y aceite de soja. Adicionalmente, muchas de las marcas de alta calidad también contienen aceites de pescado/microalgas y hongos como fuentes de ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico, respectivamente.
- 25 Fórmula para lactantes 1 (uso de polvo de suero beta - producto A):
- 30 Una fórmula nutricional que comprende:
- a. Aproximadamente 46,54 % de lactosa
 - b. Aproximadamente 26,92 % de mezcla de aceites (que comprende 45 % de oleína de palma rica en oleico, 20 % de aceite de soja, 20 % de aceite de coco y 15 % de aceite de cártamo rico en oleico o aceite de girasol rico en oleico)
 - 35 c. Aproximadamente 13,85 % de leche desgrasada en polvo (LDP)
 - d. Aproximadamente 6,54 % de ALACEN 392 (50 % de concentrado de proteína de suero de leche)
 - e. Aproximadamente 3,15 % de polvo de suero beta (producto A)
 - 40 f. Aproximadamente 3,00 % de premezclas de vitaminas y minerales, lecitina, antioxidantes/estabilizantes, componentes opcionales, por ejemplo, nucleótidos

Fórmula para lactantes 2 (uso de polvo de suero beta bajo en lactosa- producto B):

Una fórmula nutricional que comprende:

- 5 a. Aproximadamente 47,69 % de lactosa
- b. Aproximadamente 26,92 % de mezcla de aceites
- c. Aproximadamente 13,85 % de LDP
- d. Aproximadamente 6,54 % de ALACEN 392
- e. Aproximadamente 1,92 % de polvo de suero beta bajo en lactosa (producto B)
- 10 f. Aproximadamente 3,08 % de premezclas de vitaminas y minerales, lecitina, antioxidantes/estabilizantes, componentes opcionales, por ejemplo, nucleótidos

Fórmula para lactantes 3 (Uso del producto C):

15 Una fórmula nutricional que comprende:

- a. Aproximadamente 47,69 % de lactosa
- b. Aproximadamente 26,92 % de mezcla de aceites
- c. Aproximadamente 13,85 % de LDP
- 20 d. Aproximadamente 6,54 % de ALACEN 392
- e. Aproximadamente 1,73 % del producto C
- f. Aproximadamente 3,27 % de premezclas de vitaminas y minerales, lecitina, antioxidantes/estabilizantes, componentes opcionales, por ejemplo, nucleótidos

25 Fórmula para lactantes 4 (Uso del producto D):

Una fórmula nutricional que comprende:

- a. Aproximadamente 46,54 % de lactosa
- 30 b. Aproximadamente 26,92 % de mezcla de aceites
- c. Aproximadamente 16,15 % de LDP
- d. Aproximadamente 6,77 % de ALACEN 392
- e. Aproximadamente 0,51 % del producto D
- f. Aproximadamente 3,11 % de premezclas de vitaminas y minerales, lecitina, antioxidantes/estabilizantes,
- 35 componentes opcionales, por ejemplo, nucleótidos

Fórmula para lactantes 5 (Uso del producto E):

Una fórmula nutricional que comprende:

- 40 a. Aproximadamente 50,77 % de lactosa
- b. Aproximadamente 26,92 % de mezcla de aceites
- c. Aproximadamente 8,23 % de LDP
- d. Aproximadamente 6,00 % de ALACEN 392
- 45 e. Aproximadamente 4,40 % del producto E
- f. Aproximadamente 3,68 % de premezclas de vitaminas y minerales, lecitina, antioxidantes/estabilizantes, componentes opcionales, por ejemplo, nucleótidos

50 Los ejemplos anteriores son ilustraciones de la práctica de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que la invención puede llevarse a cabo con numerosas variaciones y modificaciones. Por ejemplo, las temperaturas y presiones para las extracciones se pueden variar, al igual que el contenido de proteínas y lactosa de los materiales de partida.

55 Asimismo, se apreciará que los productos lácteos de la presente invención también se pueden usar en productos para beneficio nutricional dermatológica o general en el consumidor, incluyendo nutrición deportiva y alimentos para ancianos.

60 El término "que comprende", como se usa en esta memoria descriptiva, significa "que consiste al menos en parte, es decir, al interpretar las declaraciones en esta memoria descriptiva que incluyen ese término, las características, con prefacio de ese término en cada declaración, todos tienen que estar presentes pero otras características también pueden estar presentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una fórmula para lactantes que comprende beta-suero, comprendiendo el método:
 - 5 aislar beta-suero de una corriente láctea que contiene más de 60 % de grasa, obteniéndose la corriente láctea después de la inversión de fase de la crema desde una emulsión de aceite en agua a una emulsión de agua en aceite durante la producción de aceite de mantequilla o de grasa de leche anhidra a partir de crema; y proporcionar el beta-suero como un ingrediente en la fórmula para lactantes.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la fórmula para lactantes comprende:
 - (a) 30 – 60 % de lactosa
 - (b) 15 – 35 % de aceites vegetales
 - (c) 0 – 40 % de leche desgrasada en polvo
 - 15 (d) 0 – 40 % de concentrado de proteína de suero de la leche
 - (e) 1 – 50 % de polvo de beta-suero.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la fórmula para lactantes comprende:
 - 20 (a) 40 – 60 % de lactosa
 - (b) 20 – 30 % de aceites vegetales
 - (c) 10 – 15 % de leche desgrasada en polvo
 - (d) 6 – 8 % de concentrado de proteína de suero de la leche al 80 % (WPC80)
 - (e) 1 – 10 % de polvo de beta-suero.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que la fórmula para lactantes comprende:
 - (a) 40 – 60 % de lactosa
 - (b) 20 – 30 % de aceites vegetales
 - 30 (c) 10 – 15 % de leche desgrasada en polvo
 - (d) 6 – 8 % de concentrado de proteína de suero de la leche al 80 % (WPC80)
 - (e) 2 – 5 % de polvo de beta-suero.
5. El método de la reivindicación 3, en el que la fórmula para lactantes comprende:
 - 35 (a) 40 – 60 % de lactosa
 - (b) 20 – 30 % de aceites vegetales
 - (c) 10 – 15 % de leche desgrasada en polvo
 - (d) 6 – 8 % de concentrado de proteína de suero de la leche al 80 % (WPC80)
 - 40 (e) 1 – 5 % de polvo de beta-suero.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la fórmula para lactantes comprende además 2-4 % de al menos una de las siguientes:
 - 45 (a) premezcla de vitaminas
 - (b) premezcla de minerales
 - (c) lecitina
 - (d) antioxidante
 - (e) estabilizante
 - 50 (f) nucleótidos.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fórmula para lactantes proporciona entre 2.700 y 3.000 kJ/l.

Figura 1

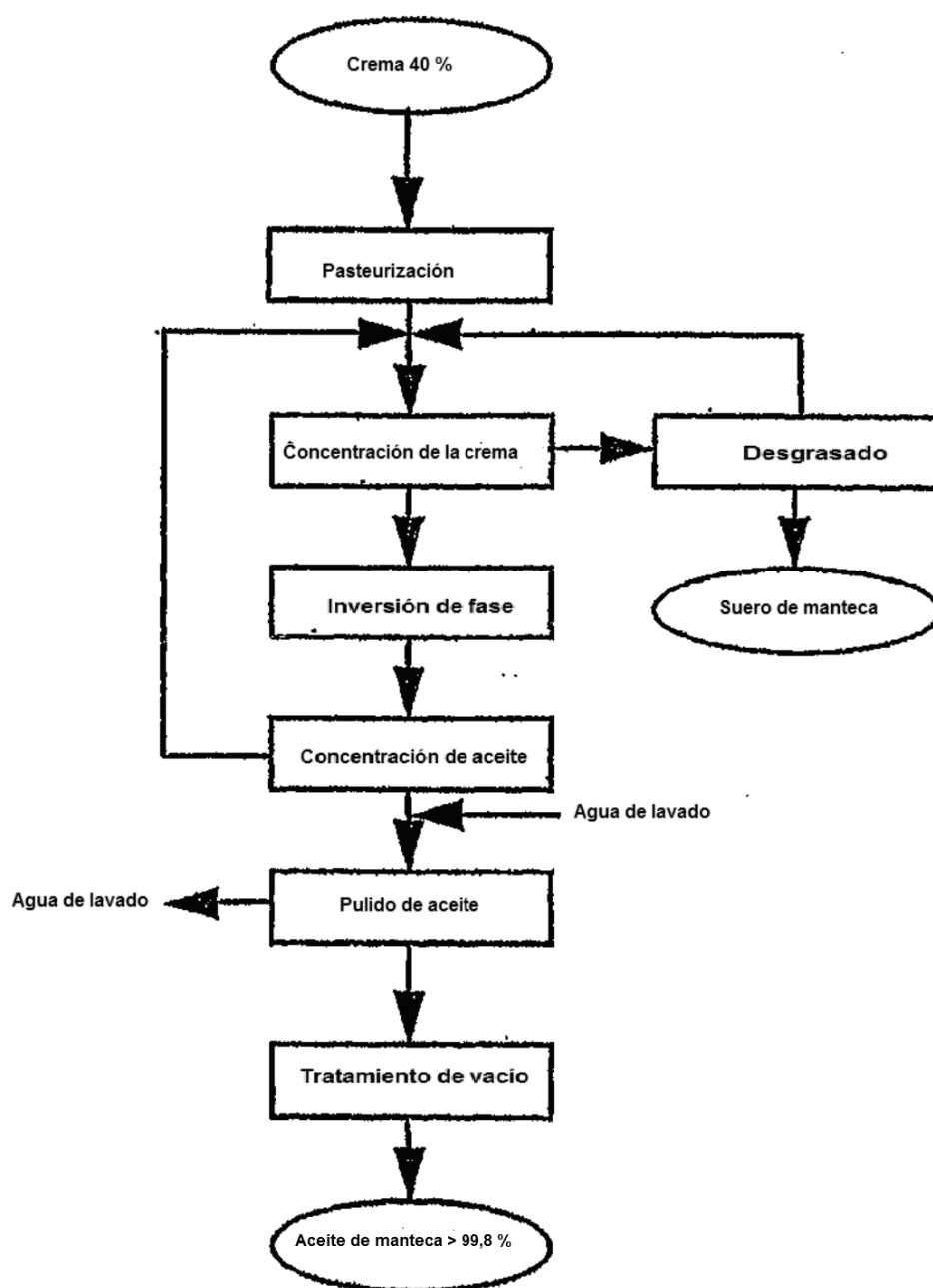


Figura 2

