

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 207**

51 Int. Cl.:

A23C 3/033 (2006.01)

A23L 3/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/EP2012/063218**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12732663 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2729011**

54 Título: **Proceso de tratamiento de campo eléctrico por pulsos de productos que comprenden moléculas bioactivas de la leche**

30 Prioridad:

08.07.2011 EP 11173191

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

31.01.2017

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**MATHYS, ALEXANDER;
TOEPFL, STEFAN;
SIEMER, CLAUDIA;
FAVRE, LAURENT;
BENYACOUB, JALIL y
HANSEN, CARL, ERIK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 599 207 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

Proceso de tratamiento de campo eléctrico por pulsos de productos que comprenden moléculas bioactivas de la leche

5 La presente invención se relaciona con un método para reducir la carga microbiana en una composición líquida o viscosa, que comprende el uso de un tratamiento de campo eléctrico por pulsos.

La técnica precedente y problemas para resolver por la invención

10 La seguridad microbiológica es el requisito más importante para los alimentos. Los microorganismos que pueden encontrarse en los alimentos pueden causar enfermedades muy diversas, tales como, por ejemplo, listeriosis. Valores funcionales nutricionales altos, así como buen sabor son importantes requisitos adicionales para los alimentos. Los procesos de producción y conservación convencionales garantizan la seguridad microbiológica, pero el sabor y el contenido nutricional están influidos de una forma negativa debido a estos procesos. Por consiguiente, han de desarrollarse nuevos procesos para minimizar la influencia de un proceso sobre los componentes nutricionales y saludables. Además, las demandas para los nuevos procesos son para que sean ecológicos y económicamente justificables.

20 La leche es un alimento nutricionalmente valioso, que comprende -además de macronutrientes esenciales- vitaminas y otras moléculas bioactivas con propiedades o actividades promotoras de la salud que son beneficiosas para el consumidor de diversas formas. Tradicionalmente, en los procesos a gran escala, la seguridad microbiológica de la leche está garantizada por la pasteurización térmica o el tratamiento térmico a temperatura ultra alta (UHT, de *ultra-high heat treatment*). Ambos procesos resultan en una degradación sustancial de moléculas bioactivas que están presentes de forma natural en la leche, tal como se ha publicado abundantemente en la bibliografía. En particular, muchas vitaminas y proteínas bioactivas que están presentes de forma natural en la leche son sensibles al calor. Además, los métodos de conservación que usan calor para conservar alimentos afectan desfavorablemente al sabor de los alimentos.

30 Por consiguiente, se necesitan nuevos métodos de conservación, que, preferentemente, no usen el calor para la conservación. Un posible proceso de conservación no térmico es la aplicación de campos eléctricos por pulsos (CEP). Este método usa la corriente eléctrica para inactivar los microorganismos y para mantener la seguridad microbiológica de los alimentos. Este método no influye prácticamente sobre los ingredientes y el sabor. El mecanismo tras el proceso para inactivar a los microorganismos se llama electroporación. Debido al campo eléctrico alternante con altos voltajes, la membrana celular se permeabiliza y el resultado es una lisis celular.

35 M. Walkling-Ribeiro et al., Int. J. Food Microbiol. 144 (2011) 379-386, comparan y combinan la eficacia del tratamiento de CEP, la microfiltración y la pasteurización térmica convencional sobre la inactivación microbiana. Esta publicación no discute la pérdida de moléculas bioactivas asociada con los diferentes tratamientos y, de hecho, las condiciones usadas para el tratamiento de CEP de la leche en esta publicación hacen improbable que las moléculas bioactivas mantengan su actividad durante el transcurso del proceso.

45 El documento US 2008/0317823 propone un método de presión que trata una composición bioactiva con el fin de aumentar su conservación (periodo de caducidad). Los tratamientos de presión que se desvelan en este documento suponen un considerable gasto energético y económico. Además, los tratamientos de presión son procesos discontinuos y sería ventajoso tener un tratamiento continuo para aumentar la seguridad microbiana de los productos a base de leche.

50 Toepfl, S., Heinz, V. y Knorr, D. (2006) describen el conocimiento actual sobre las aplicaciones de la tecnología de campo eléctrico por pulsos para la industria alimentaria en: Pulsed Electric Field Treatment of Foods, Ed: Raso, J. y Heinz, V., págs. 197-221, Elsevier, Oxford, RU.

55 A la vista de lo anterior, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para reducir la carga microbiana en un alimento líquido o viscoso que comprende moléculas bioactivas, al tiempo que mantiene la actividad y funcionalidad de las moléculas bioactivas presentes en el alimento.

En otras palabras, es un objetivo proporcionar un método para aumentar o garantizar la seguridad microbiológica de una composición líquida o viscosa que comprende moléculas bioactivas, en el que dicho método no reduce, o no lo hace en una medida importante, la actividad o contenido de moléculas bioactivas que están presentes en el alimento.

60 Es un objetivo de la presente invención conservar específicamente la actividad biológica de las moléculas bioactivas que están presentes de forma natural en la leche. Sin embargo, es necesario reducir sustancialmente el número de microorganismos, en particular de microorganismos viables que podrían estar presentes en la leche, preferentemente por debajo de un nivel de detección.

65 Es un objetivo de la invención proporcionar un método de pasteurización no térmico que sea tan eficaz como la pasteurización térmica en cuanto a aumentar la seguridad alimentaria y reducir los recuentos microbianos, pero que no

presente las desventajas de la pasteurización térmica. Dichas desventajas son desnaturalización de proteínas y la pérdida de moléculas bioactivas, la pérdida de bioactividad de las moléculas presentes en la leche, el cambio de sabor y, a veces, el cambio de color.

5 Más específicamente, la presente invención aborda el problema de la inactivación de componentes bioactivos en la leche durante la pasteurización térmica o la conservación. La pasteurización térmica se efectúa normalmente con leche líquida. Las temperaturas están alrededor de 72 °C y durante no menos de 15 segundos de tiempo de espera (Kessler 2006, International Dairy Federation (Federación internacional de la lechería), página 175), lo cual es una intensidad de procesamiento demasiado alta para los componentes bioactivos, en particular, proteínas bioactivas tales como lactoferrina, IgA, IgG, TGF-β1 y 2.

10 La presente invención también aborda el problema de obtener una composición, en particular leche, que tenga una carga microbiana reducida en comparación con una composición no tratada o que tenga una carga microbiana que no sea importante para la seguridad y/o periodo de caducidad del producto.

15 La invención también aborda el problema de obtener formas líquidas o deshidratadas de composiciones, tales como composiciones basadas en leche o que comprenden componentes de la leche, incluyendo leche en polvo, suero lácteo en polvo, caseína en polvo, proteínas lácteas en polvo y similares, en las que las moléculas bioactivas presentes de forma natural en la leche permanecen activas en las composiciones deshidratadas, en particular en las deshidratadas por pulverización. Los procesos de deshidratación por congelación o deshidratación por pulverización con bajas temperaturas pueden llevarse a cabo sin destruir la actividad de las moléculas bioactivas, o sin destruirla completamente.

20 La presente invención aborda los objetivos anteriores y proporciona métodos, usos y composición para obtener los beneficios expuestos anteriormente. Los objetivos y problemas abordados por la presente invención son parte de la presente invención.

Sumario de la invención

30 La presente invención se basa en el hallazgo de que los tratamientos de campo eléctrico por pulsos pueden usarse de una manera eficaz para eliminar incluso cepas microbianas resistentes que pueden encontrarse en la leche. De manera interesante, pudieron identificarse parámetros del proceso con los cuales la actividad de moléculas bioactivas que están presentes de forma natural en la leche, en particular en la leche sin procesar, podrían conservarse en una cantidad sustancial.

35 El método de la invención es particularmente ventajoso en comparación con la pasteurización térmica en lo que concierne a la integridad de las proteínas y la actividad de las vitaminas que aparecen de forma natural en la leche. Las proteínas contenidas en la composición de la invención conservan en una medida sustancial su constitución nativa y, por tanto, pueden ejercer su actividad biológica en una medida sustancial. Por lo tanto, la invención proporciona también una composición tratada con CEP que comprende una o más proteínas específicas que aparecen de forma natural en la leche, en la que una cantidad sustancial de dichas proteínas está presente en una forma nativa.

40 En un aspecto, La presente invención proporciona un método de obtener una composición que es nutricionalmente y/o microbiológicamente segura y que comprende moléculas bioactivas presentes en la leche sin procesar en forma activa y/o que proporciona los beneficios saludables de moléculas bioactivas presentes en la leche sin procesar.

45 En un aspecto, La presente invención proporciona un método de obtener una composición que es nutricionalmente y/o microbiológicamente segura y que comprende moléculas bioactivas presentes en la leche sin procesar en forma nativa y/o que proporciona los beneficios saludables de moléculas nativas presentes en la leche sin procesar.

50 De acuerdo con un aspecto, la invención se relaciona con un método para aumentar y/o garantizar la seguridad de una composición, comprendiendo el método la etapa de someter a dicha composición a un tratamiento de CEP.

55 De acuerdo con un aspecto, la invención se refiere a un método de aumentar el periodo de caducidad, en particular en condiciones de refrigeración, de una composición, comprendiendo el método la etapa de someter a dicha composición a un tratamiento de CEP.

60 De acuerdo con un aspecto, La presente invención se relaciona con un método para reducir la carga microbiana en una composición, comprendiendo el método la etapa de someter a dicha composición a un tratamiento de CEP.

De acuerdo con un aspecto, La presente invención se relaciona con un método para eliminar sustancialmente el recuento microbiano en una composición, comprendiendo el método la etapa de someter a dicha composición a un tratamiento de CEP.

65 De acuerdo con un aspecto, la invención se relaciona con un método para inactivar microorganismos en una composición en caso de o en la medida en que estén presentes en dicha composición, comprendiendo el método la

etapa de someter a dicha composición a un tratamiento de CEP. El método se lleva a cabo, por tanto, preferentemente como medida de seguridad cautelosa, aun cuando no se espere que pueda haber microorganismos, en particular, microorganismos patógenos, en la composición.

- 5 La presente invención proporciona un método para reducir la carga microbiana de una composición líquida o viscosa que comprende una o más moléculas bioactivas que aparecen de forma natural en la leche, comprendiendo el método las etapas de someter a dicha composición a un tratamiento de campo eléctrico por pulsos (CEP). en el que en dicho tratamiento de CEP, se expone dicha composición a una energía específica de 600 kJ o menos por kg de composición y en el que dicha composición se expone a un CEP con una fuerza de campo de 10 a 20 kV/cm, en el que dicho tratamiento de CEP se aplica en una o más cámaras de tratamiento colineales que tienen un canal central, en el que dicha composición se guía de forma continua a través de dicho canal central de dicha cámara de tratamiento colineal y en el que se proporciona un elemento interior que es inerte y no conductor dentro de dicho canal central, de forma que, en dicha cámara de tratamiento, dicha composición se guía alrededor de dicho elemento interior.
- 10
- 15 En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición tratada con campo eléctrico por pulsos (CEP), que es microbiológicamente segura y que comprende una o más moléculas bioactivas que aparecen de forma natural en la leche, en la que al menos un 30 % de la molécula respectiva está en una forma activa. Dichas moléculas bioactivas se seleccionan preferentemente de entre: proteínas seleccionadas a partir de factores antimicrobianos, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, citocinas y/o factores pro/antiinflamatorios, quimiocinas, enzimas, incluyendo enzimas digestivas, hormonas y transportadores, glucomacropéptido, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, proteínas de la membrana del glóbulo graso lácteo y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente; uno o más lípidos bioactivos que están presentes de forma natural en la leche tales como butirato, esfingolípidos, fosfolípidos, membranas del glóbulo graso lácteo, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; uno o más vitaminas que están presentes de forma natural en la leche tales como vitamina A, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, D y K; ácido siálico, ácidos nucleicos, oligosacáridos, aminoácidos y taurina, en la que dicha composición tiene una carga microbiana que está suficientemente reducida como para ser segura para el consumo humano, en la que al menos un 30 %, más preferentemente al menos un 35 %, preferentemente al menos un 40 % de dichas moléculas seleccionadas están presentes en una forma activa y/o nativa.
- 20
- 25
- 30 En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición, en particular una composición tratada con CEP, que es microbiológicamente y/o nutricionalmente segura y que comprende moléculas bioactivas presentes en la leche sin procesar en forma activa y/o que proporciona los beneficios saludables de moléculas bioactivas presentes en la leche sin procesar.
- 35 En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición, en particular una composición tratada con CEP, que es microbiológicamente y/o nutricionalmente segura y que comprende una o más proteínas que aparecen de forma natural en la leche, en la que en la que al menos parte de dicha proteína está presente en forma nativa y/o donde la composición proporciona uno o más beneficios saludables de la leche sin procesar y/o de las proteínas nativas.
- 40 En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición tratada con campo eléctrico por pulsos (CEP), que comprende al menos una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de la proteína que aparece de forma natural en la leche, en la que en la que al menos un 30 % de dicha proteína está presente en una forma nativa.
- 45 En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición tratada con CEP, que es microbiológicamente segura y que comprende una o más proteínas que aparecen de forma natural en la leche, en la que al menos un 30 % de la proteína respectiva está en una forma activa.
- 50 En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición tratada con campo eléctrico por pulsos (CEP) que comprende una o más proteínas que tienen una actividad biológica, en la que dicha actividad corresponde a al menos un 30 % de la actividad que se encuentra en un control no tratado y/o en la que al menos un 30 % de dicha proteína está presente en una forma nativa.
- 55 Los métodos de la invención son ventajosos en cuanto a que no inactivan, o lo hacen sólo en una medida comparativamente baja, las moléculas biológicas que están presentes en la composición.
- En las reivindicaciones adjuntas se proporcionan aspectos adicionales y realizaciones preferidas de la invención y se exponen con más detalle en la descripción más adelante en el presente documento.
- 60 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 muestra de forma esquemática la estructura o diseño general de una cámara de tratamiento de CEP colineal, que se usa de acuerdo con una realización preferida del método de la invención.
- 65 La figura 2 muestra de forma esquemática un diagrama de circuito de un circuito que puede usarse para crear pulsos eléctricos para realizar un tratamiento de CEP de acuerdo con la invención.

La figura 3 muestra de forma esquemática un sistema de CEP de ejemplo para tratar mediante CEP composiciones líquidas o viscosas de acuerdo con la invención.

5 La figura 4 muestra un par de cámaras de tratamiento tal como se usan en el sistema de CEP que se muestra en la figura 2.

La figura 5 es una vista en alzado con respecto a una cámara de tratamiento colineal que comprende un inserto de acuerdo con una realización preferida del método de la invención.

10 La figura 6 es una vista en sección longitudinal de la cámara de tratamiento que se muestra en la figura 5.

Las figuras 7A y 7B muestran el efecto de la temperatura inicial de la leche sin procesar y la energía específica aplicada en un tratamiento de CEP sobre la inactivación, respectivamente, de *E. coli* y *L. innocua* añadidas. A una temperatura inicial de 30 °C, se necesita menos energía específica para alcanzar la inactivación.

15 La figura 8 muestra la inactivación por CEP del recuento microbiano de *E. coli* y *L. innocua* en leche sin procesar inoculada dependiente de la energía específica. La temperatura de la leche sin procesar se ajustó a 30 °C antes del tratamiento de CEP y se usó un par de cámaras de tratamiento colineal con un inserto tal como se muestra en la figura 6. La figura 8 muestra que la máxima inactivación microbiana se alcanzó a 244 kJ/kg.

20 Las figuras 9 A y 7B muestran el efecto de la temperatura inicial de la leche sin procesar y la energía específica aplicada en un tratamiento de CEP sobre la inactivación de los recuentos de ufc, respectivamente, de *E. coli* y *L. innocua* añadidas a leche sin procesar que tenía una temperatura inicial de 30 °C. El diseño usando una cámara de tratamiento colineal con un inserto "torpedo" (figura 6) necesita menos energía específica para alcanzar la inactivación.

25 Las figuras 10 A y B muestran el efecto del diseño de la cámara de tratamiento y la temperatura final de la composición tratada con CEP sobre la inactivación de los recuentos de ufc, respectivamente, de *E. coli* y *L. innocua* añadidas a la composición (leche sin procesar). El uso de una cámara de tratamiento colineal con un inserto ("torpedo") es el más ventajoso, porque el aumento de temperatura debido al tratamiento de CEP permanece más bajo con respecto a una inactivación microbiana dada.

30 La figura 11 muestra la presencia de lactoferrina en la leche después de tratamiento de CEP de leche sin procesar a energías específicas crecientes. La actividad/integridad de la molécula bioactiva (lactoferrina) se mide mediante ELISA usando un par de anticuerpos que son específicos para lactoferrina nativa. A una energía específica de 244 kJ/kg, la mayor parte de la lactoferrina aún es nativa.

35 La figura 12 es como la figura 11, con la diferencia de que la molécula bioactiva es IgA.

40 La figura 13 es como la figura 11, con la diferencia de que la molécula bioactiva es IgG.

La figura 14 es como la figura 11, con la diferencia de que la molécula bioactiva es TGF-β1.

45 La figura 15 es como la figura 11, con la diferencia de que la molécula bioactiva es TGF-β2.

La figura 16 es un gráfico de barras que resume los resultados que se muestran en las figuras 10 a 14 obtenidos en un tratamiento de CEP con una energía específica de 244 kJ/kg. Las cantidades de moléculas bioactivas específicas indicadas se comparan con las cantidades en leche no procesada (control sin tratar).

50 La figura 17 muestra los recuentos en ufc de leche tratada con CEP a diferentes energías específicas (0 (leche sin procesar), 65, 210, 244, 314 kJ/kg de leche) a 0, 2, 4, 6, 8, 11, y 14 días después del tratamiento de CEP y cuando se almacenan a 4 °C. Cuando se trata de acuerdo con la invención, la leche es estable en almacenamiento durante 14 días, con recuentos de ufc que permanecen claramente por debajo de 10⁵ ufc.

55 Descripción detallada de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones y se relaciona con un método que comprende la etapa de someter una composición a un tratamiento con uno o más campos eléctricos por pulsos (CEP), en particular, en una cámara de tratamiento.

60 Para los fines de la presente memoria descriptiva, el término "comprende" significa "incluye entre otros". No se prevé que signifique "consiste únicamente en".

65 La composición es preferentemente una composición consumible y comestible prevista para el consumo humano o para el consumo por un animal. La composición está prevista para su administración y/o consumo oral. En este sentido, la composición comprende y preferentemente consiste en componentes y/o materia comestible. La

composición está, por tanto, libre de cualquier materia tóxica y/o dañina, que no está prevista o no es adecuada para la administración oral a un ser humano o un animal. La composición de la presente invención es nutricionalmente y/o microbiológicamente segura, en particular después del tratamiento de CEP de acuerdo con la invención.

5 La composición que se somete a un tratamiento de CEP es preferentemente una composición líquida o viscosa. En particular, la composición tiene preferentemente propiedades de los líquidos, tales como viscosidad. La composición puede, por tanto, ser una suspensión, una pasta, una solución, y similar. La composición puede comprender sólidos en la composición, por ejemplo suspendidos y/o disueltos en la composición.

10 Preferentemente, antes de dicho método de la invención, la composición tiene una viscosidad que, cuando se determina a temperatura ambiente (25 °C), es menor de (<) 10 Pascales-segundo (Pa s), preferentemente <5 Pa s, aún más preferentemente <3 Pa s, < 1 Pa s, < 0,5 Pa s, < 0,3 Pa s, aún más preferentemente <0,1 Pa s, 0,05 Pa s, y lo más preferentemente < 0,01 Pa s. Se destaca que la invención es particularmente útil para viscosidades de 0,0001 a 0,5 Pa s, en particular, de 0,001 a 0,1 Pa s, lo cual abarca las viscosidades de la leche (0.0017 Pa s) y la nata. La viscosidad, en particular la viscosidad abaja de los líquidos que tienen una viscosidad en el intervalo de 1 to 10'000 mPa s puede determinarse usando el viscosímetro capilar Rheotest ® LK de la empresa Rheotest Messgerate Medingen GmbH, Ottendorf-Okrilla, Alemania), usando la versión básica sin chaqueta con control de temperatura (para cerveza y mosto de cerveza, leche, yogur bebible, etc.). Se usan diferentes capilares que cubren diferentes intervalos de viscosidad. El volumen de muestra es aproximadamente de 25 ml.

20 De acuerdo con una realización, la viscosidad de la composición se sitúa en el intervalo de 0,0005 a 3,5 Pa s, preferentemente de 0.001 a 3 Pa s, lo cual abarca productos a base de leche tales como leche y yogur (0,5-3 Pa s). De acuerdo con una realización, la viscosidad de la composición está en el intervalo de 0,001 a 1 Pa s.

25 De acuerdo con una realización, la composición comprende nutrientes. Por lo tanto, la composición es preferentemente una composición nutricional y/o una composición alimenticia.

30 De acuerdo con una realización, la composición comprende, consiste esencialmente o consiste en uno o más ingredientes lácteos. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más seleccionados de entre proteína láctea, grasa láctea, membrana del glóbulo graso lácteo, lactosa, además de vitaminas y otros nutrientes comprendidos en la leche. Por ejemplo, la composición puede comprender caseína y/o proteína de suero lácteo. La proteína de suero lácteo puede ser de suero lácteo dulce o ácido. El ingrediente lácteo puede estar presente en forma de un ingrediente en polvo reconstituido, por ejemplo, leche en polvo reconstituida en agua.

35 La composición líquida o viscosa tratada mediante el método de la invención comprende moléculas bioactivas que están presentes de forma natural en la leche sin procesar.

40 De acuerdo con una realización, la composición comprende, consiste esencialmente o consiste en leche o en un componente de la leche.

45 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende, consiste esencialmente o consiste en un producto lácteo y/o un producto a base de leche.

50 La composición antes o después del método de la invención puede comprender, consistir esencialmente o consistir en uno o más seleccionados del grupo de leche entera, leche semidescremada, leche descremada, calostro, leche con grasa reducida, leche baja en grasa, leche desgrasada, suero lácteo (plasma de leche), tal como suero lácteo dulce o suero lácteo ácido, una bebida a base de leche, un yogur, yogur congelado, una bebida de yogur, helado, nata, mantequilla, queso fresco, requesón y queso, polvos o formas deshidratadas de otra forma de cualquiera de los mencionados anteriormente y composiciones que comprenden combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente;

55 De acuerdo con una realización, La composición antes o después del método de la invención puede comprender, consistir esencialmente o consistir en uno o más seleccionados del grupo de leche sin procesar, leche entera, leche descremada, leche descremada, calostro, leche con grasa reducida, leche baja en grasa, leche desgrasada, suero lácteo (plasma de leche), tal como suero lácteo dulce o suero lácteo ácido y combinaciones de los mencionados anteriormente.

60 La composición puede comprender, consistir esencialmente o consistir en uno o más seleccionados del grupo de leche entera, leche con grasa reducida, leche baja en grasa, y leche no grasa, y/o polvos de los mencionados anteriormente. La leche entera tiene generalmente un contenido de grasa láctea de alrededor de 3 a 3,8 % p, la leche con grasa reducida de 2 a 3 % p, la leche baja en grasa de 2 a 3 % p, la leche desgrasada de 0,5 % p o menos.

65 La leche semidescremada abarca leche a la que se ha eliminado toda la grasa láctea y se le ha restituido después una cantidad necesaria o deseada de grasa láctea. En general, la leche desgrasada es leche descremada, mientras que la leche con grasa reducida y la leche baja en grasa son, generalmente, leches semidescremadas Sin embargo, no se excluye, para el fin de esta invención, que la leche con grasa reducida, la leche baja en grasa y la leche desgrasada se

obtingan de otro modo además de descremando la leche entera.

De acuerdo con una realización, la composición comprende, consiste esencialmente o consiste en leche sin procesar o en un componente de la leche sin procesar. Por ejemplo, la composición comprende leche sin procesar entera. "Leche sin procesar", para el fin de la presente memoria descriptiva, es leche que se produce mediante secreción de las glándulas mamarias de seres humanos o animales, en particular de mamíferos no humanos tal como se desvela en otras partes en esta memoria descriptiva, leche que no se ha calentado por encima de 40 °C o que no ha sufrido ningún tratamiento que tenga un efecto equivalente. Preferentemente, la leche sin procesar es leche que no se sometió a ningún tratamiento de homogeneización. Preferentemente, la leche sin procesar es leche que no se sometió a ninguna pasteurización térmica y/o tratamiento de temperatura ultraalta (UHT).

La leche sin procesar y/o entera tiene un contenido de materia seca de alrededor de 11 a 13,5 de % p, por ejemplo, alrededor de 12,8 de % p. A partir del contenido de materia seca, la cantidad de moléculas activas por materia seca puede determinarse sobre la base de las cantidades dadas en otras partes en esta memoria descriptiva.

Para el fin de la presente memoria descriptiva se asume que la leche sin procesar tiene una densidad de 1,030 kg/l. Se asume que la composición antes y después del tratamiento de CEP de acuerdo con la invención tiene el mismo peso específico de 1,030 kg/l. Con este valor, la cantidad de moléculas bioactivas por kg de la composición puede determinarse a partir de valores indicados en peso por volumen (p. ej., mg/l, µg/l y ng/l y similar). Además, puede determinarse la cantidad de moléculas bioactivas en una composición deshidratada, por ejemplo, una composición en polvo deshidratada por pulverización (véase la cantidad de materia seca presente en la leche anteriormente). Para el fin de la presente memoria descriptiva, se considera que una composición deshidratada por pulverización a base de o que comprende un componente lácteo (p. ej., leche entera deshidratada por pulverización) tiene un contenido residual de humedad de alrededor de 3 % p. Se considera que la actividad acuosa (Aa) de dicha composición es 0,2-0,3.

Preferentemente, la "leche sin procesar" no se sometió de antemano a ningún tratamiento dirigido a reducir la carga bacteriana o a incrementar el periodo de caducidad de la composición, incluyendo, por ejemplo, uno o más seleccionados de tratamiento con alta presión o microfiltración.

Las expresiones "leche sin procesar", también denominados a veces como "leche fresca", se consideran y usan como equivalentes para el fin de la presente memoria descriptiva.

"Leche", para el fin de la presente memoria descriptiva, puede ser leche obtenida de ganado vacuno, por ejemplo, tal como la leche de vaca, búfalas, ovejas y cabras, pero también, por ejemplo, de yeguas y camellas. La invención también prevé que la composición comprenda moléculas bioactivas que están presentes de forma natural en la leche humana. También es posible tratar la leche humana de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se relaciona con un método de tratamiento de una composición que comprende moléculas bioactivas, tales como las que aparecen de forma natural en la leche tal como se especifica en otras partes en la presente memoria descriptiva.

El método de la invención es adecuado para dar la composición de la invención, la cual también puede denominarse como composición tratada con CEP o una segunda composición. Tal como se detalla en otras partes de esta memoria descriptiva, la composición de la invención puede ser aún líquida o viscosa o, como alternativa, puede obtenerse siguiendo un procesamiento adicional, tal como, por ejemplo, deshidratación, en particular deshidratación por pulverización.

De acuerdo con la invención, la composición antes del tratamiento con CEP puede denominarse como una primera composición o un "control sin tratar" (composición). Por ejemplo, el control sin tratar es leche sin procesar. De acuerdo con una realización, la "primera composición" no se ha sometido a ningún tratamiento térmico u otro tratamiento dirigido a reducir la carga bacteriana. Se considera que la cantidad de cualquier molécula bioactiva específica en el "control sin tratar" o primera composición es el total (100 de % p o % mol) de dicha molécula específica en la composición. En el caso de proteínas bioactivas, se considera preferentemente que la cantidad de proteína nativa en dicha primera composición es la cantidad total (100 %) de dicha proteína específica.

De acuerdo con una realización, la composición antes de dicho tratamiento de CEP es una primera composición y/o un control sin tratar y en la que dicha composición después de dicho tratamiento de CEP es una segunda composición y/o una composición tratada con CEP y en la que dicha composición tratada con CEP comprende al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 % de dicha molécula bioactiva en forma activa y/o nativa si se compara con dicho control sin tratar. Las moléculas bioactivas preferidas y las cantidades preferidas de dichas moléculas en forma activa y/o nativa se detallan en otras partes en esta memoria descriptiva.

De acuerdo con una realización, la composición antes de dicho tratamiento de CEP es una primera composición y/o un control sin tratar y en la que dicha composición después de dicho tratamiento de CEP es una segunda composición y/o una composición tratada con CEP y en la que dicha composición tratada con CEP comprende al menos un 30 %, preferentemente un 40 % de una proteína específica en forma nativa. Como consecuencia lógica, la composición

comprende preferentemente, con respecto al contenido total de dicha proteína específica menos de un 70 %, preferentemente menos de un 60 %, respectivamente, de dicha proteína en forma desnaturalizada y/o degradada.

5 De acuerdo con una realización, el método de la invención se dirige a reducir el número de microorganismos tales como bacterias, micobacterias y hongos, tales como la levadura, que están presentes posiblemente en la leche sin procesar. La expresión "reducir el número de microorganismos" se refiere generalmente a una reducción de unidades formadoras de colonias (ufc) en caso de microorganismos que pueden cultivarse en medios adecuados, p. ej., en placas de Petri. En particular, el método es adecuado para reducir el número de microorganismos reproductores y/o vegetativos, preferentemente aquellos que pueden estar presentes en la leche. La invención es adecuada, por tanto, para reducir el número de microorganismos que están en una fase de crecimiento vegetativo, por ejemplo mediante mitosis y/o multiplicación en el ciclo vital del microorganismo.

15 Una reducción del número de microorganismos presentes en la composición aumenta generalmente la estabilidad y/o el periodo de caducidad de la composición. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un método para aumentar la estabilidad de la composición y/o el periodo de caducidad de la composición.

La reducción del número de microorganismos incluye una reducción de microorganismos patógenos y, por lo tanto, la invención también se relaciona con un método para aumentar la seguridad y/o salubridad de la composición.

20 El método de la presente invención tiene el objetivo de reducir la carga bacteriana y la carga de otros microorganismos con el fin de garantizar la seguridad microbiana de la composición. Además, el método de la invención se dirige a mantener la actividad de moléculas bioactivas saludables que están contenidas de forma natural en la leche con el fin de garantizar o aumentar el beneficio nutricional asociado con las moléculas bioactivas. Por lo tanto, la presente invención se relaciona además con un método de pasteurización por CEP que deja a dichas moléculas bioactivas intactas y/o activas, al menos hasta una cierta medida, preferente hasta una mayor medida que otros métodos conocidos de pasteurización.

30 En general, el término "pasteurización" puede referirse a diferentes procesos que inactivan microorganismos vegetativos, en particular patógenos, en alimentos líquidos o viscosos. La presente invención puede entenderse, por tanto, como un proceso de pasteurización. Por otra parte, la presente invención no se relaciona con la "pasteurización térmica", la cual es un método industrial del estado de la técnica para reducir el número de microorganismos específicamente en el alimento líquido mediante tratamiento térmico solo.

35 El método de la invención se relaciona con un tratamiento de campo eléctrico por pulsos (CEP) para inactivar microorganismos vegetativos, en particular patógenos, y también puede denominarse, por tanto, como pasteurización por CEP. Por consiguiente, los métodos de la invención comprenden la etapa de someter a una composición líquida o viscosa a un tratamiento de CEP.

40 En el tratamiento de CEP, la composición se expone en una cámara de tratamiento a uno o más campos eléctricos que se mantienen durante una cierta duración de tiempo (la duración del pulso). Los campos eléctricos se repiten por lo general a una frecuencia específica, tal como se detalla en otras partes en esta memoria descriptiva. Se han publicado que los tratamientos de CEP causan inactivación microbiana. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la exposición a un campo eléctrico conduce a cambios en la estructura de la membrana de un microorganismo, lo cual resulta además en la formación de poros y/o aumenta la permeabilidad de la membrana. Los pulsos de alta intensidad de los campos eléctricos pueden causar rotura irreversible de los microorganismos.

50 La composición se expone por lo general a un CEP en una cámara de tratamiento. El CEP se genera por medio de electrodos, que son generalmente parte de la cámara de tratamiento o que están adyacentes a la cámara de tratamiento.

Los tratamientos de CEP pueden llevarse a cabo en diferentes tipos de cámaras de tratamiento, tales como, por ejemplo, cámaras de tratamiento estático o continuo. De acuerdo con una realización, los métodos de la invención se relacionan con métodos de tratamiento continuo. En particular, la invención se relaciona con un método continuo de reducir microorganismos en una composición alimenticia. Un "método continuo" para el fin de la presente memoria descriptiva, es diferente de un proceso discontinuo. En un "método continuo", la composición se expone de forma continua a un tratamiento de CEP. En otras palabras, la composición se somete de forma continua a dicho tratamiento de CEP. En particular, la composición se conduce hacia y se retira de una cámara de tratamiento de CEP forma continua. En los métodos continuos de la invención, la composición que se va a tratar se está moviendo de forma continua en una dirección particular, por ejemplo, se bombea de forma continua a través de una o más cámaras de tratamiento.

65 Todo el proceso de la invención puede ser continuo, incluyendo, posiblemente, ajustar la temperatura de la composición a temperaturas específicas mediante calentamiento y/o refrigeración y/o la etapa opcional de deshidratar por pulverización o deshidratar por congelación. Como alternativa, el tratamiento de CEP es continuo, mientras que otras etapas, tales como calentamiento, refrigeración y deshidratación por pulverización, si están presentes, pueden llevarse a cabo de forma independiente de una manera continua o discontinua.

Hay varios tipos de diseños de cámaras de tratamiento que son adecuados para el tratamiento de CEP continuo, cámaras que se diferencian generalmente por la disposición o posición de los electrodos y, en consecuencia, la distribución de la fuerza de campo en la cámara de tratamiento. Hay cámaras de tratamiento continuo coaxiales y colineales.

5

Dicho tratamiento de CEP de la invención se aplica en una o más cámaras de tratamiento colineales.

10

La estructura general de unas cámaras de tratamiento colineales de ejemplo se muestra de forma esquemática en la figura 1. En este tipo de cámara, los electrodos tienen sustancialmente un canal central interno cilíndrico hueco y están separadas por un aislador que también tiene un canal central cilíndrico hueco, de modo que se forma un tubo a través del cual fluye o pasa la composición al tiempo que se expone al tratamiento de CEP. En la figura 1, la cámara de tratamiento 1 comprende un canal central interno 2, a través del cual pasa el producto, tal como se ilustra mediante la flecha 3, que representa el flujo del producto a través de la cámara de tratamiento 1. La cámara de tratamiento comprende un electrodo central 4, que es positivo en el caso que se muestra, y electrodos de tierra 5 y 6, que están situados corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, del electrodo positivo 4. Todos los electrodos están separados por el material de aislamiento 8. Los electrodos 4, 5, 6 y el aislador 8 en contacto con el producto tienen preferentemente paredes internas cilíndricas huecas y forman un canal central interno cilíndrico hueco de la cámara de tratamiento 1. Las líneas 7 representan el campo eléctrico.

15

20

En general, una cámara de tratamiento comprende, consiste sustancialmente o consiste en dos o más electrodos y un aislador que separa los dos o más electrodos. Una cámara de tratamiento colineal es generalmente cilíndrica hueca, cónica hueca y/o tubular, con un par de electrodos anulares, cónicos huecos y/o tubulares que están situados corriente arriba y corriente abajo de un canal central cónico hueco y/o tubular, estando hecho el último generalmente del aislador.

25

30

Los electrodos son preferentemente metálicos, hechos preferentemente de acero inoxidable o titanio u otro material que es inerte y/o permite el contacto con productos alimentarios y es adecuado para reducir o evitar cualquier reacción electroquímica en la superficie del electrodo, tal como deposición o disolución electroquímica de metal. El material del electrodo se selecciona generalmente de modo que generalmente no se produzca sustancialmente ninguna electrolisis o reacción redox en los electrodos.

Se destaca que la composición que está tratada con CEP está en contacto con los electrodos.

35

Los dos electrodos están separados generalmente por un material aislante. Generalmente, el canal central de la cámara de tratamiento entre los electrodos puede estar hecho de dicho material aislante, el cual, preferentemente, también está en contacto con la composición durante el tratamiento de CEP. En otras palabras, entre los electrodos hay generalmente un hueco que comprende el aislador, a través del cual se mueve la composición al tiempo que se expone al tratamiento de CEP. La presencia del aislador es necesaria para mantener un campo eléctrico eficaz, correctamente orientado en el canal central de la cámara de tratamiento, que empieza en un electrodo y se extiende al electrodo con carga opuesta (o no cargado, o menos cargado).

40

45

De este modo, el campo eléctrico se extiende entre los dos electrodos. El aislador puede estar hecho de material aislante y preferentemente inerte, tal como productos cerámicos o polímeros tales como polietileno, PTFE u otros materiales aislantes.

50

Las cámaras de tratamiento que comprenden los electrodos y el aislador pueden comprender una estructura de caja, de la cual al menos parte también está hecha de material aislante, que ensambla o estabiliza al menos parcialmente las partes adicionales de la cámara de tratamiento, para conectar y mantener juntas estructuralmente las diferentes partes (electrodos, aislador de la cámara de tratamiento).

55

En el resultado, la cámara de tratamiento colineal, incluyendo los electrodos, comprende o forma un canal central tubular, que es particularmente adecuado para el tratamiento continuo mediante CEP. La cámara de tratamiento comprende, por tanto, una entrada de producto, que preferentemente es circular, y una salida de producto, que preferentemente es circular.

60

Preferentemente, el tratamiento de CEP de acuerdo con la presente invención implica al menos una, más preferentemente al menos dos cámaras de tratamiento, preferentemente aún más, por ejemplo tres, cuatro, cinco, seis o más cámaras de tratamiento. Si hay más de una cámara de tratamiento, las últimas se conectan preferentemente en serie, de modo que las composiciones fluyen o pasan a través de una tras otra de dichas cámaras de tratamiento. Lo más preferentemente, se usan cuatro cámaras de tratamiento.

65

Generalmente, una cámara de tratamiento se caracteriza por al menos dos electrodos, un electrodo cargado y un contraelectrodo (el contraelectrodo puede tener carga opuesta, puede ser de tierra, o puede llevar la misma carga que el electrodo cargado, pero en menor grado, por ejemplo un electrodo semicargado($\frac{1}{2}$)).

5 Son posibles electrodos múltiples, por ejemplo, pares de electrodos, sistemas de electrodo triple o sistemas de electrodo cuádruple, en particular con cámaras de tratamiento colineales. En el caso de los sistemas de electrodo triple, los electrodos pueden disponerse, por ejemplo, como tierra-más-tierra (véase la figura 1); tierra-menos-tierra; más-tierra-más; menos-tierra-menos; más-(semi)¹/₂ más-más; menos-(semi)¹/₂ menos-menos; (semi)¹/₂ menos-menos-(semi)¹/₂ menos; (semi)¹/₂ más-más-(semi)¹/₂ más. En el caso de un sistema de cuatro electrodos, dos electrodos idénticos (por ejemplo, dos electrodos más) pueden estar o no en conexión mecánica. En el primer caso, también hay generalmente un acoplamiento eléctrico, pero aún habría dos partes mecánicas separadas y se considerarían como dos electrodos. En analogía con lo dicho anteriormente, se podría usar tierra-más-más-tierra; tierra-menos-menos-tierra; más-tierra-tierra-más; y así sucesivamente, como anteriormente con los sistemas de electrodo triple.

10 En los sistemas tanto de electrodo triple como cuádruple, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, habría dos cámaras de tratamiento entre un electrodo y el contraelectrodo respectivo.

15 Las expresiones "corriente arriba" y "corriente abajo" se refieren al flujo de la composición a través de dichas cámaras de tratamiento y/o durante el tratamiento de CEP, en el que corriente arriba se refiere a la región más cercana al origen del flujo de la composición (o a una dirección contra el flujo de la composición), mientras que corriente abajo se refiere a una región más alejada en la dirección del flujo de la composición. Las expresiones "corriente arriba" y "corriente abajo", para el fin de la presente memoria descriptiva, se usan como es convencional.

20 Si hay dos cámaras de tratamiento colineales generalmente es ventajoso combinar dos electrodos cargados como electrodos centrales (por ejemplo, cargados positivamente o negativamente, preferentemente a alrededor del mismo voltaje), en las que los dos contraelectrodos se sitúan, uno corriente arriba y otro corriente abajo de los electrodos centrales, separados por el aislador. Lo inverso también es posible (contraelectrodo de tierra o semicargado central).

25 De acuerdo con una realización, se proporcionan dos electrodos cargados positivamente (a alrededor del mismo nivel de voltaje) en los extremos corriente arriba y corriente abajo de dos cámaras de tratamiento combinadas, proporcionándose uno de los dos contraelectrodos centralmente, entre las dos cámaras de tratamiento.

30 En caso de dos cámaras de tratamiento, hay, por tanto, preferentemente tres o cuatro electrodos, ya que el uno o dos electrodo(s) central(es) funciona(n) como contraelectrodo para dos electrodos corriente arriba y corriente abajo separados.

35 El número de cámaras de tratamiento y/o electrodos se selecciona sobre el tratamiento de CEP deseado y/o el tiempo de residencia en la cámara de tratamiento deseado.

De acuerdo con una realización, el tratamiento de CEP se aplica por medio de tres o cuatro electrodos en dos cámaras de tratamiento o, como alternativa, por medio de seis u ocho electrodos en cuatro cámaras de tratamiento.

40 De acuerdo con los métodos de la invención, el tratamiento de CEP se aplica o se lleva a cabo en uno o más cámaras de tratamiento colineales, en las que dicha cámara de tratamiento comprende un elemento interior o interno. El elemento interior es inerte y no conductor. Preferentemente, el elemento interior o interno no afecta o interfiere o no lo hace sustancialmente con el campo eléctrico creado mediante el tratamiento de CEP. Preferentemente, el elemento interior está hecho de un material aislante tal como PE, PTFE o material cerámico. El elemento interior se denomina como elemento interior porque está colocado en el interior, esto es, dentro del canal central de la cámara de tratamiento. El elemento interior está, por tanto, en contacto con la composición que pasa a través de la cámara de tratamiento y afecta al flujo de la composición, en particular a la dirección del flujo y al tipo de flujo de la composición.

45 El elemento interior o interno puede proporcionarse en forma de un elemento rígido y no desmontable, que forma una pieza con uno o más de otros elementos estructurales de la cámara de tratamiento, por ejemplo con el aislador que separa los electrodos y/o que proporciona la pared interna de la cámara de tratamiento entre los electrodos.

50 Como alternativa y preferentemente, el elemento interior es una pieza separada proporcionada en forma de un inserto, el cual puede colocarse en la cámara de tratamiento y retirarse de la misma, por ejemplo cuando se desensambla la cámara de tratamiento con el fin de limpiar. Si el elemento interior es una pieza separada, puede proporcionarse en forma de un inserto, que es un elemento estructural que puede insertarse dentro de la cámara de tratamiento y que ocupa una posición específica dentro de la cámara de tratamiento durante su uso (tratamiento de CEP). Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de un elemento interior en la cámara de tratamiento es adecuado para repercutir sobre el patrón de flujo y/o reducir o evitar la falta de homogeneidad del campo eléctrico al cual se expone la composición en la cámara de tratamiento. Se destaca que un campo eléctrico no homogéneo puede causar picos de temperatura, lo cual puede dañar componentes termosensibles de la composición. Por ejemplo, los picos de temperatura locales pueden conducir a una desnaturalización de ciertas proteínas, resultando en un cambio de las propiedades físicas y químicas de la composición. Por lo tanto, el elemento interior reduce preferentemente los picos de temperatura en la composición, preferentemente dentro de la cámara de tratamiento.

65

5 También se supone que el elemento interior es adecuado para reducir el flujo laminar y aumentar la turbidez del líquido o composición en la cámara de tratamiento. De esta forma, se mejora la probabilidad de exposición a los campos eléctricos y/o tratamiento homogéneo y/o regular. Se destaca que se supone que las características del flujo laminar dentro de la cámara de tratamiento son favorables, debido a las diferencias en la velocidad del flujo y similares que acompañan al flujo laminar.

10 De acuerdo con una realización particular, dicho tratamiento de CEP se aplica en una o más cámaras de tratamiento que tienen un canal central cónico hueco o cilíndrico sustancialmente hueco, en las que dicha cámara de tratamiento comprende un elemento interior. En el que dicho elemento interior comprende una sección cónica o cilíndrica longitudinal y en el que dicho inserto ocupa un espacio de dicho canal central hueco de dicha cámara de tratamiento.

15 De acuerdo con una realización, dicho tratamiento de CEP se aplica en una o más cámaras de tratamiento que tienen un canal central, en las que dicha composición se guía de forma continua a través de dicho canal central de dicha cámara de tratamiento y/o en las que se proporciona un elemento interior en dicho canal central, de forma que, en dicha cámara de tratamiento, dicha composición se guía alrededor de dicho elemento interior.

20 De acuerdo con una realización, dicho tratamiento de CEP se aplica en una o más cámaras de tratamiento que tienen una entrada y una salida, en las que dicha composición se inserta de forma continua en la entrada de dicha cámara y se retira de forma continua de dicha cámara de tratamiento a través de dicha salida y en las que dichas una o más cámaras comprenden un elemento interior, en las que dicho elemento interior se coloca en dicha cámara de modo que se guía al producto en proximidad con las paredes internas en parte de dicha cámara y/o en las que dichos elementos interiores evitan que dicha composición ocupe una posición axial dentro de una sección o parte de dicha cámara.

25 El elemento interno fuerza, por tanto, preferentemente a la composición a fluir a lo largo de un espacio vacío o abierto anular o tubular, el cual está limitado por las paredes internas de los electrodos y aisladores cilíndricos huecos y las paredes externas del elemento interno cilíndrico. Aunque esta situación podría ser reminiscente de la situación de las cámaras de tratamiento coaxiales, en las que se proporciona un electrodo dentro de la cámara de tratamiento, el elemento interior de esta invención difiere del último en que no es un electrodo, sino que solo influye sobre el flujo del producto dentro de la cámara de tratamiento.

30 De acuerdo con una realización, dicho tratamiento de CEP se aplica en una o más cámaras de tratamiento que comprenden un elemento interior, dicho elemento interior es adecuado para aumentar el número de turbulencias presentes en dicha composición y/o reducir el flujo laminar de dicha composición dentro de dicha cámara de tratamiento.

35 El elemento interior tiene preferentemente una estructura longitudinal y/o comprende preferentemente una porción cónica o cilíndrica.

40 Si el elemento interior es una pieza separada (un inserto), además comprende preferentemente una estructura de anclaje, la cual permite la estabilización del elemento en la cámara de tratamiento. La estructura de anclaje puede tener lugar realmente fuera de la cámara de tratamiento, pero resulta en un posicionamiento rígido fijo del inserto dentro de la cámara de tratamiento.

45 El inserto ocupa preferentemente al menos una parte de la posición axial del canal central cónico hueco o cilíndrico hueco de la cámara de tratamiento. Preferentemente, el inserto es longitudinal y tiene un eje. En el que el inserto ocupa el eje y/o parte del espacio axial dentro de la cámara de tratamiento. Preferentemente, el inserto longitudinal se sitúa para ser coaxial con el canal central cónico hueco o cilíndrico hueco de la cámara de tratamiento.

50 Preferentemente, el inserto comprende un primer y segundo extremo y, entre dichos primer y segundo extremos, una parte intermedia. Preferentemente, al menos uno de dichos primer y segundo extremos comprende una estructura de anclaje, la cual colabora en la fijación del inserto en la cámara de tratamiento. Si solo uno de los extremos comprende dicha estructura de anclaje, el otro puede ser simplemente una superficie plana o preferentemente una mitad redondeada o un extremo puntiagudo. Por ejemplo, un extremo puede tener sustancialmente el aspecto o la forma de una media bola.

55 La parte sustancialmente longitudinal entre dichos extremos del elemento interior es preferentemente cilíndrica y/o cónica y/o puede comprender una combinación de diferentes secciones cónicas o de secciones cónicas y cilíndricas. En general, la parte intermedia central tiene un diámetro que es menor que el diámetro del canal central interno de la cámara de tratamiento, de modo que el elemento interno puede colocarse en el canal central de dicha cámara de tratamiento.

60 Las partes de anclaje comprenden preferentemente partes que se extienden radialmente, en particular desde un extremo (el extremo corriente arriba o extremo posterior) de la parte intermedia y que están en contacto en alguna posición con la superficie de la pared interna de la cámara de tratamiento o del conducto en el que la composición se guía hacia o se retira de la cámara de tratamiento. Por ejemplo, el elemento interior puede comprender una proyección o una agarradera que empalma contra una superficie de empalmen proporcionada hacia el extremo corriente arriba o

abajo de la cámara de tratamiento.

El elemento interno puede tener el aspecto general de un torpedo. Un diseño de cámara de tratamiento preferido, incluyendo el elemento interno en forma de un inserto se desvela en la solicitud de patente internacional con número PCT/EP2011/051149, que se presentó el 27 de enero de 2011 y se publicó como documento WO 2011/092247.

El uso de dicho inserto en una cámara de tratamiento colineal resultó en los mejores resultados en cuanto a reducción de carga microbiana y mantenimiento de componentes bioactivos de la composición.

Preferentemente, el diámetro interno de un canal central cilíndrico hueco de la cámara de tratamiento está entre 5 y 35 mm, preferentemente de 6 a 30 mm, más preferentemente de 7 a 25 mm, lo más preferentemente de 9 a 20 mm, de 9 a 17 mm, de 9 a 15 mm, o de 9 a 13 mm, por ejemplo de 9,5 a 11 mm.

En caso de que el canal central interno de la cámara de tratamiento no sea cilíndrico hueco, por ejemplo, si la cámara de tratamiento tiene una sección transversal no circular, por ejemplo, una sección transversal elíptica, los valores del diámetro indicados anteriormente se aplican al diámetro más largo observado en cualquier posición específica en la cámara de tratamiento. Si los diámetros en la cámara de tratamiento se disponen para cambiar en una dirección longitudinal o axial (como es el caso, por ejemplo, en los canales centrales de cámaras de tratamiento cónicos huecos), los valores e intervalos indicados anteriormente se refieren a valores que pueden observarse en cualquiera de las posiciones de la cámara de tratamiento. Para el fin de la presente memoria descriptiva no es obligatorio, aunque se prefiere, que estas dimensiones se apliquen a todo el canal central de la cámara de tratamiento. Preferentemente, el canal central de la cámara de tratamiento es sustancialmente o totalmente cilíndrico hueco, de modo que la sección transversal de la cámara de tratamiento muestra un diámetro interno del círculo de la cámara de tratamiento por encima de sustancialmente toda la longitud de la cámara de tratamiento.

Para el fin de la presente memoria descriptiva, la cámara de tratamiento abarca todo el espacio en el que se encuentra un campo eléctrico entre un par de electrodos.

Los valores e intervalos que se indican anteriormente para el diámetro del canal central interno de las cámaras de tratamiento no se ven afectados en modo alguno por la presencia de un elemento/estructura interior o de un elemento estructural rígido que se proporciona dentro de la cámara de tratamiento tal como se define en otras partes en esta memoria descriptiva, aunque el elemento rígido y/o interior tenga el efecto de que el flujo de producto o el flujo de la composición dentro de la cámara de tratamiento no pueden ocupar todo el canal central de la cámara de tratamiento. Los valores de diámetro anteriores no consideran el hecho de que el elemento interior ocupe algo del volumen dentro de la cámara de tratamiento.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, los valores, por ejemplo, de parámetros de procesos del método de la invención, pueden indicarse por medio de intervalos. La indicación de un intervalo en la presente memoria descriptiva significa que el parámetro específico (p. ej., diámetro interno de la cámara, energía específica, fuerza de campo, longitud de pulso, etc.) puede asumir uno cualquiera de los valores del criterio de valoración indicados del intervalo respectivo, o pueden asumir cualquier valor que esté dentro del intervalo. Generalmente, pero no necesariamente en todos los casos, el parámetro asume un valor sustancialmente constante del intervalo. El experto entenderá en qué casos el valor es constante y en qué casos puede haber fluctuaciones. Por ejemplo, en el caso del diámetro del canal central interno de la cámara de tratamiento, como ésta es generalmente una entidad más o menos invariable estructuralmente, dicho diámetro permanece constante en una posición específica en la cámara de tratamiento. Si el valor de un parámetro fluctúa, se prefiere que dichas fluctuaciones permanezcan en gran medida sustancialmente dentro del intervalo indicado.

En el método de la invención, los pulsos de los campos eléctricos se producen en los electrodos, extendiéndose los campos eléctricos dentro de dichas cámaras de tratamiento.

El experto sabe cómo crear campos eléctricos por pulsos en una cámara de tratamiento. Generalmente, se prefieren sistemas para producir pulsos eléctricos de alta energía, los cuales comprenden una fuente de alimentación eléctrica, uno o más condensadores, uno o más transistores (p. ej., TBCA -transistores bipolares de compuerta aislada-) y al menos un transformador (p. ej., un transformador de alto voltaje DIL High Voltage TransformerElcrack®). De acuerdo con una realización, el sistema para el tratamiento CEP de la invención comprende uno o más refrigeradores y uno o más calentadores, que son adecuados para ajustar la temperatura de la composición antes o después de los tratamientos de CEP. Básicamente, los pulsos se generan almacenando la energía eléctrica en condensadores mediante una fuente de alimentación eléctrica para ser capaz de emitir altos índices de electricidad. Los transistores u otros interruptores semiconductores se usan para descargar periódicamente la energía y transferirla a la cámara de tratamiento. La máxima corriente de salida y voltaje, así como la polaridad se definen típicamente mediante la configuración del modulador de pulso.

En general, es necesario refrigerar el sistema de CEP, lo cual puede hacerse, por ejemplo, mediante aceite, que se bombea a través una circulación del sistema mediante una bomba de aceite.

En el método de la presente invención, la composición líquida y/o viscosa se bombea a través de la una o más cámaras de tratamiento. Preferentemente, la composición se bombea contra una contrapresión. Se prefiere la contrapresión con el fin de reducir el riesgo de creación de burbujas de aire y/o para mantener un flujo homogéneo de la composición. La contrapresión está entre 1,1 a 4 bares, más preferentemente de 1,3 a 3 bares, aún más preferentemente de 1,5 a 2,5, por ejemplo de 1,7 a 2,3 bares, lo más preferentemente de 1,8 a 2,2 bares. De acuerdo con una realización, la contrapresión es de 1,5 a 3 bares. Preferentemente, la contrapresión tiene un valor sustancialmente constante.

La figura 2 muestra un sistema de CEP con un transformador de pulso que puede usarse para el método de la presente invención.

Los factores o parámetros del proceso que pueden jugar un papel para el fin del método de la presente invención son uno o más seleccionados entre la fuerza del campo eléctrico que se aplica, la duración del pulso, la energía específica, el número de pulsos, el tipo o forma del pulso, la polaridad del pulso, la temperatura de la composición antes, durante y/o después del tratamiento de CEP y la frecuencia del pulso.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que, ajustando uno o más de estos parámetros del proceso a valores específicos, se cumplen los objetivos de la invención. En particular, la carga microbiana puede reducirse sustancialmente mientras que se mantiene al mismo tiempo intacta una cantidad o porcentaje significativo de moléculas bioactivas, en particular proteínas, presentes en la composición.

Un parámetro del proceso importante del método de la invención es la energía específica (W_E o $W_{ESPECÍFICA}$), que se muestra en la ecuación 1 a continuación.

$$W_{especifica} = \frac{W_{pulso} \cdot f}{\dot{m}} \quad \text{Ecuación 1}$$

En la ecuación 1, W_{PULSO} es la energía específica en kJ (kilojulios) aplicada mediante el campo eléctrico de un pulso, f es la frecuencia de pulsos en s^{-1} , y m (m con punto sobre la misma) es la transferencia de masa en kg/s. La unidad de $W_{ESPECÍFICA}$ es kJ/kg, en la que la energía es energía aplicada mediante el campo eléctrico y la masa es la masa de la composición a la cual se aplica la energía.

Generalmente, la energía emitida puede determinarse de dos formas: (a) Mediante el cálculo de $U(t) \times (It) dt$, donde U es voltaje, I es corriente, t es el tiempo. En caso de pulsos múltiples, $n \times$ amplitud de pulso da el tiempo; y/o (b) Mediante el cálculo de $E(t)^2 \times k dt$, donde E es la fuerza de campo, k la conductividad y t el tiempo. Tal como se hace evidente a partir de la ecuación q, para calcular la entrada de energía específica en kJ/l o kJ/kg, habría que dividir la energía emitida por el volumen o la velocidad de flujo de la masa.

De acuerdo con la presente invención, la energía específica ($W_{ESPECÍFICA}$) aplicada en el método de la invención es de 600 kJ o menos por kg de la composición de la invención, preferentemente 550 kJ/kg o menos, 500 kJ/kg o menos, 450 kJ/kg o menos, 400 kJ/kg o menos, 350 kJ/kg o menos, 350 kJ/kg o menos, 350 kJ/kg o menos, 300 kJ/kg o menos, 350 kJ/kg o menos, 340 kJ/kg o menos, 330 kJ/kg o menos, 320 kJ/kg o menos, 310 kJ/kg o menos, 300 kJ/kg o menos, 290 kJ/kg o menos, 280 kJ/kg o menos, 270 kJ/kg o menos, 260 kJ/kg o menos, o 250 kJ/kg o menos,

Preferentemente, la energía específica es 100 kJ/kg o más, 120 kJ/kg o más, 160 kJ/kg o más, 180 kJ/kg o más, 200 kJ/kg o más, 210 kJ/kg o más, o 220 kJ/kg o más,

Por consiguiente, la energía específica puede estar dentro de cualquier intervalo tal como se ha determinado mediante las cantidades anteriores, pero preferentemente la energía específica está entre 150 a 350 kJ/kg, 180 kJ/kg y 320 kJ/kg, preferentemente entre 200 a 300 kJ/kg, más preferentemente entre 200 y 280 kJ/kg, aún más preferentemente entre 200 y 260 kJ/kg, por ejemplo, alrededor de 250 kJ/kg.

La energía específica de cada pulso se da mediante la ecuación 2 a continuación.

$$W_{pulso} = \int_0^t U(t)I(t\tau)dt \quad \text{Ecuación 2}$$

En la ecuación 2, t es el tiempo de tratamiento (segundos, s), U es el voltaje (V) en el electrodo, I es la corriente eléctrica (A) y τ es la duración del pulso.

Otro parámetro en un tratamiento de CEP es la fuerza del campo eléctrico, la cual puede medirse en kV/cm y que es la fuerza del campo eléctrico que actúa sobre la composición en la cámara de tratamiento. La fuerza del campo eléctrico se define como la diferencia de potencial eléctrico (U) para dos electrodos dados separados en el espacio por la distancia (d) entre ellos, separados por un material no conductor (Zhang et al., J. Food Ing. 25 (1995) 261-81).

5

$$E = \frac{U}{d}$$

Ecuación 3

De acuerdo con la invención, la dicha composición se expone a un campo eléctrico con una fuerza de campo de 10 a 20 kV/cm. De acuerdo con una realización, en dicho tratamiento de CEP, la dicha composición se expone a un campo eléctrico con una fuerza de campo de 10 a 15 kV/cm. De acuerdo con realizaciones adicionales, la fuerza de campo es < 17, <16, <15, preferentemente <14, lo más preferentemente <13 kV/cm. Preferentemente, la fuerza de campo es >10, >11, más preferentemente >12 kV/cm, lo más preferentemente 12-13 kV/cm.

10

Se destaca que la expresión "fuerza de campo eléctrico crítica" es la fuerza de campo que es necesaria para obtener inactivación del microorganismo. A fin de hacerlo así, hay que inducir generalmente un potencial de transmembrana de más de 1 V. La fuerza de campo eléctrico crítica depende, por tanto, generalmente del tipo de célula, la forma del microorganismo, las dimensiones de la célula microbiana y el tipo de pared celular del microorganismo.

15

Se destaca que la duración del pulso afecta al parámetro de la fuerza de campo crítica, ya que con duraciones de pulso más largas, la fuerza de campo puede ser comparativamente menor para obtener inactivación microbiana.

20

De acuerdo con una realización de la invención, la duración del pulso en dicho tratamiento de CEP es de 10 µs o más, preferentemente se aplican 15 µs o más.

25

De acuerdo con una realización de la invención, la longitud del pulso o duración del pulso es no más larga de 40 µs, no más larga de 35 µs, no más larga de 30 µs, no más larga de 27 µs, no más larga de 25 µs, no más larga de 24 µs, no más larga de 40 µs, preferentemente se aplican 15 µs o más.

30

De acuerdo con una realización de la invención, la longitud del pulso o duración del pulso es de 5 a 35 µs, por ejemplo de 10 µs a 30 µs, preferentemente de 12 µs a 28 µs, por ejemplo de 14 a 26 µs, más preferentemente de 16 a 24 µs, por ejemplo de 17 a 23 µs, lo más preferentemente de 18 a 22 µs, por ejemplo de 19 a 21 µs, por ejemplo, de alrededor de 20 µs.

35

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, Los presentes inventores creen que los efectos beneficiosos de la presente invención pueden explicarse, al menos parcialmente, mediante la combinación particular de energía específica, fuerzas de campo y duración del pulso usados para el fin de la presente invención. Que son particulares en cuanto a que resultan en la inactivación de microorganismos que pueden estar presentes en la composición, al tiempo que conservan la actividad de principios bioactivos presentes en la composición.

40

De acuerdo con una realización, en el tratamiento de CEP de la invención, dichas energía específica ($W_{\text{ESPECÍFICA}}$), fuerza de campo y duración del pulso son de 100 a 400 kJ/kg, de 6 a 30 kV/cm, y de 10 µs a 30 µs, respectivamente, preferentemente de 150 a 350 kJ/kg, de 7 a 25 kV/cm, y de 12 µs a 28 µs, respectivamente; más preferentemente de 180 a 320 kJ/kg, de 8 a 20 kV/cm y de 14 a 26 µs, respectivamente; aún más preferentemente de 200 a 300 kJ/kg, de 9,5 a 14,5 kV/cm y de 17 a 23 µs, respectivamente; y lo más preferentemente de 220 y 280 kJ/kg, de 11 a 13 kV/cm y de 18 a 22 µs, respectivamente.

45

Se destaca que el valor de $W_{\text{ESPECÍFICA}}$ puede ajustarse dependiente del flujo o transferencia de masa de la composición variando la frecuencia del pulso, por ejemplo, tal como puede deducirse a partir de la ecuación 1 anterior,

50

De acuerdo con una realización, la frecuencia (f) es de 50 a 1000 Hz, por ejemplo, de alrededor de 100 Hz.

55

Con respecto a las características del pulso, se destaca que los pulsos eléctricos pueden ser de diferente tipo y polaridad. Los pulsos pueden ser del tipo de disminución exponencial, del tipo de onda cuadrada y pulsos de disminución oscilatoria. De acuerdo con la realización preferida, los pulsos del tratamiento de CEP de acuerdo con la invención son pulsos de onda cuadrada, los cuales se caracterizan por que el voltaje aplicado mediante el pulso (o durante la longitud del pulso) permanece sustancialmente constante a lo largo de toda la duración del pulso.

60

Además, los pulsos pueden ser bipolares o monopolares. En caso de pulsos monopolares, sólo se aplican cargas de una polaridad particular (p. ej., solo cargas positivas). De acuerdo con la realización preferida, en el tratamiento de CEP de la invención, se aplican pulsos eléctricos bipolares, de modo que se aplican pulsos alternantes de polaridad positiva y negativa. Lo más preferentemente, se aplican pulsos de onda cuadrada bipolares.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se propone la hipótesis de que la aplicación de pulsos bipolares es más eficaz debido al estrés adicional, que se piensa que se induce sobre o en la membrana celular de microorganismos que

están presentes posiblemente en la composición. Además, la aplicación de pulsos bipolares minimiza el riesgo de aparición de deposición de sólidos en la superficie del electrodo y el consiguiente efecto perjudicial sobre la uniformidad del campo dentro de la cámara.

5 De acuerdo con una realización preferida del método de la invención, en dicho tratamiento de CEP, se aplican pulsos eléctricos de onda cuadrada y/o pulsos bipolares.

10 La temperatura de la composición antes de someterla al método de la invención y en particular al tratamiento de CEP se ajusta preferentemente a un valor específico. Se destaca que, debido a la energía aplicada por medio del tratamiento de CEP, la temperatura de la composición aumenta generalmente. La composición o, más generalmente, el medio, se calienta generalmente como consecuencia del tratamiento de CEP, de modo que la temperatura de la composición al final del tratamiento de CEP es generalmente más alta que la temperatura anterior al tratamiento de CEP. La temperatura de la composición se ajusta inmediatamente antes del tratamiento de CEP tal como se discute con más detalle a continuación y en otras partes de esta memoria descriptiva.

15 Generalmente, la temperatura de la composición juega un papel con respecto, tanto a la inactivación de microorganismos como a la actividad de moléculas bioactivas. En los procesos de pasteurización térmica, la alta temperatura a la que se somete la leche es responsable, por ejemplo, de la pérdida de bioactividad de los componentes bioactivos de la leche. Por otra parte, con respecto al tratamiento de CEP en el contexto de la presente memoria descriptiva, es posible elegir una temperatura inicial de la composición de modo que se optimiza la inactivación microbiana mediante el tratamiento de CEP, al tiempo que la bioactividad de las moléculas bioactivas presentes naturalmente en la leche se conserva, por ejemplo, en mayor medida que en el caso de los procesos de pasteurización térmica. Se destaca que el tratamiento de CEP de acuerdo con la invención no se considera un proceso de "pasteurización térmica", aunque la temperatura de la composición aumenta ligeramente en el transcurso del tratamiento de CEP debido a la energía aplicada. Basándose en experimentos específicos y deducción matemática basada en la bibliografía (no mostrada aquí), los inventores pudieron demostrar que, en el método de la invención, la inactivación microbiana se debe principalmente a los pulsos eléctricos de alta intensidad del tratamiento de CEP. Dependiendo de los parámetros del proceso, >80 %, en particular >90 %, >95 % >97 % e incluso >99 % de la reducción de las ufc se debe a los pulsos eléctricos de alta intensidad y solo en una pequeña parte (p. ej., <20 %, incluso <10 %, etc.) se debe a inactivación térmica. Los parámetros del proceso que maximizan la inactivación mediante pulsos eléctricos y minimizan la inactivación térmica se prefieren en el contexto de la presente invención.

35 En el método de la presente invención, las composiciones pueden tener una temperatura inicial y una final. La temperatura inicial de la composición se define generalmente como la temperatura de la composición inmediatamente anterior al tratamiento de CEP, en particular antes de entrar en la primera cámara de tratamiento. La temperatura final es la temperatura al final del tratamiento de CEP, en particular, la temperatura de la composición al salir de la última cámara de tratamiento. La temperatura final generalmente corresponde también a la temperatura más alta que asume la composición durante el tratamiento de CEP, porque el tratamiento de CEP por sí mismo sólo causa aumento de la temperatura de la composición y no descenso. Si hay una secuencia de cámaras de tratamiento de CEP, o incluso de pares de cámaras de tratamiento, sólo se puede distinguir una temperatura intermedia, por ejemplo, la temperatura entre dos cámaras de tratamiento o pares de cámaras de tratamiento correlativas.

45 De manera interesante, la temperatura inicial de la composición tiene una influencia sobre la inactivación microbiana. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se propone la hipótesis de que las membranas de los microorganismos se están haciendo más fluidas a altas temperaturas. A temperaturas bajas, la membrana es generalmente cristalina, lo cual puede explicar el menor índice de inactivación mediante el tratamiento de CEP. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, el efecto positivo de una temperatura inicial más alta puede, por tanto, atribuirse generalmente a la conformación cambiante de la bicapa de fosfolípidos.

50 La presente invención se basa, al menos parcialmente, en el hallazgo de que hay una temperatura inicial que permite obtener una inactivación microbiana sustancial, mediante la cual, esta temperatura inicial de la composición es tal que no conlleva la inactivación de las moléculas bioactivas deseadas que están presentes en la composición.

55 Preferentemente, la temperatura inicial de la composición es de 20 a 45 °C, preferentemente de 24 a 36 °C, por ejemplo 25-35 °C, más preferentemente 26-34 °C, de 27-33 °C, 28-32 °C, 29-31 °C, preferentemente alrededor de 30 °C. La temperatura inicial es la temperatura de la composición antes de entrar en la primera cámara de tratamiento del tratamiento de CEP. La temperatura puede ajustarse usando sistemas de calentamiento adecuados, por ejemplo, un tanque de calentamiento, o en los métodos continuos, tales como el uso de intercambiadores de calor, por ejemplo, intercambiadores de calor de placas.

60 El ajuste de la temperatura de la composición puede llevarse a cabo de forma discontinua o continua.

65 Tal como se menciona en otras partes en esta memoria descriptiva, el tratamiento de CEP causa un ligero aumento de la temperatura de la composición tratada con CEP. Se destaca que a pesar del ligero aumento de la temperatura debido al tratamiento de CEP, preferentemente, la temperatura de la composición permanece significativamente por debajo de las temperaturas que se usan en los procesos de pasteurización térmica. Por esta razón, la actividad de las

moléculas bioactivas puede conservarse en una medida significativa.

El tratamiento de CEP es preferentemente tal que la temperatura final de la composición después del tratamiento de CEP, por ejemplo, después de salir de la última cámara de tratamiento, es de 64 °C o menor, preferentemente de 63 °C o menor, más preferentemente de 62 °C o menor, lo más preferentemente de 61 °C o menor y más preferentemente aún menor, por ejemplo de 60 °C, 59 °C, 58 °C, 57 °C, 56 °C, 55 °C, 54 °C, 53 °C, 50 °C o menor. Preferentemente, estas temperaturas también corresponden a la temperatura máxima de la composición durante todo el tratamiento de CEP, la cual puede controlarse tal como se desvela en esta memoria descriptiva.

La temperatura final puede ajustarse eligiendo los parámetros del tratamiento de CEP tales como, por ejemplo, el diseño de la cámara de tratamiento, la energía específica, la energía del pulso, la fuerza de campo eléctrico y así sucesivamente. Por ejemplo, el uso de una cámara de tratamiento colineal que incluye un elemento interior tal como se discute en otras partes de esta memoria descriptiva resulta sorprendentemente en una menor temperatura final si se compara con un proceso en el que dicho elemento interior está ausente. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se propone la hipótesis de que dicho elemento interior mejora la homogeneidad del campo eléctrico al cual se expone la composición y, por lo tanto, minimiza los aumentos de temperatura debidos al tratamiento de CEP.

De acuerdo con una realización, el método de la invención puede comprender una etapa final de refrigeración, en particular de enfriamiento, para la estabilización final de la composición. El enfriamiento previene el crecimiento de microorganismos que pueden no haberse inactivado o previene el crecimiento resultante de esporas microbianas que pueden estar presentes en la composición. El enfriamiento final puede ser a una temperatura de 0 a 10 °C, de 1 a 8 °C, de 2 a 7 °C, de 3 a 6 °C, por ejemplo, de alrededor de 3,5 a 5 °C. Se destaca que los productos pasteurizados, incluyendo productos pasteurizados térmicamente, necesitan generalmente enfriamiento al final de la pasteurización. El enfriamiento al final del tratamiento de CEP es, por tanto, una realización particular de los métodos de la invención.

De acuerdo con una realización, el método de la invención comprende una etapa de deshidratación, preferentemente de deshidratación por congelación o deshidratación por pulverización de la composición. La composición puede refrigerarse primero como se ha indicado anteriormente, o puede deshidratarse directamente después del tratamiento de CEP. Por ejemplo, la composición puede someterse a deshidratación por pulverización como es convencional, pero preferentemente a temperaturas bajas. Si se desea, puede añadirse materia seca adicional (maltodextrina u otros carbohidratos, proteína, etc.) a la composición antes de la deshidratación (pulverización). La composición puede guiarse hacia una torre de deshidratación por pulverización. De manera interesante, el proceso de deshidratación (pulverización), en particular si se usan temperaturas bajas, no resulta necesariamente en inactivación o desnaturalización de moléculas bioactivas presentes en la composición. Por ejemplo, puede usarse un proceso de deshidratación por pulverización tal como se divulga en el documento EP 0818529 y en los documentos citados en este documento de patente. Los documentos citados en el documento EP 0818529 desvelan temperaturas del aire entrante en el intervalo de 100-180 °C o incluso tan bajas como 60-165 °C en el proceso de deshidratación por pulverización. En el documento US 5.116.953 se desvela la deshidratación por pulverización de una solución de lactoferrina acuosa (temperatura del aire de entrada de p. ej., 140 °C), de modo que se obtiene lactoferrina deshidratada por pulverización en polvo, mediante la cual la lactoferrina deshidratada por pulverización conservó la actividad de unión al hierro de la lactoferrina.

Por consiguiente, después del tratamiento de CEP, la composición puede refrigerarse y/o deshidratarse, por ejemplo, deshidratarse por pulverización.

El método de la invención resulta preferentemente en una reducción del recuento microbiano (ufc) en la composición de al menos 4 log, preferentemente al menos 4,5 log, más preferentemente al menos 5 log, aún más preferentemente al menos 5,5 log y lo más preferentemente 6 log o más. Estos valores se aplican a cualquiera de las especies microbianas presentes en la composición y más preferentemente a todas ellas. Más preferentemente, estos valores se aplican a microorganismos patógenos que pueden encontrarse en la leche.

De acuerdo con una realización, la composición tratada con CEP obtenible mediante el método de la invención no contiene ningún microorganismo vegetativo detectable.

La presente invención también se relaciona con una composición que se obtiene mediante los métodos de la invención.

Por consiguiente, la composición de la invención, en particular una composición después del tratamiento de acuerdo con el método de la invención, puede ser una composición líquida o una composición deshidratada.

La composición comprende preferentemente moléculas bioactivas que están presentes de forma natural en la leche sin procesar. La composición puede comprender la propia leche sin procesar, o una fracción de la misma, o las moléculas bioactivas pueden aislarse y/o separarse de la leche sin procesar y añadirse a una composición para obtener la composición que se someterá al método de la invención y o al tratamiento de CEP de acuerdo con la invención. Las moléculas bioactivas pueden añadirse añadiendo una fracción láctea o componente lácteo aislado que comprende las moléculas bioactivas a otra composición para obtener una composición que se someterá al tratamiento

de la invención. La invención también abarca la posibilidad de que una fracción o componente lácteo se someta de por sí al método de la invención. De acuerdo con la invención también se abarca que la composición comprende leche sin procesar, una fracción de la misma, por ejemplo leche descremada, leche semidescremada, o suero lácteo, a la cual se añaden ingredientes adicionales, por ejemplo, sabores, edulcorantes, fibra, nutracéuticos, etc., en general. En este caso, la composición comprende un ingrediente lácteo e ingredientes adicionales, ingredientes adicionales que no aparecen en la lecho o no en la misma cantidad.

De acuerdo con una realización alternativa, la composición se basa sustancialmente en leche o en una fracción láctea, tal como las que se desvelan en esta memoria descriptiva, preferentemente las seleccionadas de entre leche entera y leche con contenido en grasa reducido (grasa reducida, baja en grasa, desgrasada), suero lácteo y proteína láctea y está sustancialmente libre de cualquier micro y/o macronutriente añadido.

De acuerdo con una realización alternativa, la composición se basa sustancialmente en leche o en una fracción láctea, tal como las que se desvelan en esta memoria descriptiva, preferentemente las mencionadas en el párrafo anterior, en el que la composición puede comprender sabores y/o edulcorantes añadidos pero está preferentemente sustancialmente libre de cualquier molécula bioactiva añadida que aparece de forma natural en la leche y/o está sustancialmente libre de cualquier proteína bioactiva añadida que aparece de forma natural en la leche.

"Sustancialmente libre" para el fin de la presente memoria descriptiva, significa ≤ 5 %, preferentemente ≤ 3 %, más preferentemente ≤ 1 %, aún más preferentemente $\leq 0,5$ % y lo más preferentemente totalmente libre, en la que los porcentajes se expresan como porcentaje por peso de materia seca de la composición.

Para el fin de la presente memoria descriptiva, una molécula bioactiva aún está activa si es capaz de asegurar su función natural. Con respecto a las proteínas bioactivas, la proteína bioactiva generalmente ya no es activa si se ha desnaturalizado. Para el fin de la presente memoria descriptiva se considera que una proteína es "bioactiva" si está presente en su forma nativa, no desnaturalizada.

De acuerdo con una realización, la composición comprende una o más proteínas o péptidos en forma nativa. Una "proteína", para el fin de la presente invención, es un polipéptido que comprende una secuencia de alrededor de 9 o más, preferentemente alrededor de 25 o más y lo más preferentemente alrededor de 40 o más aminoácidos. Generalmente, para ser capaces de realizar su función biológica, las proteínas se pliegan en una o más conformaciones espaciales específicas. Generalmente, un anticuerpo, por ejemplo, es activo si aún es capaz de unirse al antígeno frente al cual es específico el anticuerpo. Una enzima es activa si es capaz de catalizar su reacción enzimática. Las proteínas que son capaces de unirse a un receptor son activas generalmente si conservan su capacidad de unirse y, preferentemente, activar dicho receptor. Generalmente puede evaluarse si una proteína está o no desnaturalizada usando un anticuerpo que sea específico para la proteína nativa.

Generalmente, el anticuerpo no se une a la proteína no activa desnaturalizada, o se une a la proteína desnaturalizada con una afinidad sustancialmente reducida.

La expresión "molécula activa" para el fin de la presente memoria descriptiva, se refiere a una molécula bioactiva. En lugar de "molécula bioactiva", puede usarse la expresión "un bioactivo" (forma plural "bioactivos") y se considera como equivalente en esta memoria descriptiva. Para el fin de la presente invención, la idoneidad del método de la invención para conservar la actividad de las moléculas bioactivas puede ensayarse añadiendo a la composición una proteína específica, por ejemplo un anticuerpo y comprobando la capacidad del anticuerpo de la composición de unirse a su antígeno después del tratamiento de acuerdo con el método de la invención. La capacidad de unión puede compararse con la capacidad de unión de un anticuerpo presente en un control sin tratar de la composición el cual se añadió el anticuerpo en las mismas cantidades.

Para evaluar si una proteína está presente en su forma nativa, se usa preferentemente un ELISA, tal como se describe en los ejemplos a continuación. Por consiguiente, se usan pares de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína nativa (proteína que también puede ser un anticuerpo). La comparación de las cantidades de molécula bioactiva detectable por ELISA en la composición antes (control sin tratar) y después del tratamiento de CEP, permite, por ejemplo, determinar cuánta proteína ha conservado su integridad después del tratamiento de CEP, detectada esta integridad conservada mediante una unión conservada por los anticuerpos específicos de la proteína usados para el ELISA.

Más generalmente, la cantidad de moléculas bioactivas en la composición de la invención o de una composición de control pueden determinarse usando métodos aceptados para medir bioactividad, incluyendo, pero sin limitarse a, HPLC, ensayos basados en células, ensayos basados en enzimas, ensayos de ELISA, ensayos de citometría de flujo (que se están convirtiendo en una alternativa aceptada al ELISA), radioinmunoensayos y ensayos *in vivo* usando modelos animales.

Por ejemplo, los métodos aceptados para evaluar la cantidad de lactoferrina nativa incluyen pero no se limitan a métodos cromatográficos (Palmano et al. Journal of Chromatography, 947, 307-311, 2002), técnicas inmunológicas incluyendo ELISA (Desmazeaud, Bulletin of International Dairy Federation vol. 284, Lactoferrin (págs. 29-42), 1993) e

inmunoensayos biosensores (Indyk et al., International Dairy Journal, 15(5): 429-438, 2005). La integridad de lactoferrina, inmunoglobulinas, factores de crecimiento y otras proteínas puede medirse tal como se describe en los ejemplos a continuación.

5 El caseinglucomacropéptido (CGMP o glucomacropéptido, GMP, como se puede denominar también) se libera a partir de la caseína kappa a través de una etapa de coagulación de la caseína mediada por el cuajo (a través de la acción de la quimosina). Se encuentra en la fracción del suero lácteo que se conoce como suero lácteo dulce o suero del queso. El CGMP puede recuperarse y, por tanto, cuantificarse mediante intercambio aniónico. Es un agente promotor de la salud ósea.

10 El método preferido para determinar la cantidad absoluta total de una proteína específica de acuerdo con la invención, incluyendo la cantidad de proteína específica en forma desnaturalizada y/o nativa, se desvela adicionalmente a continuación.

15 La molécula bioactiva citada en el presente documento puede seleccionarse independientemente de entre proteínas nativas, lípidos bioactivos, ácido siálico, nucleótidos, oligosacáridos, aminoácidos, taurina y vitaminas.

20 Preferentemente, dichas moléculas bioactivas se seleccionan independientemente de entre una o más del grupo que consiste en, por ejemplo: una o más de las proteínas que están presentes de forma natural en la leche; uno o más de los lípidos que están presentes de forma natural en la leche; una o más de las vitaminas que están presentes de forma natural en la leche, ácido siálico, nucleótidos, oligosacáridos, aminoácidos y taurina.

25 De acuerdo con la presente invención, la composición de la invención comprende bioactivos lácteos a base de proteínas. Al mismo tiempo, el método de la presente invención preferentemente no afecta, en particular reduce parcial o totalmente, la actividad de otras moléculas bioactivas, tales como las que son termosensibles. En particular, la composición de la invención comprende vitaminas activas que aparecen de forma natural en la leche.

30 De acuerdo con una realización preferida de la invención, dicha una o más molécula bioactiva se selecciona de proteínas bioactivas. Dicha proteína se selecciona preferentemente de entre factores antimicrobianos, inmunoglobulinas y factores de crecimiento, citocinas y/o factores pro/antiinflamatorios, quimiocinas, enzimas, incluyendo enzimas digestivas, hormonas proteicas, transportadores, glucomacropéptido, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, proteínas de la membrana del glóbulo graso lácteo y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente, en la que al menos un 30 % de la proteína respectiva está en una forma activa.

35 Preferentemente, estas proteínas nativas están presentes en la composición tratada con CEP en cantidades absolutas o relativas tal como se especifica en otras partes de esta memoria descriptiva.

40 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende factores antimicrobianos nativos, los cuales pueden seleccionarse del grupo que consiste en inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, péptidos antimicrobianos tales como β -defensinas, complemento C3 y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente.

45 Las inmunoglobulinas pueden comprender una o más seleccionadas de entre IgA, IgE, IgG e IgM en forma nativa y combinaciones de dos o más de éstas. Se ha publicado que estas inmunoglobulinas aparecen en la leche de vaca. Las inmunoglobulinas pueden comprender además IgD. Preferentemente, las inmunoglobulinas son IgA e IgG.

50 Algunas inmunoglobulinas tienen diferentes subtipos. La composición de la invención puede comprender uno, una combinación de varios o todos los subtipos de una inmunoglobulina dada que aparece de forma natural en la leche. Son subtipos de IgA IgA1 y/o IgA2. Son subtipos de IgG los subtipos IgG1, IgG2a, IgG 2b, IgG2c, IgG3, IgG 4. La composición de la invención puede comprender uno, una combinación de dos o más o todos los subtipos de IgA, IgG y posiblemente otras IgG, en particular, en forma nativa.

55 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende factores de crecimiento en forma nativa, los cuales pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre factores de crecimiento epidérmicos (EGF, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento nerviosos (NGF), factores de crecimiento insulínicos (IGF), factores de crecimiento transformantes (TGF), factor de crecimiento del calostro bovino (BCGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), hormona del crecimiento (GH), factores de crecimiento mamario (MDGF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente.

60 TGF incluye, en particular, TGF- β . Por ejemplo, la composición de la invención comprende TGF- β 1 nativo y/o TGF- β 2 nativo.

65 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende citocinas, quimiocinas en forma nativa y/o factores pro/antiinflamatorios en forma nativa, tales como los que pueden seleccionarse de entre factores de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), interleucinas (IL), tales como IL-1, -2, -4, -5, -6, -8, -10, interferón (IFN)- γ , TGF,

α 1-antitripsina, α 1-antiquimotripsina, prostaglandinas, factor activador de plaquetas proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, RANTES (siglas en inglés de quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T normales) y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente.

5 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende enzimas nativas, por ejemplo, enzimas digestivas activas tales como las seleccionadas del grupo de amilasa, esterasa estimulante de ácidos biliares, lipasa estimulante de ácidos biliares, lipoproteína-lipasa, proteasas tales como plasmina, o enzimas no digestivas activas tales como las seleccionadas de entre fosfatasa alcalina, lactoperoxidasa, lisozima, y combinaciones de dos o más de las mencionadas anteriormente.

10 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende hormonas activas/nativas, las seleccionadas del grupo de insulina, prolactina, oxitocina, retroinhibidor de la lactancia (FIL), hormonas tiroideas, hormonas esteroides, corticosteroides, hormona adrenocorticotropa (ACTH), bombesina, colecistocinina, estrógenos, gastrina, hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GNRH), neurotensina, hormona paratiroidea (PTH) testosterona, hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona liberadora de tiotropina (TRH), péptido vasoactivo intestinal (VIP), calcitonina, hormona paratiroidea, eritropoyetina y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente. Preferentemente, la composición comprende una o más hormonas proteicas en forma nativa.

20 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende proteínas transportadoras activas, por ejemplo las seleccionadas del grupo de lactoferrina, aglutinante de folato, aglutinante de IGF, aglutinante de cobalamina, aglutinante de tiroxina, aglutinante de corticosteroide, aglutinantes de vitaminas y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente.

25 De acuerdo con una realización preferida, la composición comprende una o más proteínas nativas seleccionadas de entre inmunoglobulinas nativas, lactoferrina nativa, β -lactoglobulina nativa, α -lactoalbúmina nativa y TGF- β nativo.

30 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende vitaminas activas, En particular, el tratamiento de CEP de la composición tiene escaso impacto sobre varias, la mayoría o todas las vitaminas que aparecen de forma natural en la leche. Por lo tanto, la composición de la invención comprende vitaminas hidro y/o liposolubles. La composición comprende preferentemente una o más vitaminas seleccionadas de entre (lista no exhaustiva) el grupo de vitamina A, D, E, K, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina), B7 (biotina), B9 (folato), B12 (cobalamina), y C (L-ascorbato). Preferentemente, la composición comprende las vitaminas hidrosolubles que están presentes de forma natural en la leche, que son las dichas anteriormente con la excepción de las vitaminas A y E.

35 Las vitaminas citadas anteriormente incluyen todas las formas de dichas vitaminas que puede adsorber y utilizar el metabolismo de los seres humanos. La referencia a la vitamina E incluye y consiste preferentemente en α -tocoferol y γ -tocoferol; la referencia a la vitamina C incluye ácido ascórbico y ácido deshidroascórbico; la vitamina A se cita como equivalentes de retinol (ER).

40 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende al menos una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de una proteína bioactiva que aparece de forma natural en la leche, en la que al menos un 30 % de dicha proteína está presente en una forma nativa. Las cantidades y porcentajes preferidos tal como se dan en otras partes de esta memoria descriptiva con respecto a proteínas bioactivas específicas también se aplican a esta realización.

50 Se destaca que una proteína desnaturalizada generalmente ya no tiene la actividad biológica de la proteína plegada original tal como aparece en la leche sin procesar. Aunque la proteína desnaturalizada aún tiene la misma secuencia de aminoácidos que la activa no desnaturalizada, un anticuerpo que es específico para la proteína activa generalmente no se une, o se une con una afinidad sustancialmente reducida, a la proteína inactiva desnaturalizada. Por lo tanto, la proteína puede estar presente aún, por ejemplo, en una composición pasteurizada térmicamente, pero la proteína ya no es nativa/activa.

55 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende un 30 % o más, preferentemente un 40 %, más preferentemente un 50 % o más, en particular un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más de una proteína específica en una forma nativa, comparada con la cantidad total de dicha proteína en dicha composición.

60 Para el fin de la presente memoria descriptiva, los porcentajes se aplican a porcentaje en moles o porcentaje en peso, ya que los porcentajes se refieren a una proteína específica de una masa molecular dada. El porcentaje puede determinarse mediante métodos tal como se especifican en otras partes en esta memoria descriptiva.

65 La cantidad total o absoluta de cualquier proteína especificada, incluyendo proteína nativa y desnaturalizada y/o degradada en una composición puede determinarse analíticamente. El método preferido para usar de acuerdo con la presente invención se base en espectrometría de masas-monitorización de reacción seleccionada por cromatografía líquida de alta resolución (LC-HSRM- MS, por sus siglas en inglés). El método lo desvelan para las proteínas de la membrana del glóbulo graso lácteo B. Y. Fong y C. S. Norris "Quantification of Milk Fat Globule Membrane Proteins

Using Selected Reacción Monitoring Mass Spectrometry" J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 6021-6028. Este método puede adaptarse a cualquier proteína identificando secuencias de péptidos de escisión específicas que pueden generarse usando proteasas seguido de cuantificación de estos péptidos por espectrometría de masas para determinar/calcular las cantidades de proteína específica total.

5 Por lo tanto, cuantificando proteína nativa por ELISA y proteína total usando LC-HSRM-MS, puede determinarse qué porcentaje de cualquier proteína específica (por ejemplo, lactoferrina) está presente en forma nativa en una composición dada.

10 Por tanto, pueden usarse tanto ELISA como LC-HSRM-MS para determinar la cantidad de proteína específica en una muestra, mientras que el ELISA sólo es adecuado para cuantificar la proteína en su forma nativa. Por lo tanto, cuando una muestra de una composición no contiene ninguna proteína desnaturalizada (p. ej., leche sin procesar no tratada), ambos métodos dan el mismo resultado con buena correspondencia.

15 También se puede normalizar un método con (p. ej., ELISA) con respecto al otro (p. ej., LC-HSRM-MS) basándose en una muestra que contenga la proteína respectiva sólo en forma nativa. Esto puede ayudar a reducir el margen de error al determinar la cantidad de proteína nativa en una muestra que también contiene proteína desnaturalizada.

20 Para los fines de la presente memoria descriptiva, los porcentajes indicados en esta memoria descriptiva pueden incluir un margen de error de $\leq 15\%$, preferentemente $\leq 10\%$, más preferentemente $\leq 5\%$, aún más preferentemente $\leq 3\%$ y lo más preferentemente $\leq 2\%$. Las expresiones "alrededor de" y/o "sustancialmente", a menos que se defina otra cosa y si se refieren a cualquier valor específico, pretenden significar $\pm 15\%$ del valor respectivo, preferentemente $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, aún más preferentemente $\pm 3\%$ y lo más preferentemente $\pm 2\%$.

25 Para el fin de la presente memoria descriptiva, la expresión "proteína específica" se refiere a una proteína de una secuencia de aminoácidos dada o que pertenece a un grupo de proteínas con secuencias altamente idénticas y funciones similares. Por ejemplo, generalmente se considera que todas las IgA contenidas en una muestra o composición son una proteína específica, pero también la suma de IgA de cualquier subtipo específico de IgA puede considerarse como una proteína específica. Preferentemente, la expresión "proteína específica" se refiere a proteínas que son cuantificables como una unidad o entidad con los métodos que se adjuntan en el presente documento. Para ilustrar esto, se usa preferentemente ELISA para cuantificar toda la IgA nativa presente en una muestra. Por otra parte, hay ensayos de ELISA más específicos que son capaces de identificar un subtipo de una familia de proteínas dada, por ejemplo, un subtipo de IgA.

35 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende IgA activa, incluyendo uno o más subtipos tal como se indica en otras partes de esta memoria descriptiva. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más IgA en forma activa si se compara con el total de IgA en la composición.

40 La IgA "total", cualquier otra proteína específica (tal como IgG, lactoferrina, etc.), significa la suma de IgA nativa y desnaturalizada presente en la composición o muestra.

45 Se encontró que la concentración de IgA en una muestra particular de leche sin procesar sin tratar fue de 135 $\mu\text{g/ml}$. La composición de la invención comprende preferentemente IgA nativa a una cantidad de alrededor de los porcentajes anteriores de 135 $\mu\text{g/ml}$.

50 De acuerdo con una realización, la composición comprende IgG nativa, incluyendo uno o más subtipos tal como se indica en otras partes de esta memoria descriptiva. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más IgG en forma nativa si se compara con el total de IgG en la composición.

55 Se encontró que la concentración de IgG en una muestra particular de leche sin procesar sin tratar fue de alrededor de 860 $\mu\text{g/ml}$. La composición de la invención comprende preferentemente IgG a una cantidad de alrededor de los porcentajes anteriores de 860 $\mu\text{g/ml}$.

De acuerdo con una realización, la composición comprende IgE nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más IgE en forma nativa si se compara con el total de IgE en la composición.

60 De acuerdo con una realización, la composición comprende IgM nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más IgM en forma nativa si se compara con el total de IgM en la composición.

65 De acuerdo con una realización, la composición comprende preferentemente lactoferrina nativa. La lactoferrina tiene propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas y antiinflamatorias. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 77 %, 80 %, 82 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más lactoferrina en

forma nativa si se compara con el total de lactoferrina en la composición. De acuerdo con una realización, la composición comprende lactoferrina, en la que al menos un 75 % de la lactoferrina total en dicha composición está presente en forma nativa.

5 Se encontró que la concentración de lactoferrina en muestras particulares de leche sin procesar sin tratar fue de alrededor de 150-200 mg/l. La composición de la invención comprende preferentemente lactoferrina nativa a una cantidad de los porcentajes anteriores de 150mg/ml.

10 De acuerdo con una realización, la composición comprende lisozima nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más lisozima en forma nativa si se compara con el total de lisozima en la composición.

15 De acuerdo con una realización, la composición comprende EGF nativo. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más EGF en forma nativa si se compara con el total de EGF en la composición.

20 De acuerdo con una realización, la composición comprende NGF nativo. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más NGF en forma nativa si se compara con el total de NGF en la composición.

De acuerdo con una realización, la composición comprende IGF nativo. Preferentemente, la composición comprende alrededor de un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más IGF en forma nativa si se compara con el total de IGF en la composición.

25 De acuerdo con una realización, la composición comprende TGF nativo. Preferentemente, la composición comprende alrededor de un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más TGF, en particular TGF- β 1 y/o TGF- β 2, en forma nativa si se compara con el total de TGF, en particular TGF- β 1 y/o TGF- β 2, en la composición.

30 Se encontró que la concentración de TGF- β 1 en una muestra particular de leche sin procesar sin tratar fue de alrededor de 0,35 ng/ml. La composición de la invención comprende preferentemente TGF- β 1 nativo a una cantidad de alrededor de los porcentajes anteriores de 0,35 ng/ml.

35 Se encontró que la concentración de TGF- β 2 en una muestra particular de leche sin procesar sin tratar fue de alrededor de 40 ng/ml. La composición de la invención comprende preferentemente TGF- β 2 nativo a una cantidad de alrededor de los porcentajes anteriores de 40 ng/ml.

40 De acuerdo con una realización, la composición comprende interleucinas nativas. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más interleucinas en forma nativa si se compara con el total de interleucinas en la composición.

45 De acuerdo con una realización, la composición comprende IFN- γ nativo. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más IFN- γ en forma nativa si se compara con el total de IFN- γ en la composición.

De acuerdo con una realización, la composición comprende α 1-antitripsina nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más α 1-antitripsina en forma nativa si se compara con el total de α 1-antitripsina en la composición.

50 De acuerdo con una realización, la composición comprende amilasa nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más amilasa en forma nativa si se compara con el total de amilasa en la composición.

55 De acuerdo con una realización, la composición comprende esterasa estimulante de ácidos biliares nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más esterasa estimulante de ácidos biliares en forma nativa si se compara con el total de esterasa estimulante de ácidos biliares en la composición.

60 De acuerdo con una realización, la composición comprende lipasa estimulante de ácidos biliares nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 %, o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más lipasa estimulante de ácidos biliares en forma nativa si se compara con el total de lipasa estimulante de ácidos biliares en la composición.

65 De acuerdo con una realización, la composición comprende lipoproteína lipasa nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más lipoproteína lipasa en forma nativa si se compara con el total de lipoproteína lipasa en la composición.

- De acuerdo con una realización, la composición comprende prolactina nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más prolactina en forma nativa si se compara con el total de prolactina en la composición.
- 5 De acuerdo con una realización, la composición comprende oxitocina nativa. Preferentemente, la composición comprende un 30 % o más, preferentemente un 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o más oxitocina en forma nativa si se compara con el total de oxitocina en la composición.
- 10 De acuerdo con una realización, la composición comprende aglutinante de folato nativo. Preferentemente, la composición comprende un 50 % o más, preferentemente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más aglutinante de folato nativo en forma nativa si se compara con el total de aglutinante de folato nativo en la composición.
- 15 De acuerdo con una realización, la composición comprende aglutinante de IGF nativo. Preferentemente, la composición comprende un 50 % o más, preferentemente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más aglutinante de IGF nativo en forma nativa si se compara con el total de aglutinante de IGF nativo en la composición.
- 20 De acuerdo con una realización, la composición comprende α -lactoalbúmina nativa. Preferentemente, la composición comprende un 50 % o más, preferentemente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más α -lactoalbúmina en forma nativa si se compara con el total de α -lactoalbúmina en la composición.
- 25 De acuerdo con una realización, la composición comprende β -lactoglobulina nativa. Preferentemente, la composición comprende un 50 % o más, preferentemente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o más β -lactoglobulina en forma nativa si se compara con el total de β -lactoglobulina en la composición.
- 30 De acuerdo con una realización, la composición comprende una o más seleccionadas de entre lactoferrina nativa, IgA nativa, IgG nativa, TGF- β 1 nativo, TGF- β 2 nativo y combinaciones de los mismos.
- De acuerdo con una realización, la composición tratada con CEP de la invención comprende lactoferrina, IgA, IgG, TGF- β 1, y TGF- β 2 en forma nativa en cantidades correspondientes a al menos un 50 % de lactoferrina, al menos un 30 % de IgA, al menos un 50 % de IgG, al menos un 50 % de TGF- β 1, y al menos un 50 % de TGF- β 2 en forma nativa, con respecto a la cantidad total de la proteína respectiva en la composición.
- 35 Preferentemente, la composición comprende al menos un 60 %, preferentemente un 65 % o más 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más de lactoferrina nativa; 40 % o más, 45 % o más, 50 % o más, 55 % o más, 56 % o más de IgA nativa; 60 % o más, 65 % o más, 70 % o más, 77 % o más, 80 % o más de IgG nativa; 55 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más de TGF- β 1 nativo; y/o 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más de TGF- β 2 nativo; en la que dichos porcentajes se refieren a la cantidad total de la proteína respectiva en la composición.
- 40 De acuerdo con una realización, la composición tratada con CEP comprende una o más seleccionadas de entre: al menos 38 mg/ml de lactoferrina nativa, al menos 40,5 μ g/ml de IgA, al menos 434 μ g/ml de IgG, al menos 0,19 ng/ml de TGF- β 1 nativo, y al menos 20,7 ng/ml de TGF- β 2 nativo.
- 45 De acuerdo con una realización, la composición tratada con CEP comprende una o más seleccionadas de entre: al menos 50 mg/ml de lactoferrina nativa, al menos 60 μ g/ml de IgA, al menos 600 μ g/ml de IgG, al menos 0,25 ng/ml de TGF- β 1 nativo, y al menos 30 ng/ml de TGF- β 2 nativo.
- 50 De acuerdo con una realización, la composición tratada con CEP comprende una o más seleccionadas de entre: al menos 60 mg/ml de lactoferrina nativa, al menos 70 μ g/ml de IgA, al menos 700/ml μ g de IgG, al menos 0,30 ng/ml de TGF- β 1 nativo, y al menos 35 ng/ml de TGF- β 2 nativo.
- 55 De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende uno o más de vitaminas bioactivas seleccionadas del grupo de A, D, E, K, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, y C.
- De acuerdo con una realización, la composición de la invención comprende vitamina A. La vitamina A generalmente se destruye completamente mediante la pasteurización térmica. Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina A en forma activa, en comparación con un control sin tratar.
- 60 En una muestra de leche sin procesar sin tratar, se encontraron 300 μ g de vitamina A por kg (por kg de leche sin procesar). La composición de la invención comprende preferentemente, en particular si es leche entera, al menos las cantidades absolutas de vitamina A en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores. En otras palabras, la composición comprende alrededor de un 50 % o más, 180 μ g (60 %) o más, 210 μ g (70 %) o más, 240 μ g (80 %) o más, 255 μ g (85 %) o más, 270 μ g (90 %) o, 285 μ g (95 %) o más vitamina A por kg de la composición.
- 65 De acuerdo con una realización, la composición comprende vitamina K. Preferentemente, la composición comprende un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de vitamina K en forma activa, en comparación con un control sin tratar. En la leche entera se encontraron alrededor de 45 μ g de vitamina K por kg. La composición de la

invención comprende preferentemente, en particular si es leche entera, al menos las cantidades absolutas de vitamina K en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores (tal como se ilustra con respecto a la vitamina A).

5 De acuerdo con una realización, la composición comprende vitamina D. Preferentemente, la composición comprende un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de vitamina D en forma activa, en comparación con un control sin tratar. Se encontró que la leche entera comprendía alrededor de 10 µg de vitamina D por kg. La composición de la invención comprende preferentemente, en particular si es leche entera, al menos las cantidades absolutas de vitamina D en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.

10 De acuerdo con una realización, la composición comprende vitamina E. Preferentemente, la composición comprende un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más de vitamina E en forma activa, en comparación con un control sin tratar.

15 Como las vitaminas K, D y E son más estables con respecto a la temperatura, la diferencia en los niveles de dichas vitaminas en la composición de la invención en comparación con la pasteurización térmica es menor.

20 Las cantidades de vitaminas hidrosolubles presentes en la leche entera corresponden sustancialmente a las cantidades presentes en la leche semidescremada, leche descremada, leche con grasa reducida, leche baja en grasa o leche no grasa, ya que estas vitaminas están presentes sustancialmente en la fracción no grasa de la leche entera.

De acuerdo con una realización, la composición comprende B1 (tiamina). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina B1 en forma activa, en comparación con un control sin tratar.

25 En una muestra de leche sin procesar sin tratar entera se determinaron alrededor de 400 µg de vitamina B1 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B1 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores. En otras palabras, la composición de la invención comprende 250 µg (50 %) o más, 300 µg (60 %) o más, etc., de vitamina B1.

30 De acuerdo con una realización, la composición comprende B2 (riboflavina). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina B2 en forma activa, en comparación con un control sin tratar. Se encontró que la leche entera sin tratar tenía alrededor de 1600 µg de vitamina B2 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B2 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.

35 De acuerdo con una realización, la composición comprende B3 (niacina). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más vitamina B3 en forma activa, en comparación con un control sin tratar. Se encontró que la leche entera sin tratar tenía alrededor de 800 µg de vitamina B3 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B3 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.

40 De acuerdo con una realización, la composición comprende B5 (piridoxina). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina B5 en forma activa, en comparación con un control sin tratar. La leche entera sin tratar comprende alrededor de 3000 µg de vitamina B2 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B5 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.

45 De acuerdo con una realización, la composición comprende B6 (piridoxina). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más vitamina B6 en forma activa, en comparación con un control sin tratar. Se encontró que la leche entera sin tratar contenía alrededor de 400 µg de vitamina B3 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B6 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.

50 De acuerdo con una realización, la composición comprende B7 (biotina). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina B7 en forma activa, en comparación con un control sin tratar. Se encontró que la leche entera sin tratar contenía alrededor de 20 µg de vitamina B7 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B6 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.

55 De acuerdo con una realización, la composición comprende B9 (folato). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina B9 en forma activa, en comparación con un control sin tratar. Se encontró que la leche entera sin tratar contenía alrededor de 50 µg de vitamina B9 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B9 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.

65

- 5 De acuerdo con una realización, la composición comprende B12 (cobalamina). Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina B12 en forma activa, en comparación con un control sin tratar. La leche entera sin tratar comprende alrededor de 4 µg de vitamina B12 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina B12 tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.
- 10 De acuerdo con una realización, la composición comprende vitamina C. Preferentemente, la composición comprende un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de vitamina C en forma activa, en comparación con un control sin tratar. Se encontró que la leche entera sin tratar contenía alrededor de 10 µg de vitamina B9 por kg. La composición de la invención comprende preferentemente al menos las cantidades absolutas de vitamina C tal como se encuentran en la leche entera correspondientes a los porcentajes anteriores.
- 15 Varias vitaminas, en particular una o más de las vitaminas A, B1, B6, B9, B12, C, y tiamina son sensibles al calor. Generalmente, al menos un 10 % de estas vitaminas pierden su actividad, por ejemplo, debido a la destrucción, en el transcurso de un tratamiento UHT convencional, por ejemplo, de la leche o la leche sin procesar. La vitamina A es particularmente sensible a la UHT o pasteurización térmica y hasta un 100 % de esta vitamina se pierde en estos procesos.
- 20 Por lo tanto, la composición comprende al menos un 30 %, de una o más de estas vitaminas (A, B1, B6, B9, B12, C) en comparación con un control sin tratar. Preferentemente al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90, 95 %, más preferentemente al menos un 96 %, 97 % y 98 % en comparación con un control sin tratar. Los valores anteriores pueden no ser aplicables para la vitamina A, en particular en caso de que la composición sea desgrasada o tenga un contenido reducido en grasa.
- 25 En el transcurso de una pasteurización térmica convencional, una o más de las vitaminas A, B12, C, y tiamina pierden su actividad al menos parcialmente, por ejemplo, debido a la destrucción. Generalmente, la pasteurización térmica causa una pérdida de al menos un 10 % de estas vitaminas. La composición de la invención comprende al menos un 30 % de una o más de estas vitaminas en comparación con un control sin tratar. Preferentemente al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, más preferentemente al menos un 96 %, 97 % y 98 % en comparación con un control sin tratar.
- 30 Si la composición, en particular en control sin tratar es leche, por ejemplo leche sin procesar, los porcentajes de vitaminas y otras moléculas bioactivas pueden usarse para determinar el contenido absoluto de la molécula en la composición, basándose en las cantidades absolutas dadas en esta memoria descriptiva para la molécula respectiva en la leche sin procesar sin tratar. De acuerdo con una realización, aun cuando la composición no sea leche o leche sin procesar, pero comprenda una o más de las moléculas bioactivas especificadas en el presente documento, la composición comprende preferentemente dicha molécula y las cantidades absolutas indicadas o extrapolables a partir de la presente memoria descriptiva. Las cantidades absolutas pueden extrapolarse en particular a partir de la cantidad de molécula que se encuentra en la leche sin procesar y/o de los porcentajes de molécula activa/nativa, tal como se indica en la presente memoria descriptiva.
- 35 La composición tiene preferentemente un recuento microbiano de viables que es menor de 10^5 ufc por gramo de la composición. Con respecto a las cargas microbianas que se consideran aceptables o las que no deben sobrepasarse, también se hace referencia al "Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung)", de 20 de julio de 2000, Bundesgesetzblatt Jahrgang 2000, parte I n.º 26, pág. 1178 de julio de 2000, modificado por última vez por el Bundesgesetzblatt Jahrgang 2004, parte I n.º 58, pág. 2794 de 12 de noviembre de 2004. Véase en particular "Anlage 6", en particular el capítulo 3.1.1. relativo a los requisitos sobre leche pasteurizada.
- 40 Preferentemente, La composición tiene preferentemente un recuento de ufc que es menor de 10^5 ufc por gramo de la composición después de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o más días después del tratamiento de CEP de acuerdo con la presente invención. Durante estos intervalos de tiempo, la composición se conserva a 4 °C. El recuento de viables se determina mediante incubación a 30 °C en placas de Petri y recuento de unidades formadoras de colonias.
- 45 Preferentemente, la composición tiene un recuento de ufc que es menor de 5×10^4 ufc por gramo de la composición después de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o más días después del tratamiento de CEP de acuerdo con la presente invención. Durante estos intervalos de tiempo, la composición se conserva a 4 °C.
- 50 Preferentemente, La composición tiene preferentemente un recuento de ufc que es menor de 10^4 ufc por gramo de la composición después de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o más días después del tratamiento de CEP de acuerdo con la presente invención. Durante estos intervalos de tiempo, la composición se conserva a 4 °C.
- 55 Preferentemente, la composición tiene un recuento de ufc que es menor de 5×10^3 ufc por gramo de la composición después de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o más días después del tratamiento de CEP de acuerdo con la presente invención. Durante estos intervalos de tiempo, la composición se conserva a 4 °C.
- 60
- 65

De acuerdo con una realización, la composición de la invención tiene un periodo de caducidad y/o estabilidad que es sustancialmente idéntica a la estabilidad, así como al periodo de caducidad de una composición comparable de otro modo tratada mediante pasteurización térmica. En particular, el periodo de caducidad de la composición en días, cuando se mantiene a 4 °C, es sustancialmente el mismo que el de una composición pasteurizada térmicamente comparable.

Para el fin de la presente memoria descriptiva, se considera que una composición es "nutricionalmente segura" y/o "microbiológicamente segura" si tiene un recuento microbiano (ufc) de menos de 10^5 , preferentemente menos de un 5×10^4 , aún más preferentemente menos de 5×10^4 , por ejemplo, menos de 10^4 , lo más preferentemente menos de 5×10^3 ufc/g de la composición. A fin de ser nutricionalmente y/o microbiológicamente seguros, estos recuentos microbianos preferentemente no exceden los valores indicados durante un periodo de al menos 4 días, preferentemente al menos 6, 8, 10 y lo más preferentemente 10 días cuando la composición se almacena a 4 °C y después del tratamiento de CEP de acuerdo con la invención. Preferentemente, la composición es nutricionalmente segura si, después de su almacenamiento durante 10 días a 4 °C, el recuento microbiano no excede de 10^4 ufc/g.

Lo más preferentemente, una composición es nutricionalmente segura si no contiene ningún microorganismo patógeno vegetativo detectable, en particular en una muestra de 25 ml (véase "Milchverordnung" citado anteriormente). De acuerdo con una realización, la composición no contiene ningún microorganismo patógeno vegetativo detectable.

La conductividad de la composición de la invención es de 2 a 10 mS/cm, preferentemente de 2,5 a 7,0 mS/cm, más preferentemente de 3 a 5 mS/cm, por ejemplo de 3,5 a 4,5 mS/cm, lo más preferentemente de 3,7 a 4,3 mS/cm, por ejemplo, alrededor de 4 mS/cm.

Las propiedades beneficiosas de las moléculas bioactivas abarcadas por la presente memoria descriptiva están publicadas en gran medida en la bibliografía. Por ejemplo, La lactoferrina tiene propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas y antiinflamatorias. Por ejemplo, los anticuerpos tales como IgG e IgA confieren protección pasiva frente a patógenos tales como virus o bacterias. Por ejemplo, los TGF- β son esenciales para desarrollar y mantener respuestas inmunitarias apropiadas en lactantes y pueden proporcionar protección contra resultados inmunológicos adversos tales como desarrollo de alergia o afecciones inflamatorias crónicas. Por ejemplo, las vitaminas actúan como catalizadores y son, por tanto, esenciales en diversos procesos del organismo. Por ejemplo, los factores de crecimiento son importantes para regular una variedad de procesos celulares estimulando el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación celular. Por ejemplo, las citocinas, quimiocinas y factores pro/antiinflamatorios son agentes inmunomoduladores esenciales para una inmunidad eficaz. Por ejemplo, las enzimas digestivas son esenciales para la digestión óptima de la leche por los neonatos. Por ejemplo, las hormonas son el mensajero que transporta una señal desde una célula a otra a lo largo de un organismo y, por tanto, tienen impactos sobre la inmunidad, el metabolismo, el desarrollo corporal y la respuesta a su entorno. Por ejemplo, las proteínas transportadoras ayudan en la asimilación de macro o micronutrientes por el epitelio.

La composición de la invención puede usarse para tratar y/o prevenir cualquier enfermedad o afección asociada con o correspondiente a uno o más de las dichas anteriormente, o puede usarse para promover la salud de acuerdo con una cualquiera o más de las actividades biológicas mencionadas anteriormente. La invención también se relaciona con un método de tratamiento, comprendiendo el método las etapas de administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz y/o suficiente de la composición de la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de algunos de los productos y métodos para fabricar los mismos y están dentro del alcance de la presente invención. No han de considerarse de ninguna forma limitativos de la invención. Pueden hacerse cambios y modificaciones con respecto a la invención. La persona experta reconocerá numerosas variaciones en estos ejemplos para cubrir una amplia área de fórmulas, ingredientes, procesamientos y mezclas para ajustar racionalmente los nutrientes y otros elementos de la invención para una variedad de aplicaciones.

Ejemplo 1: Sistema de CEP

Tal como se muestra en la figura 2, Se construyó un sistema de CEP 10 que comprende una fuente de alimentación eléctrica 11 (DIL Power Supply ELCRACK® HVP5), condensadores 12, transistores 13 (TBCA -transistor bipolar de compuerta aislada-) y un transformador 14 (transformador de alto voltaje DIL High Voltage Transformer Elcrack®). La fuente de alimentación 11 puede convertir corriente alterna a corriente continua a un nivel de voltaje intermedio para cargar los condensadores. Los transistores 13 pueden descargar periódicamente los condensadores y generar una corriente por pulsos, definiendo la corriente de salida máxima. Haciendo uso de múltiples transistores, la configuración permite emitir pulsos positivos o negativos. Para emitir un pulso positivo, se encienden dos transistores 13, que están en líneas dispuestas en diagonal. Mediante un transformador de pulso, el nivel de voltaje de los pulsos de descarga se aumenta, al tiempo que se reduce el pico de corriente. La configuración permite un voltaje máximo de 24 kV y una corriente mínima de 200 A en la cámara de tratamiento 1. Para obtener pulsos bipolares, la polaridad se cambia después de cada pulso. Por lo tanto, los transistores dispuestos en diagonal se encenderán cada dos pulsos.

El sistema comprendió cuatro cámaras de tratamiento, en particular dos pares de cámaras de tratamiento, En la figura 4 puede observarse un par de cámaras de tratamiento colineales, siendo 4 la fuente de alimentación de electricidad a un electrodo cargado 6, e indicando 5 las cintas de toma de tierra, los cuales se localizan aquí corriente arriba y abajo del electrodo central, respectivamente, de acuerdo con la representación esquemática de la figura 1. La figura 5 muestra con más detalle la construcción de una cámara de tratamiento 1. Pueden verse los electrodos 4 y 6, fabricados con titanio, así como una estructura de caja, la cubierta o carcasa 16, que está fabricada con material aislante, y que puede afianzarse mediante la abrazadera 9 para mantener la cámara de tratamiento unida como una unidad funcional. De esta manera, la cámara de tratamiento puede desensamblarse desmontando la abrazadera 9, por ejemplo, con el fin de limpiar. En la parte inferior de la cámara de tratamiento 1, puede verse un extremo corriente arriba del elemento inserto 30, el cual puede verse con mayor detalle en la figura 6.

La figura 6 muestra los detalles de la cámara de tratamiento colineal 1, con los números de referencia usados para la figura 5 referidos a los mismos elementos estructurales. Dos juntas tóricas 17 forman un sello entre los dos electrodos 4, 6 y el conector aislante 8. También puede verse un elemento interior 30 que tiene una forma que recuerda a un torpedo, el cual ocupa una posición central axial dentro de la cámara de tratamiento y que reduce el flujo laminar forzando al líquido a moverse cerca de las paredes internas de la cámara de tratamiento tal como se desvela en los documentos WO 2011/092247 y DE 10 2010 001 279.3, titulados: "Vorrichtung und Verfahren zur Hochspannungsimpulsbehandlung im Ringspalt". La cámara de tratamiento colineal de la figura 6 tiene un diámetro de 10 mm. Tal como puede verse en la figura 6, la caja 16 está fabricada con dos piezas aislantes separadas, que se mantienen juntas mediante la abrazadera 9. Liberando la abrazadera 9, todas las piezas individuales de la cámara de tratamiento pueden separarse unas de otras. En el canal central 2 de la cámara de tratamiento, la conexión y separación de los dos electrodos 4, 6 se efectúa mediante el conector aislante 8.

Los diseños de cámaras de tratamiento adicionales que se ensayaron incluyen una cámara de tratamiento colineal como la de la figura 6, pero sin el inserto "torpedo" y que tienen un menor diámetro de 7 mm. También se usó una cámara de tratamiento con un diseño llamado de concentración de campo (no mostrado).

Ejemplo 2: Tratamiento de CEP de leche sin procesar

Para todos los experimentos, la leche sin procesar se obtuvo de un granjero cerca de Quakenbrück, Alemania. Con la leche sin procesar se llenó un tanque de pared doble 22 (figura 3) y se calentó a la temperatura deseada de 20 °C, 25 °C o 30 °C usando el baño calentador que está controlado por el calentador 23. Para los experimentos, se usó el sistema de CEP tal como se describe en el ejemplo 1. La velocidad de flujo de la leche sin procesar se ajustó a 30 l/h contra una contrapresión de 2 bares y la duración del pulso se mantuvo constante a 20 µs. La energía específica se varió con el ajuste de la frecuencia del pulso (véase la ecuación 1 anterior). Los ensayos empezaron con una frecuencia de 50 Hz y la frecuencia se aumentó progresivamente hasta la capacidad máxima del sistema de CEP.

La figura 3 ilustra toda la instalación 20 que es adecuada para realizar los métodos de la invención y que se usó para los presentes ejemplos. El sistema de CEP 10 es el sistema ELCRACK HVP 5 descrito en el ejemplo 1 anterior. El producto pasa a través de la vía de producto 24 en la dirección indicada por las flechas. Se proporciona una salida 25 corriente abajo de las dos cámaras de tratamiento 1. Se proporciona un refrigerador 26 corriente abajo del sistema de tratamiento de CEP 10, que permite enfriar la temperatura para almacenar, por ejemplo, a 4 °C.

El aumento de temperatura debido al tratamiento de CEP se midió con sensores de temperatura (test 735, Testo AG Sales, Lenzkirch, Alemania).

Ejemplo 3: Inactivación microbiana mediante tratamiento de CEP

Se seleccionaron para los ensayos *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Listeria innocua* (DSM20649), dos cepas de microorganismos con diferentes propiedades de carga de gram.

Los coliformes se cultivaron en 200 ml de caldo de triptona soja (CM, Oxoid limited, Hampshire, RU) al tiempo que se agitaban durante 24 horas a 37 °C. Después del enriquecimiento, la suspensión de microorganismos se añadió a la leche precalentada y el tratamiento de CEP tal como se describe en el ejemplo 2.

Las muestras tratadas se diluyeron en agar selectivo (agar Flurocult MacCONKEY, Merck, Darmstadt, Alemania). Después de incubación durante 24 horas a 37 °C se contaron las unidades formadoras de colonia por gramo de leche sin procesar (ufc/g).

La *L. innocua* gram positiva se cultivó en 200 ml de One Bouillon Basis (CM1066B; Oxoid Limited; Hampshire; RU) durante 24 h a 37 °C. Después de la inoculación y el tratamiento, las muestras se diluyeron en solución Diluyente de máxima recuperación (CM0733; Oxoid Limited; Hampshire; RU) y se extendió sobre Palcam Agar Base (CM0877B; Oxoid Limited; Hampshire; RU). Las placas de Petri inoculadas se almacenaron durante 48 a 37 °C antes de contar las unidades formadoras de colonias por gramo.

Para el ensayo del periodo de caducidad, se analizó el recuento total de viables. Por lo tanto, la leche sin procesar no se inoculó con ningún microorganismo. Las muestras refrigeradas (4 °C) se diluyeron en Diluyente de máxima recuperación (CM0733, Oxoid Limited, Hampshire; RU) y se extendieron sobre medio Plate Count Agar (CM0463B, Oxoid Limited, Hampshire, RU). Después de 3 días de almacenamiento a 30 °C puede determinarse el recuento total de viables en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g).

Los resultados pueden verse en las figuras 7-10. Las figuras 7A y 7B comparan el efecto de la temperatura de partida de la leche sobre la inactivación microbiana de *E. coli* y *L. innocua*, respectivamente, dependiente de la energía específica aplicada. Para las fig. 7A y 7B, se usó una cámara de tratamiento colineal con diámetro de 10 mm, sin inserto. La inactivación se muestra como log (N/N₀), siendo N y N₀ el recuento microbiano (ufc/g) antes y después del tratamiento, respectivamente. Puede verse que la temperatura inicial de la leche sin procesar tuvo un impacto sobre el grado o eficacia de la inactivación, resultando una temperatura de 30 °C en la inactivación microbiana más significativa. Como resultado, para todos los experimentos adicionales, la temperatura inicial de la leche sin procesar se ajustó a 30 °C.

Figura 8: Muestra la inactivación de *E. coli* y *L. innocua* dependiente de la energía específica siendo la temperatura inicial de la leche sin procesar de 30 °C y usándose dos cámaras de tratamiento colineales de 10 mm de diámetro e inserto torpedo (fig. 4 y 6). Una línea vertical a una energía específica de 244 kg/kJ indica que, a esta energía, los microorganismos se inactivan por debajo del límite de detección. Como se verá a partir de los experimentos adicionales, una cantidad sustancial de proteínas bioactivas permanece nativa a esta cantidad de energía específica.

Las figuras 9 A y 9 B comparan los efectos del diseño de la cámara de tratamiento sobre la inactivación microbiana de *E. coli* y *L. innocua*, respectivamente, dependiente de la energía específica. Puede verse que la cámara de tratamiento colineal que comprende el elemento interior resultó en la inactivación más eficaz. En otras palabras, la última cámara de tratamiento necesitó la entrada de energía más baja para alcanzar una inactivación dada. La máxima inactivación es una reducción de 5,5 log. La línea horizontal en la gráfica a 5,5 log representa el límite de detección, lo cual significa que por debajo de esta línea ya no se detectan recuentos de viables.

Las figuras 10A y 10B muestran efecto de inactivación microbiana (de *E. coli* y *L. innocua*, respectivamente) dependiente de la temperatura final de la leche después del tratamiento de CEP. El aumento de temperatura se debe a aumentos de la energía específica aplicada. El impacto del diseño de la cámara de tratamiento sobre la temperatura final se hace claramente evidente. Los resultados muestran que la temperatura no solo depende de la energía específica aplicada, sino también del diseño de la cámara de tratamiento, y que temperaturas menores pueden ser suficientes para obtener una inactivación importante. La cámara de tratamiento de concentración de campo conduce a la mayor temperatura final, que es por lo que, la presente invención preferentemente no usa este tipo de cámara de tratamiento. Por otra parte, la temperatura final más baja se midió cuando se usó la cámara de tratamiento colineal con un elemento interior.

La tabla 1 a continuación muestra la temperatura final de un tratamiento de CEP con una energía específica en la cámara de tratamiento colineal que usa un elemento interno en forma de un inserto.

Tabla 1: Temperatura final de la leche sin procesar e inactivación microbiana después del tratamiento de CEP en una cámara de tratamiento con 10 mm de diámetro y el inserto de la figura 6

Energía específica [kJ/kg]	Temperatura final [°C]	Inactivación de <i>E. coli</i> [log N/N ₀]	Desviación típica	Inactivación de <i>L. innocua</i> [log N/N ₀]	Desviación típica
304,3	72,1	-6,2	0,0	-5,9	0,0
229,9	62,1	-6,2	0,0	-5,9	0,0
128,4	51,2	-4,9	0,2	-1,6	0,2
74,5	39,2	-1,7	0,4	-0,9	0,3

Se destaca que N es el recuento celular (ufc) después del tratamiento de CEP y N₀ el recuento celular antes del tratamiento. Tal como puede verse, el tratamiento de CEP de acuerdo con la invención alcanza una inactivación microbiana de 5 log o más.

Basándose en los ensayos hechos en los ejemplos 2-3, se establecieron las condiciones más favorables para el tratamiento de CEP. Se encuentra que el diseño de la cámara de tratamiento, la energía específica aplicada y la temperatura inicial tienen un impacto sobre el resultado del tratamiento de CEP. Basándose en estos resultados, se usó una cámara de tratamiento colineal de 10 mm y un inserto "torpedo", la temperatura de inicio se ajustó generalmente a 30 °C, la duración del pulso fue de 20 μs, la fuerza de campo fue de 12 kV/cm y la leche sin procesar se sometió a una velocidad de flujo de 30 kg/hora contra una contrapresión de 2 bares. Estos son los parámetros de tratamiento de CEP preferidos.

Ejemplo 3: Efecto del tratamiento de CEP sobre el valor del pH, la conductividad y el color de la leche sin procesar

El valor del pH de la leche sin procesar (6,9) no se vio afectado por el tratamiento de CEP por encima de un intervalo de energía específica de 70 a 373 kJ/kg. La conductividad de la leche sin procesar (3,9) permaneció invariable mediante el tratamiento de CEP hasta una energía específica de alrededor de 309-310 kJ/kg. A energías específicas mayores, se observó una reducción de la conductividad (alrededor de 3,75 a 344 kJ/kg y 3,25 a 373 kJ/kg).

Los experimentos en los que se determina el factor L* (luminosidad/oscuridad) revelan que no hay cambios de color perceptibles de la leche sin procesar debidos a tratamientos de CEP a energías específicas que están en el intervalo de alrededor de 250 a 350 kJ/kg.

Ejemplo 4: Influencia del tratamiento de CEP sobre sustancias bioactivas en la leche sin procesar*4.1 Material y métodos*

Se analizaron cinco sustancias bioactivas en la leche sin procesar usando kits de ensayos de ELISA. Los resultados se obtuvieron usando un lector de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments; Winooski; EE.UU.) y el programa informático KCjunior (KCjunior; Bio-Tek Instruments; Winooski; EE.UU.).

Después del tratamiento de CEP, las muestras se congelaron (no se mostró que la congelación afectara al contenido de proteínas activas). Antes del análisis, las muestras se centrifugaron a 4 °C y 10000 U/min (10621*g) durante 10 min. El sobrenadante, que contiene la mayor parte de la grasa, se eliminó y la fase fluida se usó para su investigación adicional. El análisis de ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La lactoferrina activa se cuantificó usando el ensayo de ELISA de Bethyl Laboratories (Lactoferrin ELISA Quantitation Set; n.º de cat. E10-126; Bethyl Laboratories Inc.; Montgomery; EE.UU.) y se usaron las soluciones que se necesitan (solución de frenado de ELISA, n.º de cat. E 115; sustrato TMB peroxidasa (solución A+B), n.º de cat. E102; placas de microtitulación, n.º de cat. C3041; Bethyl Laboratories, Inc.; Montgomery; EE.UU.). El análisis se llevó a cabo tal como se describe en las instrucciones del kit.

Para el análisis de las otras sustancias bioactivas, se usaron los siguientes kits de ELISA: IgA: Bovine IgA ELISA kit E11-121; Bethyl laboratories Inc.; Montgomery; EE.UU. IgG: Bovine IgG ELISA Kit E11-118; Bethyl laboratories Inc.; Montgomery; EE.UU. TGF-beta 1: Multispecies TGF-beta 1 ELISA; ibt-immunological & biochemical test systems GmbH; Reutlingen; Alemania. TGF-beta 2: Multispecies TGF-beta 2 ELISA; ibt-immunological & biochemical test systems GmbH; Reutlingen; Alemania. Todos los análisis se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit.

4.2 Efecto del tratamiento de CEP sobre el contenido en lactoferrina

Usando los parámetros de tratamiento de CEP preferidos establecidos en el ejemplo 3, se llevaron a cabo ensayos a fin de evaluar el efecto del tratamiento de CEP sobre la presencia de lactoferrina. Para estos ensayos, todos los parámetros del proceso fueron constantes con la excepción de la energía específica.

Tal como puede verse en la figura 11, la lactoferrina es sensible al tratamiento de CEP y sus cantidades disminuyen con el aumento de la energía específica. Sin embargo, a una energía específica de 244 kJ/kg (línea vertical de la gráfica), que corresponde a la energía necesaria para la inactivación, tanto de *E. coli* como de *L. innocua*, más de alrededor del 85 % (64 mg/l) de la lactoferrina original (76 mg/l) aún es detectable por ELISA y, por tanto, está presente en forma nativa y, por tanto, en la forma activa para el fin de la presente invención. Las cantidades de lactoferrina empiezan a descender de forma más importante a energías específicas por encima de alrededor de 280-300 kJ/kg.

4.3 Efecto del tratamiento de CEP sobre el contenido en IgA

Tal como puede verse en la figura 12, después de tratamiento de CEP a una energía específica de 244 kJ/kg (línea vertical de la gráfica), que corresponde a la energía necesaria para la inactivación, tanto de *E. coli* como de *L. innocua*, más de alrededor del 56 % (77,4 µg/ml) de la IgA original (136,3 µg/ml) aún es detectable por ELISA y, por tanto, está presente en forma nativa, por tanto, activa.

4.4 Efecto del tratamiento de CEP sobre el contenido en IgG

Tal como puede verse en la figura 13, después de tratamiento de CEP a una energía específica de 244 kJ/kg (línea vertical de la gráfica), que corresponde a la energía necesaria para la inactivación, tanto de *E. coli* como de *L. innocua*, más de alrededor del 80 % (703 µg/ml) de la IgG original presente en la leche sin procesar (868 µg/ml) aún es detectable por ELISA y, por tanto, está presente en forma nativa, por tanto, activa.

4.5 Efecto del tratamiento de CEP sobre el contenido en TGF- β 1

Tal como puede verse en la figura 14, después de tratamiento de CEP a una energía específica de 244 kJ/kg (línea vertical de la gráfica), que corresponde a la energía necesaria para la inactivación, tanto de *E. coli* como de *L. innocua*, más de alrededor del 89 % (0,34 ng/ml) del TGF- β 1 original presente en la leche sin procesar (0,38 ng/ml) aún es detectable por ELISA y, por tanto, está presente en forma nativa, por tanto, activa. En general, a lo largo de todo el intervalo de energía específica, el contenido en TGF- β 1 fluctúa alrededor de un valor promedio de 0,35 ng/ml. El tratamiento de CEP no afecta sustancialmente al contenido en TGF- β 1.

4.6 Efecto del tratamiento de CEP sobre el contenido en TGF- β 2

Tal como puede verse en la figura 15, el tratamiento de CEP no afecta sustancialmente al contenido en TGF- β 2. Después de tratamiento de CEP a una energía específica de 244 kJ/kg (línea vertical de la gráfica), que corresponde a la energía necesaria para la inactivación, tanto de *E. coli* como de *L. innocua*, no se detectó ninguna reducción significativa del TGF- β 2 original presente en la leche sin procesar (41,4 ng/ml) mediante ELISA.

En conclusión, el tratamiento de CEP de acuerdo con la presente invención es adecuado para reducir de forma eficaz la carga microbiana en una composición líquida o viscosa. Al mismo tiempo, el tratamiento no destruye sustancialmente o no destruye completamente las moléculas bioactivas u otras moléculas que están presentes forma natural en la leche sin procesar. Cantidades importantes de estas moléculas bioactivas permanecen nativas/activas a pesar del tratamiento de CEP de acuerdo con esta invención.

La figura 16 resume los resultados de este ejemplo mostrando el efecto de un tratamiento de CEP que es adecuado para reducir significativamente la carga microbiana sobre el contenido de diferentes moléculas bioactivas.

Ejemplo 5: Periodo de caducidad de la composición tratada con CEP

Se analizó y se comparó el periodo de caducidad de la leche sin procesar y el de la leche sin procesar tratada con CEP (véase el procedimiento en el ejemplo 3).

Se aplicaron diferentes energías específicas: 0 (leche sin procesar), 65, 210, 244 y 314 kJ/kg, respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 17. Tal como puede verse en todas las muestras, con la excepción de la leche sin procesar sin tratar y la leche tratada con CEP a 65 kJ/kg, presentaron recuentos de células viables por debajo de 10^5 ufc/g por encima de un periodo de caducidad de 14 días a 4 °C. Las últimas dos muestras mostraron altos recuentos celulares después de 4 días y, debido al alto crecimiento bacteriano, el experimento se ha detenido para estas muestras y no se publican datos adicionales. El periodo de caducidad de la leche sin tratar y la leche tratada con CEP a 65 kJ/kg está, por tanto, por debajo de cuatro días a 4 °C. Para las otras muestras tratadas, se obtiene un periodo de caducidad de 14 días o más a 4 °C.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la carga microbiana de una composición líquida o viscosa que comprende una o más moléculas bioactivas que aparecen de forma natural en la leche, comprendiendo el método las etapas de someter dicha composición a un tratamiento de campo eléctrico por pulsos (CEP), en el que en dicho tratamiento de CEP, se expone dicha composición a una energía específica de 600 kJ o menos por kg de composición, en el que dicha composición se expone a un CEP con una fuerza de campo de 10 a 20 kV/cm, en el que dicho tratamiento de CEP se aplica en una o más cámaras de tratamiento colineales que tienen un canal central, en el que dicha composición se guía de forma continua a través de dicho canal central de dicha cámara de tratamiento colineal y en el que se proporciona un elemento interior que es inerte y no conductor dentro de dicho canal central, de forma que, en dicha cámara de tratamiento, dicha composición se guía alrededor de dicho elemento interior.
2. El método de la reivindicación 1, en el que en dicho tratamiento de CEP, se aplica una duración de pulso de 10 μ s o más, preferentemente 15 μ s o más.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en dicho tratamiento de CEP, se aplican pulsos eléctricos de onda cuadrada y/o pulsos bipolares.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual es un método continuo y/o en el cual dicha composición se somete de forma continua a dicho tratamiento de CEP.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una temperatura de dicha composición antes del sometimiento a dicho tratamiento de CEP, se ajusta a una temperatura de 20-45 °C.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha composición comprende o consiste sustancialmente en uno o más seleccionados del grupo que consiste en leche entera, leche semidescremada, leche descremada, calostro, leche con grasa reducida, leche baja en grasa, leche desgrasada, suero lácteo (plasma de leche), tal como suero lácteo dulce o suero lácteo ácido, bebida a base de leche, yogur, yogur congelado, una bebida de yogur, helado, nata, mantequilla, queso fresco, requesón y queso, polvos o formas deshidratadas de otra forma de una cualquiera de los mencionados anteriormente, y composiciones que comprenden combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas una o más moléculas bioactivas se seleccionan de forma independiente de entre proteínas nativas, lípidos bioactivos, ácido siálico, nucleótidos, oligosacáridos, aminoácidos, taurina y vitaminas que aparecen de forma natural en la leche.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas una o más moléculas bioactivas se seleccionan de proteínas bioactivas, seleccionándose dicha proteína de entre factores antimicrobianos, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, citocinas y/o factores pro/antiinflamatorios, quimiocinas, enzimas, incluyendo enzimas digestivas, hormonas proteicas, transportadores, glucomacropéptido, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, proteínas de la membrana del glóbulo graso lácteo y combinaciones de dos o más de los mencionados anteriormente, en las que, tras la etapa de someter a dicha composición a un tratamiento de CEP, al menos un 30 % de dicha proteína está presente en una forma nativa.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que una reducción de la carga microbiana lograda es de al menos 4 log.

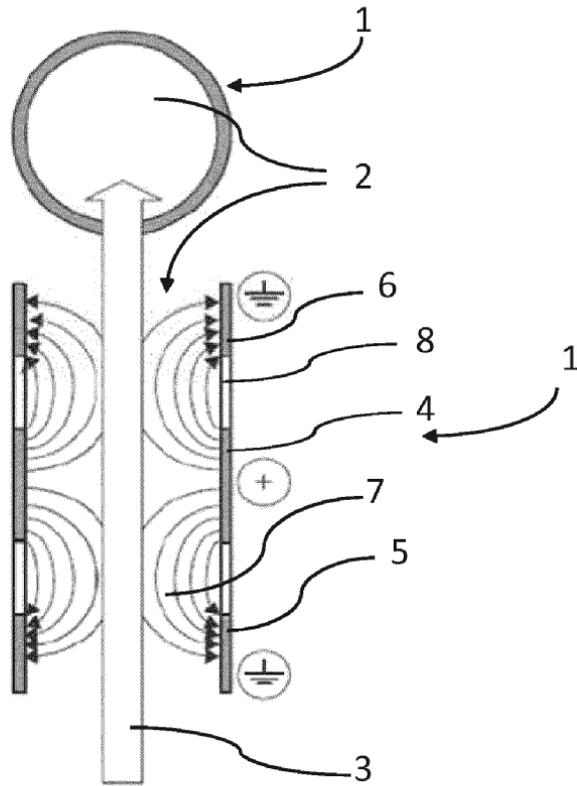


Figura 1

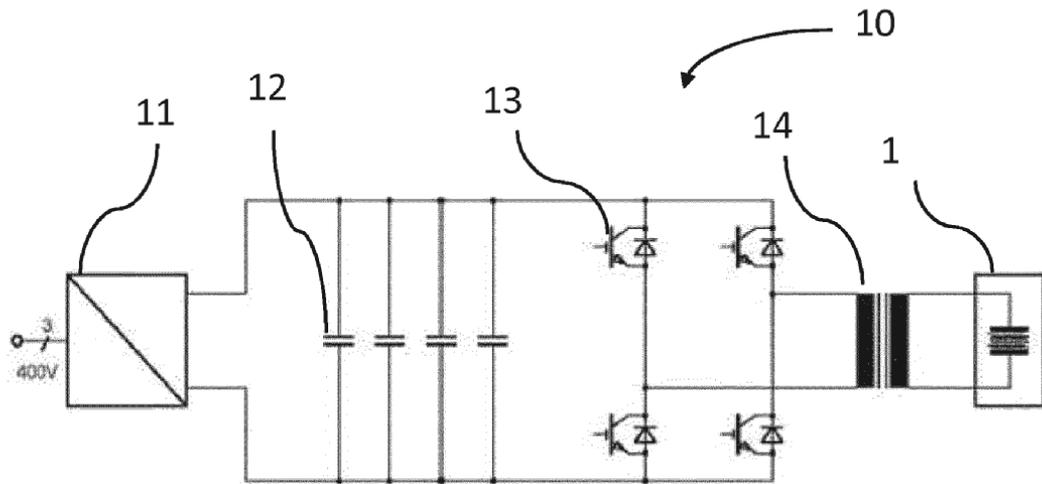


Figura 2

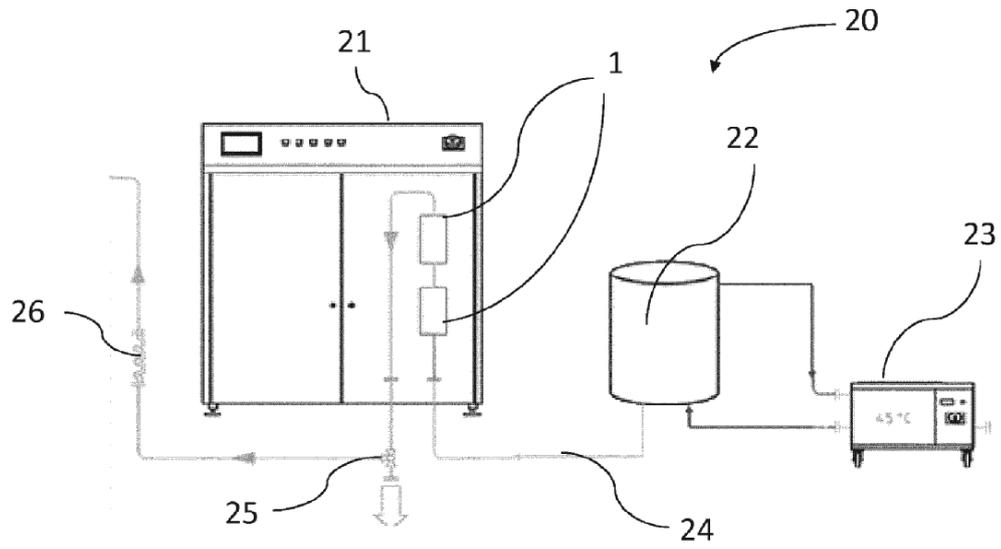


Figura 3

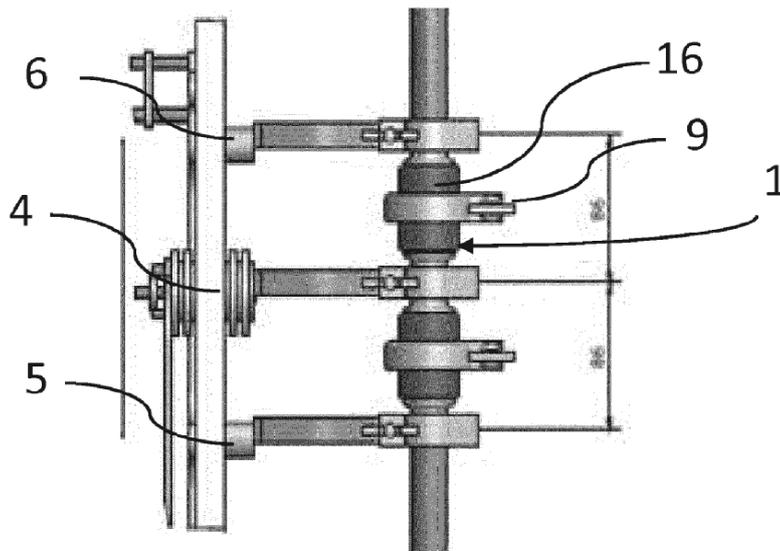


Figura 4

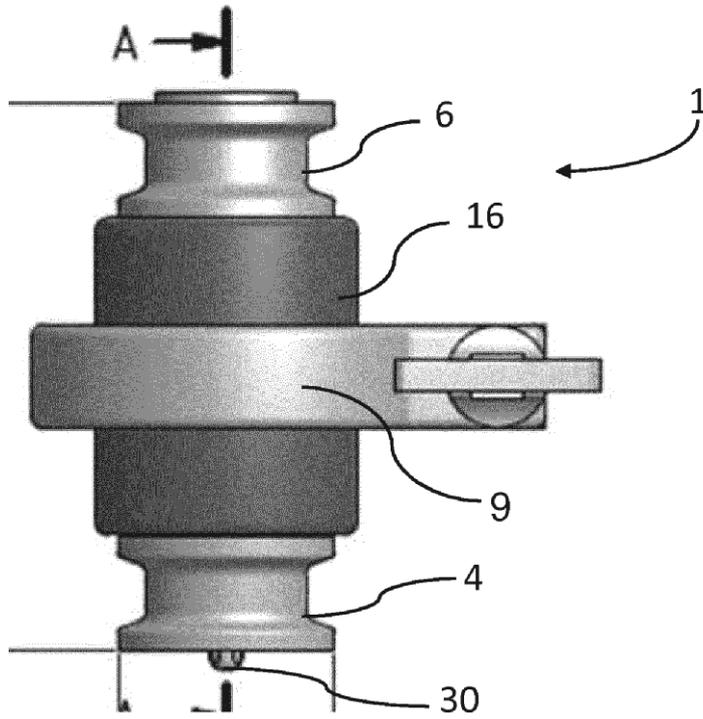


Figura 5

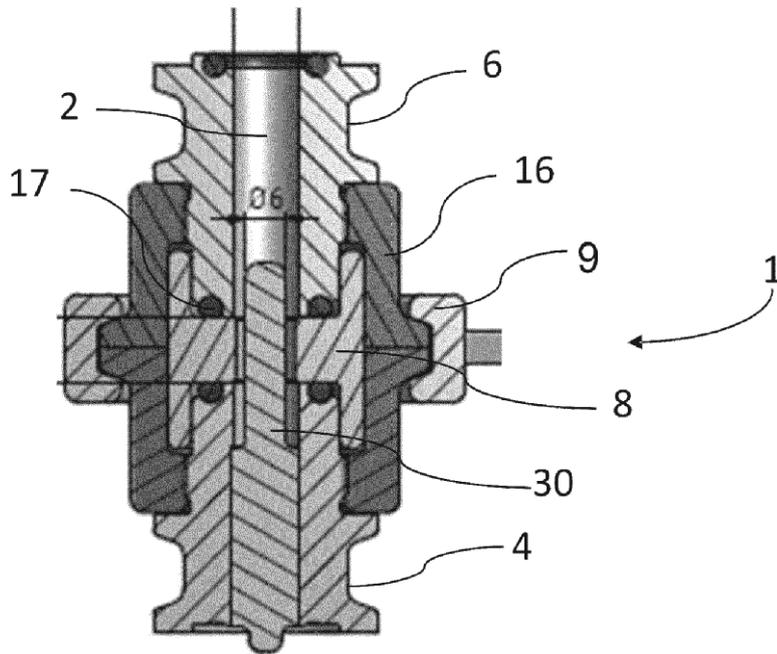


Figura 6

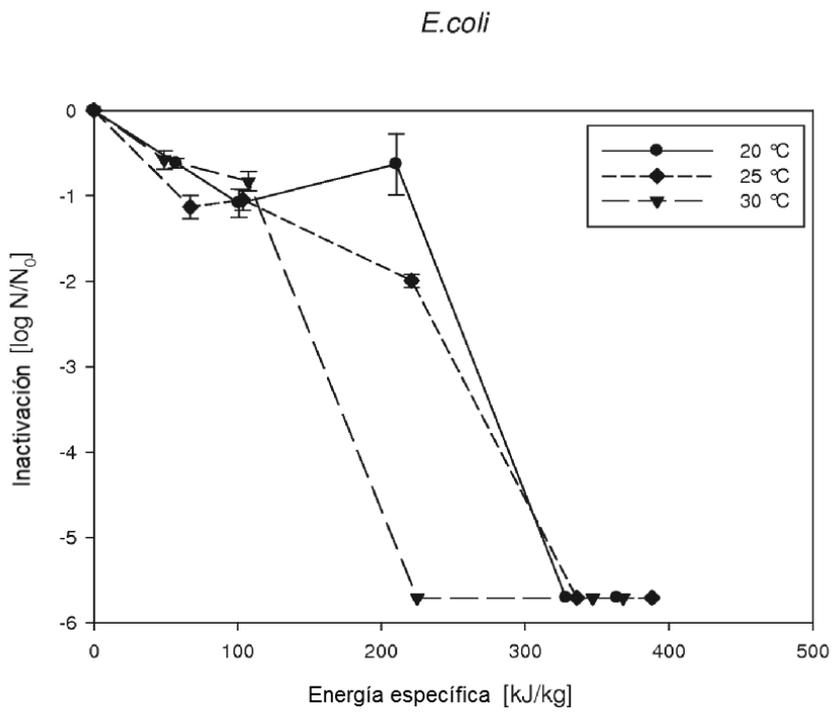


Figura 7A

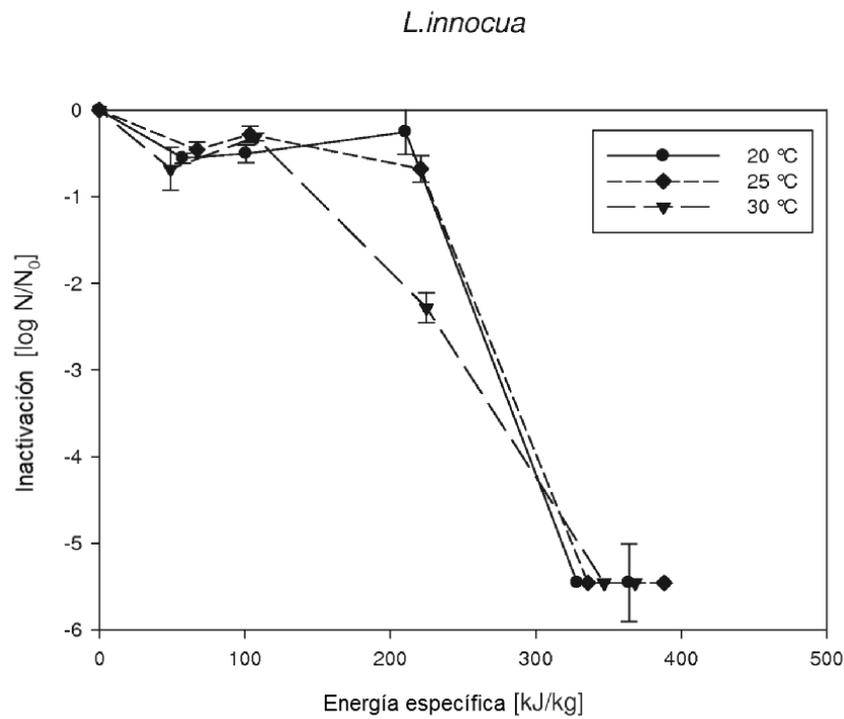


Figura 7B

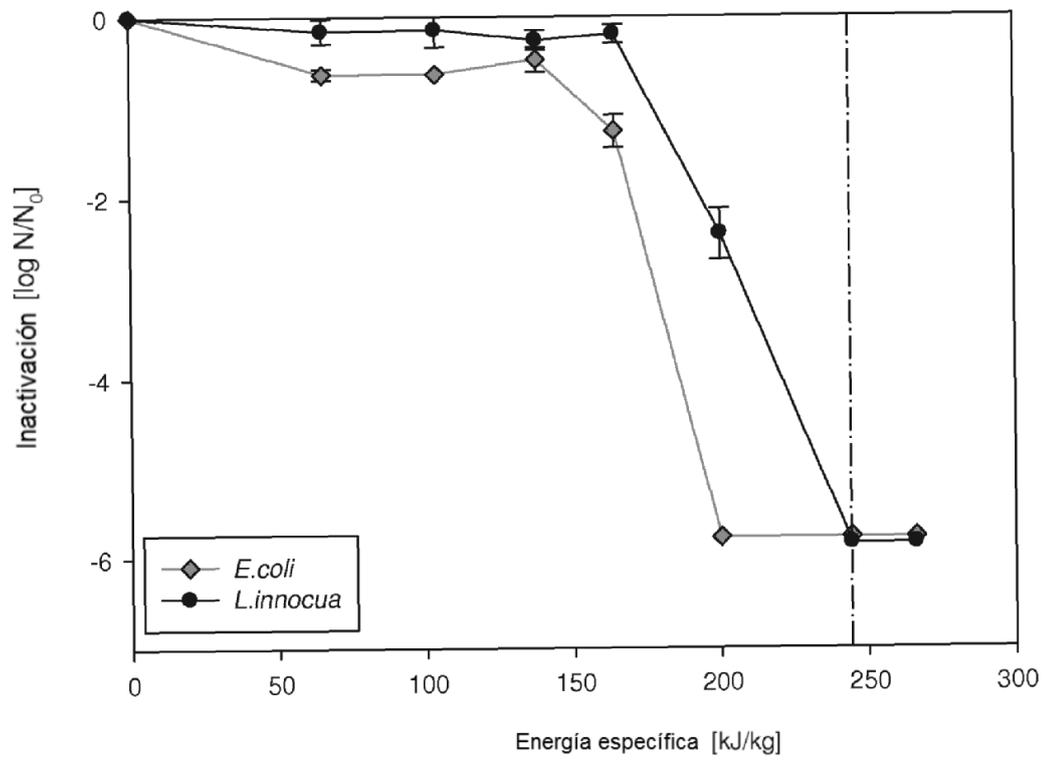


Figura 8

E.coli

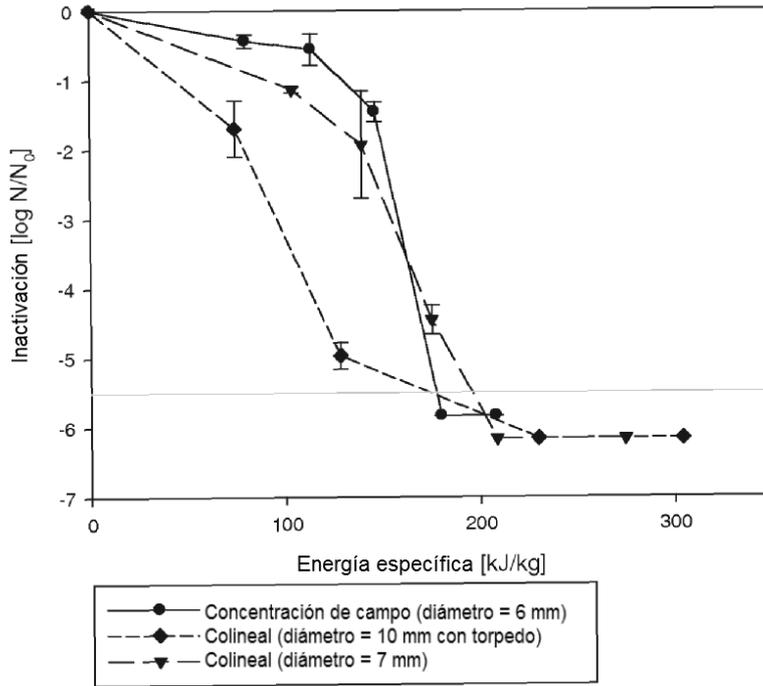


Figura 9A

L.innocua

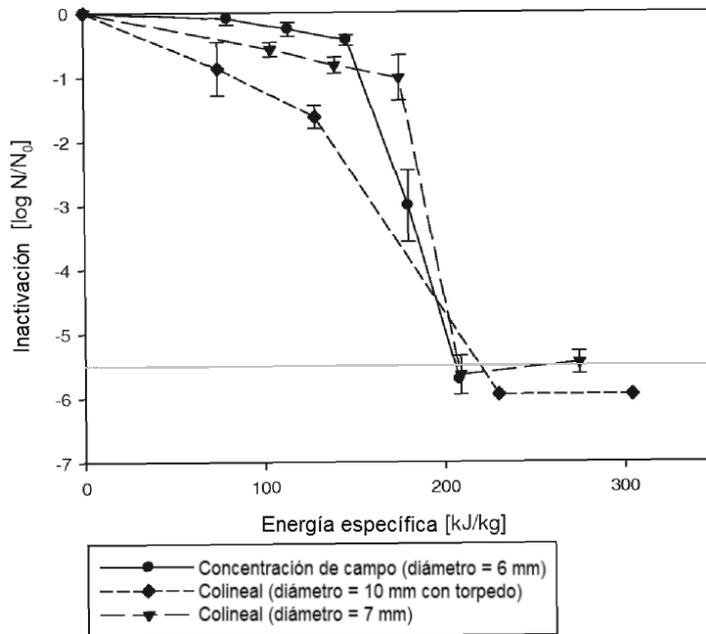


Figura 9B

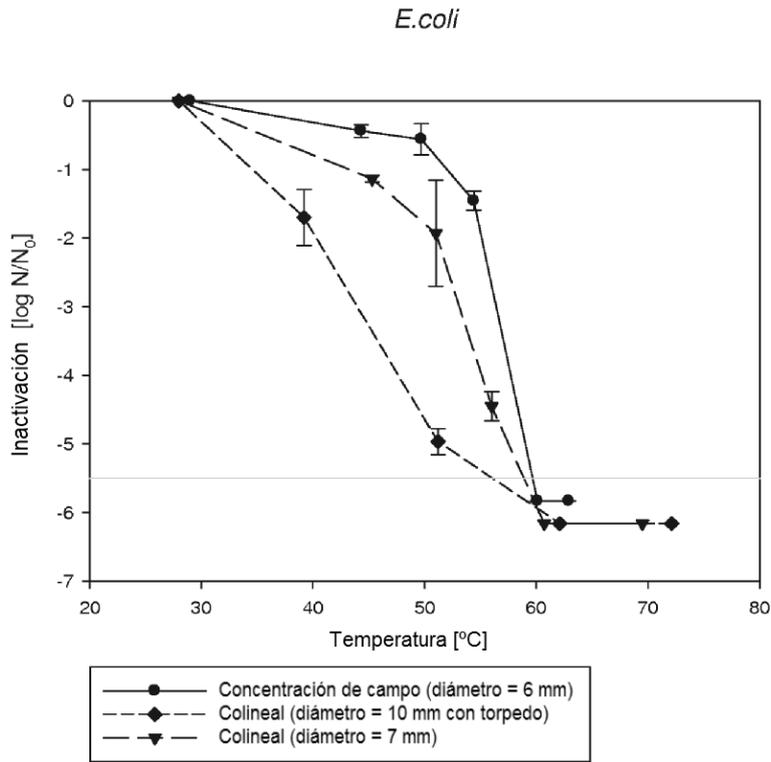


Figura 10A

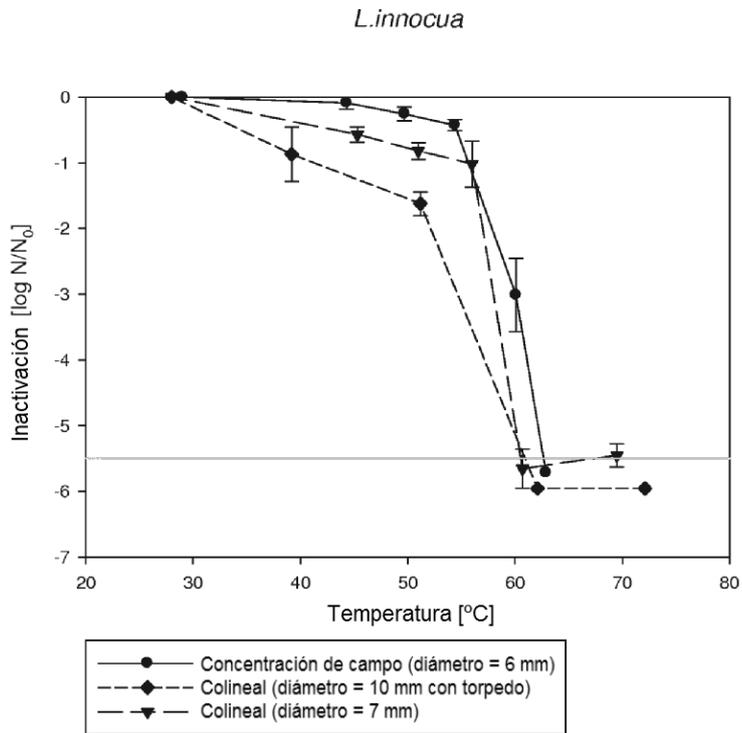


Figura 10B

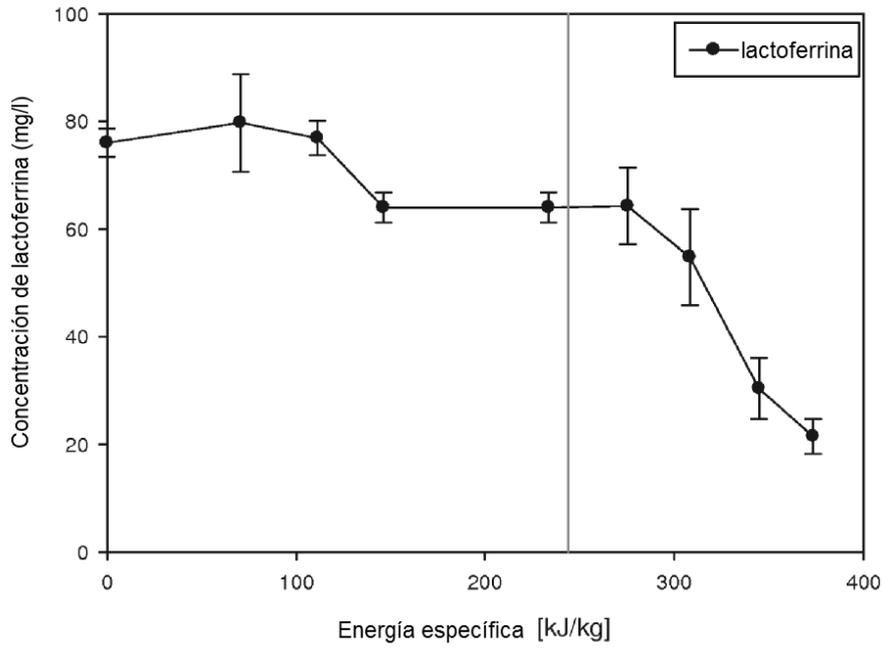


Figura 11

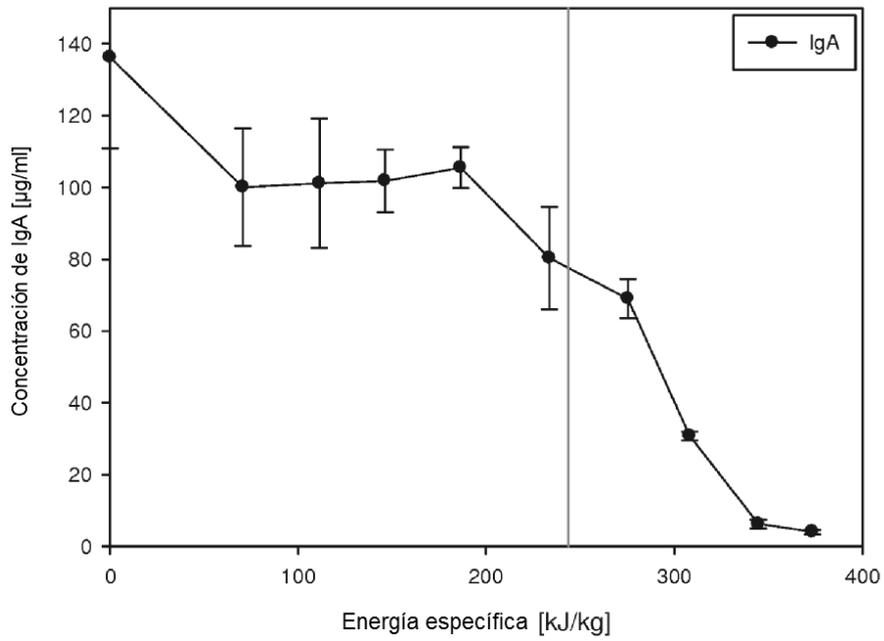


Figura 12

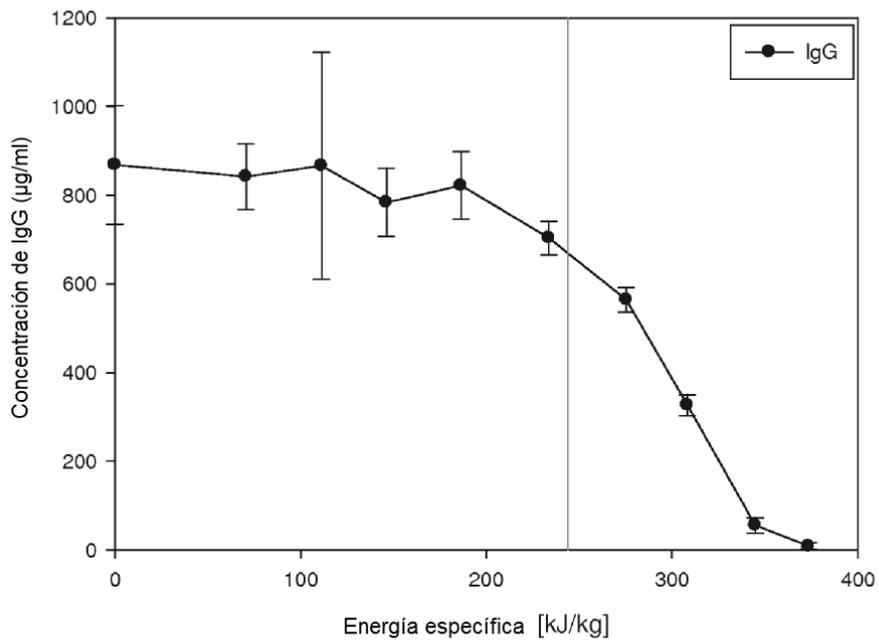


Figura 13

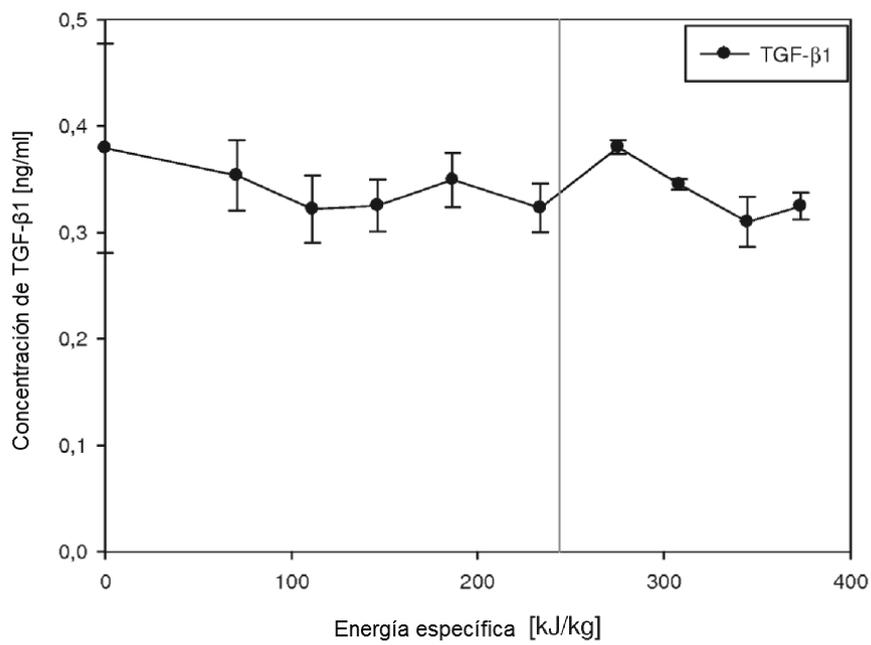


Figura 14

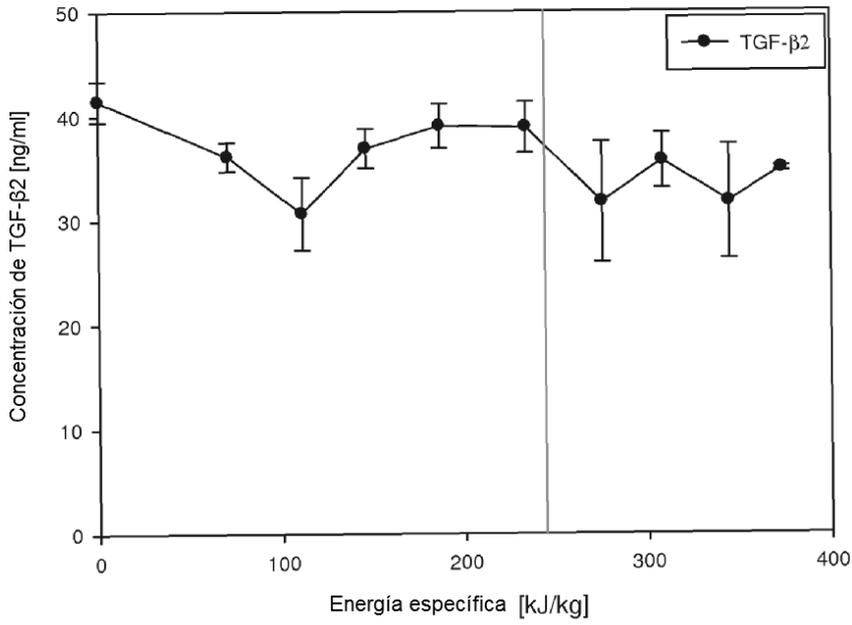


Figura 15

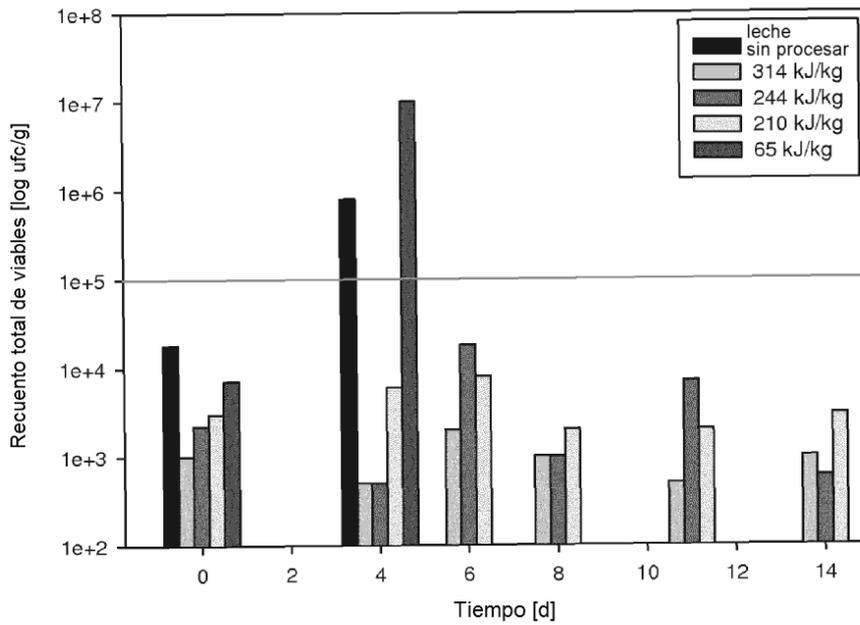


Figura 17

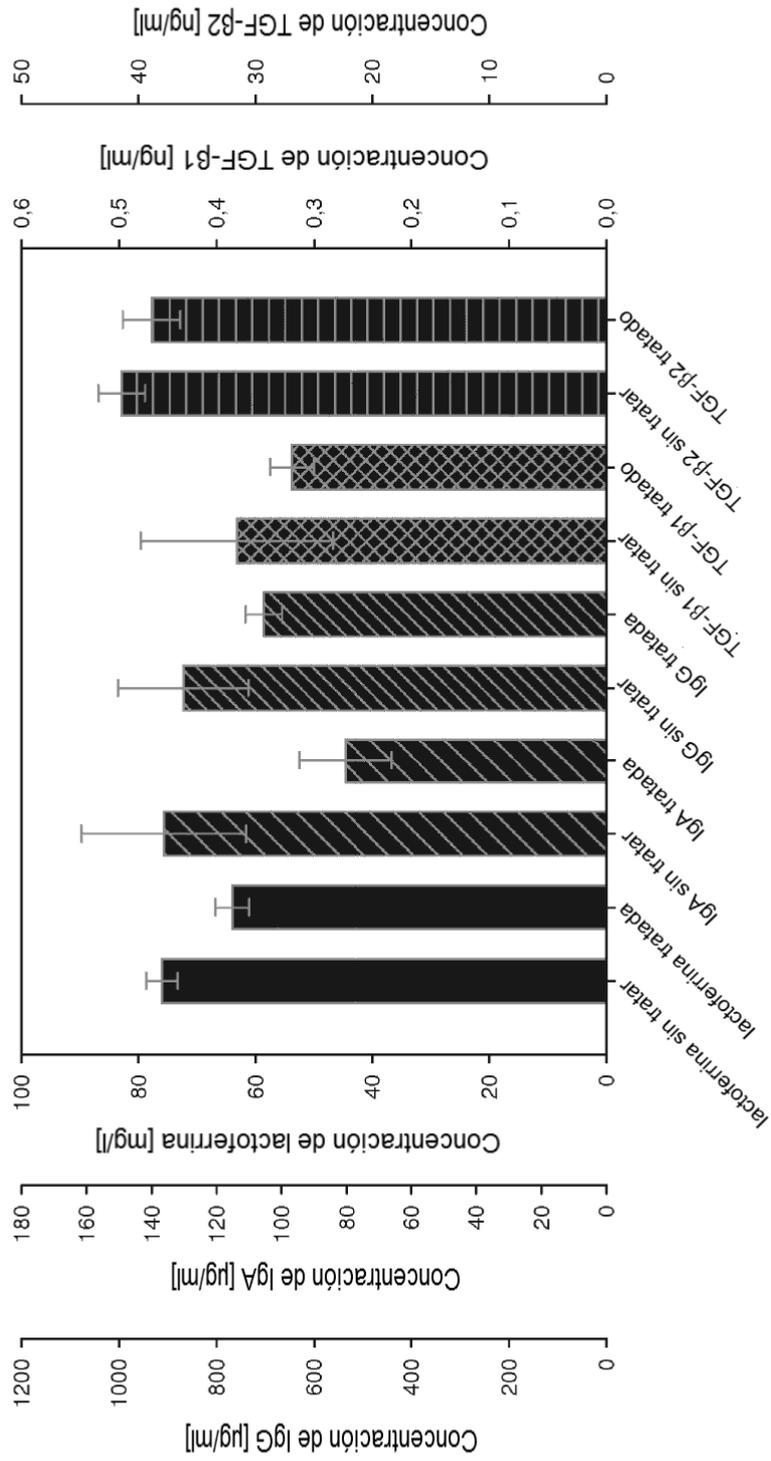


Figura 16