

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 669**

51 Int. Cl.:

A23C 9/142 (2006.01)

A23J 1/20 (2006.01)

A23J 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/EP2014/051315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO2014114709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14701187 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2947996**

54 Título: **Método para producir composiciones de beta-caseína**

30 Prioridad:

23.01.2013 EP 13152410
23.01.2013 US 201361755732 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2017

73 Titular/es:

ARLA FOODS AMBA (100.0%)
Sønderhøj 14
8260 Viby J, DK

72 Inventor/es:

CHRISTENSEN, JESPER y
HOLST, HANS HENRIK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 620 669 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

Método para producir composiciones de beta-caseína

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al método para producir composiciones y productos que contienen beta-caseína obtenibles mediante tales métodos. En particular, la invención se refiere al método para producir composiciones de beta-caseína empleando microfiltración controlada.

Antecedentes de la invención

10 La beta-caseína es la principal proteína que se encuentra en la leche humana. La proteína se une al calcio en sus regiones fosforiladas. La proteína, en su conjunto, está desordenada y se caracteriza como una proteína enrollada al azar.

15 La beta-caseína se encuentra también en la leche de vaca, sin embargo, en una concentración menor que en la leche humana. A temperatura ambiente, la beta-caseína de vaca se une a las micelas de caseína de la leche de vaca, pero a temperaturas bajas, por ejemplo, 2-5 grados Celsius, la beta-caseína se conoce por disociarse parcialmente de las micelas de caseína para formar beta-caseína libre, por ejemplo, en forma de moléculas de beta-caseína libres en solitario o pequeños agregados de beta-caseína.

Técnica anterior:

En la técnica anterior se han descrito varias propuestas para aislar la beta-caseína de la leche.

FR 2.592.769 A divulga la producción de beta-caseína mediante microfiltración de un suministro líquido refrigerado que contiene calcio agregado a caseinato.

20 US 5.169.666 A divulga un proceso para producir un producto proteico de leche enriquecido con beta-caseína sometiendo a la leche desnatada fría a microfiltración. El filtro MF que se emplea tiene un tamaño de poro de 0,1-0,2 micras.

25 US2007104847A divulga un método para producir beta-caseína: el método se basa en una microfiltración en frío inicial de la leche desnatada fría para obtener un retentado parcialmente empobrecido de beta-caseína y un permeato que contiene proteína de suero lácteo y una cantidad significativa de beta-caseína. El permeato que contiene beta-caseína se puede someter a otra purificación.

30 WO 2012/148.269 A1 divulga un método para preparar la fracción de proteína láctea, que incluye beta-caseína, empleando una primera etapa de microfiltración y sometiendo al retentado de la primera etapa de microfiltración a una segunda microfiltración. La primera etapa de microfiltración se puede realizar a temperatura caliente y la segunda etapa de microfiltración se puede realizar a temperatura fría.

Compendio de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un método para producir una composición que contiene beta-caseína, el método comprende las etapas de:

- 35 a) pre-calentar la leche ajustando la temperatura de pre-calentamiento (T_{pre}) en el intervalo de 20-60 grados Celsius y con un tiempo de mantenimiento en el intervalo de 1 minuto – 1 hora, proporcionando así una leche caliente,
- b) someter a la leche caliente a microfiltración (MF), proporcionando así un primer permeato MF y un primer retentado MF,
- c) opcionalmente, someter al primer retentado MF a MF-diafiltración,
- 40 d) ajustar la temperatura de una primera composición derivada del primer retentado MF a una temperatura fría ($T_{fría}$) en el intervalo de 0-15 grados Celsius y mantener la temperatura de la primera composición dentro de dicho intervalo durante una duración ($t_{frío}$) de al menos 0,5 horas, obteniendo así una primera composición fría,
- 45 e) someter a la primera composición fría a microfiltración, obteniendo así un segundo retentado y un segundo permeato, cuyo segundo permeato está enriquecido en lo que respecta a beta-caseína, y
- f) opcionalmente, someter el segundo retentado MF a MF-diafiltración,
- g) opcionalmente, someter a la segunda composición derivada del segundo permeato a una o más de otras etapas de procesamiento, por ejemplo, otra purificación y/o etapas de concentración,

proporcionando de esta manera la composición que contiene beta-caseína.

El segundo permeato de la etapa e) se puede usar, por ejemplo, como una composición que contiene beta-caseína. Se puede usar alternativamente, una combinación del segundo permeato de la etapa e) y posteriores permeatos de la MF-diafiltración de la etapa f), como la composición que contiene beta-caseína. Alternativamente, se puede usar el producto resultante de la etapa g), como la composición que contiene beta-caseína.

Como las etapas c), f) y g) se consideran opcionales, existen varias variantes del método. El método puede por ejemplo, comprender las etapas a), b), d) y e). Alternativamente, el método puede comprender las etapas a), b), c), d) y e). Por ejemplo, el método puede comprender las etapas a), b), d), e), y f). El método puede por ejemplo, comprender las etapas a), b), d), e), y g). Alternativamente, el método puede comprender las etapas a), b), d), e), f) y g). Por ejemplo, el método puede comprender las etapas a), b), c), d), e) y f). En otras realizaciones, el método comprende las etapas a), b), c), d), e), y g). El método puede comprender, por ejemplo, las etapas a), b), c), d), e), f), y g).

En algunas realizaciones de la invención, el método consiste en las etapas a), b), d), y e). Alternativamente, el método puede consistir en las etapas a), b), c), d), y e). Por ejemplo, el método puede consistir en las etapas a), b), d), e), y f). El método puede consistir, por ejemplo, en las etapas a), b), d), e), y g). Alternativamente, el método puede consistir en las etapas a), b), d), e), f), y g). Por ejemplo, el método puede consistir en las etapas a), b), c), d), e), y f). En otras realizaciones, el método consiste en las etapas a), b), c), d), e), y g). El método puede consistir, por ejemplo, en las etapas a), b), c), d), e), f), y g).

En la Figura 1 se ilustra una realización como ejemplo de la invención. Aquí la leche (1) contacta con una unidad de calentamiento (2) que ajusta la temperatura de la leche hasta la temperatura de pretratamiento (T_{pre}). La leche se mantiene a T_{pre} durante una duración, t_{pre} , suficiente para permitir que al menos una parte sustancial de la beta-caseína libre se una a las micelas de caseína.

Después, la leche caliente se transfiere a una primera unidad de microfiltración (3) y se separa en un primer permeato (6) y un primer retentado (5). Esta realización implica la diafiltración posterior del primer retentado (4), el cual se mezcla con un diluyente (5), y la mezcla resultante se transfiere después a otra unidad de microfiltración (3'), dando como resultado un primer retentado de MF-diafiltración (4') y un primer permeato de MF-diafiltración (6'). Se realiza otra etapa de MF-diafiltración en el primer retentado de MF-diafiltración (4'). La temperatura durante la microfiltración caliente, T_{wMF} , puede ser la misma o diferente de T_{pre} , aunque se prefiere que la T_{wMF} sea de al menos 20 grados Celsius.

Posteriormente, el retentado resultante (4'') se diluye y transfiere a una unidad de enfriado donde el retentado diluido se enfría hasta la temperatura $T_{fría}$. El retentado diluido se mantiene a la temperatura fría durante un tiempo de duración, $t_{frío}$, suficiente para disociar una parte significativa de la beta-caseína unida a las micelas de caseína, proporcionando así una parte sustancial de beta-caseína libre en el retentado diluido, enfriado. La beta-caseína libre se separa del retentado diluido enfriado, mediante MF fría (8) y MF-diafiltración fría (8' y 8''). La beta-caseína libre se mueve a través del filtro MF y en los flujos del permeato (10, 10', 10'') que se combinan y transfieren a un sistema de secado por pulverización (12), que convierte los permeatos combinados en un polvo que contiene beta-caseína.

Los permeatos de la MF-diafiltración/MF caliente (6, 6', 6'') contienen una elevada calidad de proteína sérica y se pueden convertir en concentrados de proteínas séricas en forma de polvo o líquido.

El flujo del retentado (9') que queda en la MF-diafiltración/MF fría es un aislado de la caseína micelar escaso parcialmente en beta-caseína y puede, por ejemplo, usarse como un aditivo alimentario o en la producción de queso.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que contiene beta-caseína obtenible mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una ilustración esquemática de un ejemplo de una realización de la invención, donde (1) es la leche, (2) es la unidad de pre-calentamiento, 3/3'/3'' son unidades MF, 4/4'/4'' son flujos de retentado, 5/5'/5'' son adiciones del primer diluyente, 6/6'/6'' son flujos de permeato, (7) es el enfriamiento y mantenimiento del retentado diluido (4'), 8/8'/8'' son unidades MF, 9/9'/9'' son flujos de retentado, 10/10'/10'' son flujos de permeato, 11/11' son adiciones del segundo diluyente, (12) es una unidad de secado por pulverización.

La Figura 2 ilustra el perfil de temperatura de un método que incluye una elevada temperatura de pre-calentamiento, T_{pre} , y una temperatura bastante menor durante la microfiltración de la leche caliente, T_{wMF} .

La Figura 3 ilustra el perfil de temperatura de un método en donde T_{pre} es aproximadamente la misma que T_{wMF} .

La Figura 4 es un electroferograma de un análisis por electroforesis capilar de la composición que contiene beta-caseína obtenida como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 5 es un electroferograma de un análisis por electroforesis capilar de una preparación de beta-caseína disponible comercialmente.

Descripción detallada de la invención

5 Como se dijo, un aspecto de la invención se refiere a un método para producir una composición que contiene beta-caseína, el método comprende las etapas de:

- a) pre-calentar la leche ajustando la temperatura de pre-calentamiento (T_{pre}) en el intervalo de 20-60 grados Celsius y con un tiempo de mantenimiento en el intervalo de 1 minuto – 1 hora, proporcionando así una leche caliente,
- 10 b) someter a la leche caliente a microfiltración (MF), proporcionando así un primer permeato MF y un primer retentado MF,
- c) opcionalmente, someter al primer retentado MF a MF-diafiltración,
- d) 15 ajustar la temperatura de una primera composición derivada del primer retentado MF a una temperatura fría ($T_{fría}$) en el intervalo de 0-15 grados Celsius y mantener la temperatura de la primera composición dentro de dicho intervalo durante una duración ($t_{frío}$) de al menos 0,5 horas, obteniendo así una primera composición fría,
- e) someter a la primera composición fría a microfiltración, obteniendo así un segundo retentado y un segundo permeato, cuyo segundo permeato está enriquecido en lo que respecta a beta-caseína, y
- f) 20 opcionalmente, someter el segundo retentado MF a MF-diafiltración,
- g) opcionalmente, someter a la segunda composición derivada del segundo permeato a una o más de otras etapas de procesamiento, por ejemplo, otra purificación y/o etapas de concentración,

proporcionando de esta manera la composición que contiene beta-caseína.

25 La composición que contiene beta-caseína obtenible mediante el método de la invención contiene preferiblemente al menos 30% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de proteína. Por ejemplo, la composición que contiene beta-caseína puede contener al menos 50% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de proteína. La composición que contiene beta-caseína puede contener al menos 60% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de proteína. Alternativamente, la composición que contiene beta-caseína puede contener al menos 70% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de proteína, tal como, por ejemplo, al menos 80% (p/p) de beta-caseína.

30 La composición que contiene beta-caseína contiene preferiblemente una cantidad de beta-caseína en el intervalo de 30 - 100% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. Por ejemplo, la composición que contiene beta-caseína puede contener una cantidad de beta-caseína en el intervalo de 50 – 95% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. La composición que contiene beta-caseína puede contener, por ejemplo, una cantidad de beta-caseína en el intervalo de 55 - 90% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. Alternativamente, la composición que contiene beta-caseína puede contener una cantidad de beta-caseína en el intervalo de 60 - 80% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína.

35 La composición que contiene beta-caseína obtenible mediante el método de la invención contiene preferiblemente al menos 50% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de caseína. Por ejemplo, la composición que contiene beta-caseína puede contener al menos 70% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de caseína. La composición que contiene beta-caseína puede contener al menos 80% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de caseína. Alternativamente, la composición que contiene beta-caseína puede contener al menos 90% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de caseína. Por ejemplo, la composición que contiene beta-caseína puede contener al menos 95% (p/p) de beta-caseína relativa a la cantidad total de caseína, tal como, por ejemplo, al menos 97% (p/p) de beta-caseína.

45 El método también se puede emplear para producir un concentrado de proteína sérica, por ejemplo, mediante recogida del primer permeato y/o permeatos adicionales a partir del primer retentado de MF-diafiltración. Adicionalmente, el método se puede emplear para producir un aislado de caseína micelar reducido en beta-caseína, por ejemplo, mediante recogida del segundo retentado y/o un retentado posterior obtenido sometiendo al segundo retentado a MF-diafiltración fría. Por ejemplo, el método se puede utilizar para producir una composición que contiene beta-caseína, un concentrado de proteína sérica, y un aislado de caseína micelar reducido en beta-caseína.

50 En el contexto de la presente invención, la frase "Y y/o X" significa "Y" o "X" o "Y y X". Junto a la misma línea lógica, la frase " $n_1, n_2, \dots, n_{i-1}, y/o n_i$ " significa " n_1 " o " n_2 " o ... " n_{i-1} " o " n_i " o cualquier combinación de los componentes $n_1, n_2, \dots, n_{i-1}, y n_i$.

En el contexto de la presente invención, el término “micela de caseína” se refiere a un agregado esférico de especies de caseína, tal como alfa-s1-caseína, alfa-s2-caseína, beta-caseína y kappa-caseína. Las especies de caseína de la micela se mantienen unidas normalmente mediante iones de calcio e interacciones hidrofóbicas. La mayoría de la caseína de la leche natural está presente en forma de micelas de caseína.

- 5 La variante de beta-caseína humana es la principal proteína que se encuentra en la leche humana. En la leche de vaca, sin embargo, la variante de beta-caseína bovina sólo constituye aproximadamente 28-32% (p/p) de la cantidad total de proteína. La molécula de beta-caseína une el calcio a sus regiones fosforiladas, que están altamente conservadas. La beta-caseína se puede presentar, por ejemplo, en forma de beta-caseína unida a micela de caseína o en forma de beta-caseína libre. El término de “beta-caseína libre” se refiere a caseína que no está unida a micelas de caseína. La beta-caseína libre puede ser, por ejemplo, moléculas de beta-caseína libres o también llamadas sub-micelas, que contienen principalmente un número de beta-caseínas asociadas.

10 Como se dijo, la etapa a) del método implica ajustar la temperatura de la leche a la temperatura de pre-calentamiento (T_{pre}) de al menos 20 grados Celsius, proporcionando así una leche caliente. La etapa a) se puede percibir como una etapa de pre-calentamiento de la leche antes de que la leche contacte con el filtro de micro filtración.

15 La leche proporcionada en la etapa a) preferiblemente es una leche líquida obtenida de un mamífero. Como se emplea en la presente memoria el término “leche” incluye leche cruda, leche entera, leche desnatada, leche libre de grasa, leche baja en grasa, y leche con grasa entera. El término leche incluye además leche fresca o leche basada en leche en polvo resuspendida en agua.

- 20 Los contenidos sólidos de la leche se pueden, por ejemplo, haber modificado mediante dilución o concentración, es decir, la leche puede ser, por ejemplo, una leche concentrada o una leche diluida.

La leche libre de grasa es un producto lácteo desnatado o sin grasa. La leche baja en grasa se define normalmente como leche que contiene de aproximadamente 1% a aproximadamente 2 % de grasa. La leche de grasa entera contiene a menudo aproximadamente 3,25% de grasa.

- 25 Fuentes de leche incluyen, pero no se limitan a, vaca, oveja, cabra, búfalo, camello, llama, yegua y ciervo.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la leche comprende, o incluso consiste en, leche de vaca.

En algunas realizaciones de la invención, la leche se ha sometido a pasteurización y/o bactofugación para eliminar, o al menos reducir, la carga microbiana de la leche.

- 30 En algunas realizaciones de la invención, la leche de a) comprende 1-4,5% p/p de caseína, 0,1-1% p/p de proteína de suero lácteo, y 0,001-4% p/p de grasa de leche. En realizaciones de la invención incluso más preferidas, la leche de la etapa a) comprende 2-4,5% p/p de caseína, 0,2-1% p/p de proteína sérica láctea, y 0,01-0,5% p/p de grasa de leche.

- 35 Mientras que en la teoría se pueden usar todos los tipos de leche de mamífero, se prefiere particularmente que la leche se haya ordeñado recientemente de la fuente de leche, por ejemplo, de las vacas. Por ejemplo, la leche puede tener como máximo 5 días, es decir, como máximo 5 días desde el ordeño. Preferiblemente, la leche tiene como máximo 4 días. Por ejemplo, la leche puede tener como máximo 3 días. Incluso más preferiblemente, la leche tiene como máximo 2 días. Por ejemplo, la leche puede tener como máximo 1 día.

- 40 Es ventajoso el empleo de leches ordeñadas recientemente para el presente método, ya que da como resultado una menor degradación de la beta-caseína y, por lo tanto, un mejor rendimiento de beta-caseína que en leche con más tiempo de ordeño.

La temperatura de pre-calentamiento, T_{pre} , es al menos 20 grados Celsius. Por ejemplo, T_{pre} puede ser de al menos 30 grados Celsius. Alternativamente, T_{pre} puede ser al menos 40 grados Celsius. T_{pre} puede ser, por ejemplo, al menos 50 grados Celsius.

T_{pre} está en el intervalo de 20-60 grados Celsius.

- 45 La duración del pre-calentamiento, t_{pre} , puede variar dependiendo de la temperatura de pre-calentamiento, T_{pre} , que se emplee en el proceso. Se prefiere, sin embargo, que la leche se pre-caliente suficientemente para permitir la asociación de la beta-caseína libre de las micelas de caseína.

- 50 Los presentes inventores han observado indicios de que un tiempo de pre-calentamiento demasiado corto y/o una temperatura de pre-calentamiento demasiado baja conducen a un rendimiento de beta-caseína reducido. Los inventores han descubierto que es posible incrementar el rendimiento de beta-caseína controlando t_{pre} y T_{pre} .

Las temperaturas más elevadas utilizadas durante el pre-calentamiento, requirieron de menores tiempos de calentamiento para proporcionar una re-asociación eficiente beta-caseína libre de las micelas de caseína. Si T_{pre} está en el intervalo de 20-60 grados Celsius, el tiempo de mantenimiento está en el intervalo de 1 minuto - 1 hora.

Según la invención, T_{pre} está en el intervalo de 20-60 grados Celsius, el tiempo de mantenimiento está en el intervalo de 1 minuto - 1 hora.

La leche caliente puede contener además los carbohidratos, grasa y minerales habituales que se encuentran en la leche de mamíferos.

5 En el contexto de la presente invención los términos “método” y “proceso” se emplean de forma intercambiable.

En algunas realizaciones preferidas de la invención la temperatura de la leche se mantiene dentro del intervalo de la temperatura de pre-calentamiento, t_{pre} , durante una duración de como máximo 24 horas. Alternativamente, t_{pre} puede ser como máximo de 5 horas. t_{pre} puede ser, por ejemplo, de como máximo 1 hora. Por ejemplo, t_{pre} puede ser como máximo 0,5 horas.

10 El intervalo de la temperatura de pre-calentamiento es el intervalo de temperatura en el cual la leche se pre-calienta antes de contactar con el filtro MF en la etapa b).

Se pueden utilizar incluso una t_{pre} menor, por ejemplo, si la temperatura de pre-calentamiento es relativamente alta. Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, t_{pre} es como máximo 30 minutos. Alternativamente, t_{pre} puede ser como máximo 10 minutos, o incluso menor, tal como, a lo sumo 5 minutos.

15 Por ejemplo, el intervalo de la temperatura de pre-calentamiento puede ser 40-60 grados Celsius y t_{pre} puede ser como máximo 0,5 horas. El intervalo de la temperatura de pre-calentamiento puede ser, por ejemplo, 40-60 grados Celsius y t_{pre} puede ser como máximo 0,2 horas. Alternativamente, el intervalo de la temperatura de pre-calentamiento puede ser, por ejemplo, 40-60 grados Celsius y t_{pre} puede ser como máximo 0,1 horas.

20 La etapa b) implica someter a la leche caliente a microfiltración, proporcionando así un primer permeato MF y un primer retentado MF.

La MF de la etapa b) se realiza utilizando un filtro que retiene al menos una fracción sustancial de las micelas de caseína, y preferiblemente sustancialmente todas, pero que permite el paso de la proteína del suero lácteo.

El pre-calentamiento de la leche realizado durante la etapa a) da como resultado la unión de la mayor parte, y preferiblemente sustancialmente de toda, de la beta-caseína disponible a las micelas de caseína.

25 En algunas realizaciones preferidas de la invención el filtro para la MF caliente tiene un tamaño de poro nominal en el intervalo de 0,005-0,3 micras. Por ejemplo, el filtro para la MF caliente puede tener un tamaño de poro nominal en el intervalo de 0,007-0,2 micras. Alternativamente, el filtro para la MF caliente puede tener un tamaño de poro nominal en el intervalo de 0,01-0,1 micras. El filtro para la MF caliente puede tener, por ejemplo, un tamaño de poro nominal en el intervalo de 0,01-0,05 micras.

30 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el filtro MF se utiliza en un modo de flujo transversal.

Se puede encontrar un sistema de microfiltración adecuado, por ejemplo, en el Manual de Procesado Tetra Pak Dairy 2003 (ISBN 91-631-3427-6), el cual se incorpora en la presente memoria como referencia para todos los fines.

35 Se pueden encontrar más detalles respecto a la implementación de la microfiltración y la MF-diafiltración, en los libros “Tetra Pak Dairy processing Handbook”, 2003, (ISBN 91-631-3427-6) y “Membrane filtration and related molecular separation technologies”, Werner Kofod Nielsen, APV Systems, 2000, ISBN 87-88016757, que se incorporan en la presente memoria como referencia para todos los fines.

En algunas realizaciones preferidas de la invención el método de la presente invención comprende la etapa c), es decir, una etapa de someter a MF-diafiltración al primer retentado.

40 La presentes inventores han encontrado que el empleo de la diafiltración junto con la primera etapa de microfiltración es ventajosa ya que permite arrastrar la proteína del suero, que en caso contrario podría aparecer como impurezas en el producto de beta-caseína final. Aunque tales impurezas se podrían eliminar después en el proceso, los presentes inventores han encontrado que es tanto más fácil como conveniente hacerlo antes de la etapa de la segunda microfiltración.

45 La MF-diafiltración de la etapa c) puede implicar diluir el primer retentado con un primer diluyente y someter al primer retentado diluido a microfiltración para obtener un primer retentado de diafiltración y un primer permeato de diafiltración. Las micelas de caseína se retienen aún por el filtro MF mientras que la proteína de suero lácteo se mueve a través del filtro de microfiltración y en el primer permeato de diafiltración. La dilución del retentado y posterior microfiltración se puede repetir varias veces, proporcionando cada vez un retentado que tiene un menor contenido de proteína de suero lácteo que en el ciclo anterior.

50 Como se entenderá, estas etapas de filtración pueden ser etapas separadas realizadas una por una en un proceso de lote o se pueden realizar simultáneamente en un proceso continuo.

El empleo de la MF–diafiltración es ventajoso ya que hace posible arrastrar la mayoría de la proteína del suero lácteo del alimento inicial. La MF-diafiltración es además ventajosa ya que conduce a una viscosidad relativamente baja y, por lo tanto, no expone a las micelas de caseína a fuerzas cortantes excesivas.

- 5 La MF y MF-diafiltración se realizan normalmente empleando una presión baja, por ejemplo, utilizando una presión de como máximo 5 bares, y preferiblemente como máximo 4 bares. Por ejemplo, la MF y la MF-diafiltración se pueden realizar empleando una presión de como máximo 3 bares. Alternativamente, la MF y MF-diafiltración se pueden realizar empleando una presión de como máximo 2 bares. En realizaciones preferidas de la invención, la MF y MF-diafiltración se realizan empleando una presión de cómo máximo 1 bar, tal como, por ejemplo, como máximo 0,5 bares.
- 10 El filtro de la MF-diafiltración puede ser el mismo o similar al de la MF inicial de la leche caliente.
- La temperatura del alimento y de los retentados posteriores de la MF-diafiltración se mantienen preferiblemente dentro del intervalo de temperatura caliente durante al menos parte de la MF-diafiltración, y por ejemplo, durante la MF-diafiltración completa. Esto es para permitir arrastrar la beta-caseína del retentado durante la diafiltración de la etapa c).
- 15 En algunas realizaciones preferidas de la invención al menos parte de la MF-diafiltración implica el uso de un primer diluyente que tiene una concentración de Ca^{2+} de al menos 0,01 g/kg. Por ejemplo, el primer diluyente puede tener una concentración de Ca^{2+} de al menos 0,02 g/kg. Alternativamente, el primer diluyente puede tener una concentración de Ca^{2+} de al menos 0,04 g/kg. El primer diluyente puede, por ejemplo, tener una concentración de Ca^{2+} de al menos 0,1 g/kg.
- 20 El uso de diluyentes que contienen una cantidad significativa de iones de calcio parece reducir el arrastre de la beta-caseína durante la etapa de MF/MF-diafiltración caliente y mejora el rendimiento global de beta-caseína del proceso.
- El primer diluyente puede tener, por ejemplo, un pH en el intervalo de 5-9, y preferiblemente en el intervalo de 6-8. Por ejemplo, el primer diluyente puede tener un pH de aproximadamente 7. El primer diluyente no contiene preferiblemente, o contiene al menos un contenido muy bajo de proteína.
- 25 En algunas realizaciones de la invención, el primer diluyente comprende, o incluso consiste en, la ultrafiltración (UF) del permeato de la leche o del suero.
- Alternativamente, el primer diluyente puede ser agua desmineralizada o agua del grifo.
- La temperatura empleada durante la MF y la MF-diafiltración caliente, T_{wMF} , es al menos 20 grados Celsius. Por ejemplo, T_{wMF} puede ser al menos 30 grados Celsius. Alternativamente, T_{wMF} puede ser al menos 40 grados Celsius.
- 30 T_{wMF} puede ser, por ejemplo, al menos 45 grados Celsius.
- Incluso pueden ser deseables temperaturas más elevadas durante la MF y MF-diafiltración caliente, por tanto, T_{wMF} puede ser al menos 50 grados Celsius. Por ejemplo, T_{wMF} puede ser al menos 55 grados Celsius. Alternativamente, la T_{wMF} puede ser al menos 60 grados Celsius.
- 35 En algunas realizaciones de la invención, T_{wMF} está en el intervalo de 20-65 grados Celsius. Por ejemplo, T_{wMF} puede estar en el intervalo de 30-60 grados Celsius. Alternativamente, T_{wMF} puede estar en el intervalo de 35-55 grados Celsius. En algunas realizaciones T_{wMF} está en el intervalo de 40-55 grados Celsius.
- La duración, t_{wMF} , de la MF caliente y la MF-diafiltración caliente opcional, se mantienen preferiblemente lo más breve que sea posible. Por tanto, t_{wMF} , preferiblemente es como máximo 12 horas. Por ejemplo, t_{wMF} puede ser como máximo 5 horas. Alternativamente, t_{wMF} , puede ser como máximo 2 horas. t_{wMF} puede ser como máximo 1 hora. Por ejemplo, t_{wMF} puede ser como máximo 0,5 horas. Alternativamente, t_{wMF} puede ser como máximo 0,1 horas.
- 40 El retentado se enfría preferiblemente a una temperatura por debajo de 20 grados Celsius cuando abandona la unidad de MF-diafiltración o, si no se emplea la diafiltración, cuando abandona la unidad de MF.
- Como se dijo, la etapa d) implica ajustar la temperatura de una primera composición derivada del primer retentado MF hasta una temperatura fría ($T_{\text{fría}}$) en el intervalo de 0-15 grados Celsius y, mantener la temperatura de la primera composición dentro de este intervalo durante una duración ($t_{\text{frío}}$) de al menos 0,5 horas, obteniendo así una primera composición fría.
- 45 La primera composición es preferiblemente una composición acuosa líquida. La primera composición se deriva del primer retentado MF en el sentido de que al menos 50% (p/p) de las micelas de caseína de la primera composición se originan del primer retentado MF y/o del retentado de MF-diafiltración del mismo.
- 50 Por ejemplo, al menos 75% (p/p) de las micelas de caseína de la primera composición puede originar el primer retentado MF y/o del primer retentado MF-diafiltración del mismo. Preferiblemente, al menos 90% (p/p) de las micelas de caseína de la primera composición se origina del primer retentado MF y/o del retentado de MF-diafiltración del mismo. Incluso más preferiblemente, al menos 95% (p/p) de las micelas de caseína de la primera

composición se origina del primer retentado MF y/o del retentado MF-diafiltración del mismo, tal como, por ejemplo, sustancialmente todas las micelas de caseína.

En algunas realizaciones preferidas de la invención la primera composición es el primer retentado MF y/o un retentado MF-diafiltración del mismo.

5 Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, el primer retentado MF y/o un retentado MF-diafiltración del mismo, se puede someter a una o más etapas de procesamiento adicionales que conducen a la formación de la primera composición. Tales etapas de procesamiento adicionales pueden implicar, por ejemplo, el ajuste de la temperatura, concentración, dilución, desmineralización y/o ajuste del pH.

10 En algunas realizaciones de la invención la provisión de la primera composición implica concentrar el primer retentado MF y/o un retentado MF-diafiltración del mismo.

15 En algunas realizaciones preferidas de la invención la primera composición comprende una cantidad total de caseína de al menos 90% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad total de caseína de al menos 92% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de caseína de al menos 94% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición. La primera composición puede comprender, por ejemplo, una cantidad total de caseína de al menos 96% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición, tal como aproximadamente 98% (p/p).

20 La primera composición normalmente comprende una cantidad total de proteína de suero lácteo de como máximo 10% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad total de proteína de suero lácteo de como máximo 8% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de proteína de suero lácteo de como máximo 6% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición. La primera composición puede, por ejemplo, comprender una cantidad total de proteína de suero lácteo de como máximo 4% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición.

25 En algunas realizaciones de la invención la primera composición comprende una cantidad total de proteína de al menos 0,1% (p/p) relativa al peso total de la primera composición. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad total de proteína de al menos 0,5% (p/p) relativa al peso total de la primera composición. La primera composición puede, por ejemplo, comprender una cantidad total de proteína de al menos 1% (p/p) relativa al peso total de la primera composición. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de proteína de al menos 2% (p/p) relativa al peso total de la primera composición.

30 En algunas realizaciones de la invención la primera composición comprende una cantidad de proteína total en el intervalo de 0,1-20% (p/p) relativa al peso total de la primera composición. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad de proteína total en el intervalo de 0,5-10% (p/p) relativa al peso total de la primera composición. La primera composición puede, por ejemplo, comprender una cantidad total de proteína en el intervalo de 1-7% (p/p) relativa al peso total de la primera composición. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de proteína en el intervalo de 2-6% (p/p) relativa al peso total de la primera composición, tal como, por ejemplo, en el intervalo de 3-4% (p/p).

35 En algunas realizaciones de la invención la primera composición comprende una cantidad total de beta-caseína de al menos 1% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína de al menos 10% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. La primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína de al menos 20% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína de al menos 30% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína.

45 En algunas realizaciones de la invención la primera composición comprende una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 1-50% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 10-45% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. La primera composición puede, por ejemplo, comprender una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 20-45% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 30-40% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína.

50 La cantidad total de beta-caseína se puede determinar según Bobe et al (Bobe et al; J Agric Food Chem. 1998 Feb 16;46(2):458-463).

La cantidad total de caseína se puede determinar según ISO 17997-1:2004, Milk – Determination of casein-nitrogen content – Part 1: Indirect method (Método de referencia).

55 En algunas realizaciones de la invención la primera composición comprende una cantidad total de beta-caseína de al menos 20% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína de al menos 25% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína. La primera

composición puede comprender, por ejemplo, una cantidad total de beta-caseína de al menos 30% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína de al menos 35% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína.

5 En algunas realizaciones de la invención la primera composición comprende una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 20-50% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína. Por ejemplo, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 25-45% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína. La primera composición puede, por ejemplo, comprender una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 30-45% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína. Alternativamente, la primera composición puede comprender una cantidad total de beta-caseína en el intervalo de 35-40% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína.

10 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el método de la presente invención comprende la etapa c) y la primera composición comprende, o incluso consiste en, un retentado de diafiltración o un concentrado proteico del mismo.

15 En el contexto de la presente invención, un concentrado proteico de un líquido contiene una concentración de proteínas mayor que el líquido como tal pero la razón molar es sustancialmente la misma entre las proteínas individuales. Un concentrado proteico puede obtenerse, por ejemplo, sometiendo al líquido a ultrafiltración, ósmosis inversa o evaporación del disolvente.

20 La temperatura de la primera composición se ajusta hasta una temperatura, $T_{fría}$, en una temperatura fría en un intervalo de 0-15 grados Celsius para permitir a la beta-caseína unida a la micela de caseína disociarse de las micelas de caseína. La primera composición puede enfriarse o bien directamente o bien se puede preparar a partir de componentes que ya se han enfriado según se indica en la presente memoria.

El intervalo de la temperatura fría puede ser, por ejemplo, 1-12 grados Celsius. Por ejemplo, el intervalo de temperatura fría puede ser 2-10 grados Celsius. El intervalo de temperatura fría puede ser, por ejemplo, 3-7 grados Celsius, tal como aproximadamente 5 grados Celsius.

25 La primera composición se mantiene preferiblemente dentro del intervalo de temperatura fría durante una duración, $t_{frío}$, de al menos 0,5 horas antes de la etapa e).

30 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la primera composición se mantiene dentro del intervalo de temperatura fría durante una duración, $t_{frío}$, de al menos 1 hora antes de la etapa e). Por ejemplo, $t_{frío}$ puede ser de al menos 2 horas. Alternativamente, $t_{frío}$ puede ser al menos 3 horas, tal como, por ejemplo, al menos 4 horas. Se pueden utilizar incluso tiempos más largos, por tanto, la primera composición puede, por ejemplo, mantenerse dentro del intervalo de temperatura fría durante una duración, $t_{frío}$, de al menos 15 horas antes de la etapa e). Por ejemplo, $t_{frío}$ puede ser al menos 30 horas. Alternativamente, $t_{frío}$ puede ser al menos 60 horas, tal como, por ejemplo, al menos 80 horas.

La primera composición puede contener además pequeñas moléculas, por ejemplo carbohidratos y minerales habituales, que se encuentran en la leche de mamíferos.

35 La etapa e) implica someter a la primera composición enfriada a MF, obteniendo así un segundo retentado y un segundo permeato, cuyo segundo permeato está enriquecido con respecto a beta-caseína.

El segundo permeato está enriquecido en beta-caseína en el sentido de que contiene un mayor porcentaje de peso de beta-caseína relativo a la cantidad total de caseína que se enfrió en la primera composición.

40 La microfiltración de la etapa e) puede hacer uso, por ejemplo, del mismo sistema de microfiltración, incluyendo el filtro MF, que se utilizó para la microfiltración de la leche caliente.

Se prefiere que la temperatura de la primera composición enfriada y los retentados resultantes, se mantenga dentro del intervalo de la temperatura fría, durante la MF fría de la etapa e).

45 Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, la temperatura de la primera composición enfriada se alcanza inmediatamente antes de la segunda microfiltración. Los presentes inventores han observado indicios de que el incremento de la temperatura de la primera composición enfriada hasta una temperatura en el intervalo de 15-60 grados Celsius inmediatamente antes de la segunda etapa de microfiltración, tiene el beneficio de incrementar la capacidad de la unidad de microfiltración, que reduce el consumo de energía del proceso y, sin una pérdida significativa en el rendimiento de beta-caseína. Por tanto, en algunas realizaciones preferidas de la invención, $T_{fría}$ está en el intervalo de temperatura de 0-15 grados Celsius y T_{cMF} está en el intervalo de 15-60 grados Celsius. Por ejemplo, $T_{fría}$ puede estar en el intervalo de temperatura de 0-15 grados Celsius y T_{cMF} puede estar en el intervalo de 15-50 grados Celsius. Alternativamente, $T_{fría}$ puede estar en el intervalo de temperatura de 0-15 grados Celsius y T_{cMF} puede estar en el intervalo de 15-30 grados Celsius.

50 En el contexto de la presente invención, el término "inmediatamente antes de la segunda microfiltración" significa como máximo 10 minutos antes de la que la primera composición contacte con la membrana de la unidad de

filtración realizando la segunda microfiltración, preferiblemente como máximo 5 minutos antes, e incluso más preferido como máximo 2 minutos antes, tal como a lo sumo 1 minuto antes.

En algunas realizaciones preferidas de la invención el método comprende la etapa f), es decir, una etapa de someter al segundo retentado a MF-diafiltración para arrastrar más beta-caseína.

- 5 Los presentes inventores han encontrado que es ventajoso realizar la diafiltración después de la segunda etapa de microfiltración, ya que permite arrastrar más beta-caseína a partir del segundo retentado MF, incrementando así el rendimiento de beta-caseína por kg de alimento lácteo.

La MF-diafiltración de la etapa f) puede implicar diluir el segundo retentado con un segundo diluyente y someter al segundo retentado diluido a microfiltración para obtener un retentado de diafiltración y un permeato de diafiltración.

- 10 Las micelas de caseína se retienen todavía por el filtro MF, mientras que la beta-caseína disociada se mueve a través del filtro de microfiltración y en el permeato de diafiltración. La dilución del retentado de diafiltración y la microfiltración posterior se pueden repetir varias veces, proporcionando cada vez un retentado que tiene un menor contenido de beta-caseína que en el ciclo anterior.

- 15 El segundo diluyente tiene normalmente un pH en el intervalo de 5-9, y preferiblemente en el intervalo de 6-8. Por ejemplo, el segundo diluyente puede tener un pH de aproximadamente 7. El segundo diluyente preferiblemente no contiene o sólo contiene un contenido muy bajo de proteína.

En algunas realizaciones de la invención, el segundo diluyente comprende, o incluso consiste en, la ultrafiltración (UF) del permeato de la leche o suero.

- 20 Alternativamente, el segundo diluyente puede ser agua desmineralizada o agua del grifo. Los presentes inventores han observado indicios de que el uso de agua como el segundo diluyente en la segunda etapa de MF-diafiltración incrementa la cantidad de beta-caseína que se libera de las micelas de caseína durante la segunda MF-diafiltración y por tanto, parece incrementar el rendimiento de toda la beta-caseína por kg de alimento lácteo.

El permeato o permeatos de diafiltración de la etapa f) contiene beta-caseína libre y se puede combinar con el segundo permeato.

- 25 El segundo permeato o el segundo permeato combinado y posteriores permeatos de MF-diafiltración fría se pueden emplear como la composición de beta-caseína de la invención.

Se prefiere que la temperatura de los retentados se mantenga dentro del intervalo de temperatura fría durante la MF fría de la etapa e) y también durante la MF-diafiltración fría de la etapa f) si este último se incluye en el proceso.

- 30 La MF fría y la MF-diafiltración fría se realizan normalmente empleando una presión baja, por ejemplo, utilizando una presión de como máximo 5 bares, y preferiblemente como máximo 4 bares. Por ejemplo, la MF y la MF-diafiltración se pueden realizar empleando una presión de como máximo 3 bares. Alternativamente, la MF y MF-diafiltración se pueden realizar empleando una presión de como máximo 2 bares. La Mf y MF-diafiltración se pueden realizar, por ejemplo, empleando una presión de como máximo 1 bar, tal como, por ejemplo, como máximo 0,5 bares.

- 35 La duración, t_{CMF} , de la MF fría y MF-diafiltración fría opcional, se mantienen preferiblemente lo más breve que sea posible. Por tanto, t_{CMF} , preferiblemente es como máximo 12 horas. Por ejemplo, t_{CMF} puede ser como máximo 5 horas. Alternativamente, t_{CMF} , puede ser como máximo 2 horas. t_{CMF} puede ser como máximo 1 hora. Por ejemplo, t_{CMF} puede ser como máximo 0,5 horas. Alternativamente, t_{CMF} puede ser como máximo 0,1 horas.

- 40 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el método contiene una etapa g) de someter una segunda composición derivada del segundo permeato a una o más de otras etapas de procesamiento, por ejemplo, otra purificación y/o etapas de concentración.

La segunda composición es preferiblemente una composición acuosa líquida. La segunda composición se deriva del segundo permeato MF en el sentido de que al menos 50% (p/p) de la beta-caseína de la segunda composición se origina del segundo permeato MF y/o de otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la etapa f).

- 45 Por ejemplo, al menos 75% (p/p) de la beta-caseína de la segunda composición puede originar del segundo permeato MF y/u otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la MF-diafiltración de la etapa f). Preferiblemente, al menos 90% (p/p) de la beta-caseína de la segunda composición se origina del segundo permeato MF y/o de otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la MF- diafiltración de la etapa f). Incluso más preferiblemente, al menos 95% (p/p) de la beta-caseína de la segunda composición se origina del segundo permeato MF y/o de otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la MF-diafiltración de la etapa f), tal como, por ejemplo, sustancialmente toda la beta-caseína.
- 50

En algunas realizaciones preferidas de la invención la segunda composición es el segundo permeato MF y/u otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la MF-diafiltración de la etapa f). Alternativamente, la segunda composición puede ser un concentrado proteico del segundo permeato MF y/u otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la MF-diafiltración de la etapa f).

Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, el segundo permeato MF y/u otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la MF-diafiltración de la etapa f), se pueden someter a etapas de procesamiento adicionales que conducen a la formación de la segunda composición. Tales etapas de procesamiento adicionales pueden implicar, por ejemplo, el ajuste de la temperatura, concentración, dilución, desmineralización y/o ajuste del pH.

5 En algunas realizaciones de la invención la provisión de la segunda composición implica concentrar el segundo permeato MF y/u otro u otros permeato o permeatos obtenidos a partir de la MF-diafiltración de la etapa f).

10 En algunas realizaciones de la invención la concentración de la etapa g) implica calentar la segunda composición hasta una temperatura y una duración suficiente para la formación de sub-micelas de beta-caseína y someter posteriormente la segunda composición que contiene las sub-micelas de beta-caseína a microfiltración ultrafiltración bajo condiciones que retengan las sub-micelas de beta-caseína en el retentado y permita el paso de proteínas del suero en el permeato.

El peso molecular nominal de corte de la membrana utilizada para la ultrafiltración puede estar, por ejemplo en el intervalo de 50-750 kDa, y preferiblemente en el intervalo de 75-400 kDa, tal como, por ejemplo, en el intervalo de 100-300 kDa.

15 En algunas realizaciones de la invención la concentración de la etapa g) incrementa el porcentaje de peso de beta-caseína de la segunda composición hasta al menos 50% (p/p) expresado en peso seco.

En algunas realizaciones de la invención la concentración de la etapa g) incrementa el porcentaje en peso de la beta-caseína en la segunda composición hasta 50-85% (p/p) expresado en peso seco.

20 En algunas realizaciones de la invención la concentración de la etapa g) incrementa el contenido de sólidos de la segunda composición hasta al menos 5% (p/p). Por ejemplo, la concentración de la etapa g) puede incrementar el contenido de sólidos de la segunda composición hasta al menos 10% (p/p). Alternativamente, la concentración de la etapa g) puede incrementar el contenido de sólidos de la segunda composición hasta al menos 15% (p/p), tal como al menos 20%.

25 La concentración de la etapa g) puede, por ejemplo, implicar uno o más procesos que se seleccionan del grupo que consiste en ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, evaporación, secado por pulverización y liofilización. Por ejemplo, la concentración de la etapa g) puede implicar, por ejemplo, dos o más procesos que se seleccionan del grupo que consiste en ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, evaporación, secado por pulverización y liofilización.

30 El método presente puede implementarse, por ejemplo, como un método de lote o como un método continuo. Cada etapa se puede implementar como un lote separado. Alternativamente, se pueden implementar grupos de etapas como un sub-proceso continuo. Por ejemplo, las etapas b) y c) se pueden implementar como un sub-proceso continuo. Alternativamente, o adicionalmente, las etapas e) y f) se pueden implementar como un sub-proceso continuo.

35 Los sistemas MF empleados en las etapas MF y/o MF-diafiltración, preferiblemente son sistemas que permiten controlar la temperatura del alimento y del flujo de retentado, por ejemplo, mediante calentamiento del agua o enfriamiento del agua.

Se prefiere controlar tanto la temperatura como la duración de las distintas etapas del método. Las Figuras 2 y 3 ilustran dos ejemplos no limitantes del perfil del tiempo y temperatura durante tal método.

Los símbolos empleados en las Figuras 2 y 3 tienen el siguiente significado:

40 T_{pre} = La temperatura a la que se calienta la leche durante el pre-calentamiento.

t_{pre} = La duración a la que se mantienen la leche dentro del intervalo T_{pre} deseado durante el pre-calentamiento.

T_{wMF} = La temperatura de la leche durante la MF caliente. Si la MF caliente es seguida por MF-diafiltración caliente, la temperatura del flujo del retentado preferiblemente también es la T_{wMF} o está dentro del intervalo deseado para T_{wMF} .

45 t_{wMF} = La duración de la MF caliente. Si la MF caliente es seguida por MF-diafiltración caliente, t_{wMF} es la duración combinada de la MF caliente y la MF-diafiltración caliente.

$t_{caliente}$ = El tiempo medio durante el proceso en el que la micela de caseína se mantiene a una temperatura de al menos 20 grados Celsius.

50 $t_{enfriamiento}$ = La duración del enfriamiento del retentado a partir de la T_{wMF} hasta una temperatura dentro del intervalo deseado para la $T_{fría}$.

$T_{\text{fría}}$ = La temperatura de la primera composición durante la etapa de almacenamiento en frío y durante la MF/MF-diafiltración fría.

$t_{\text{frío}}$ = La duración de la etapa de almacenamiento en frío.

t_{CMF} = La duración de la MF/MF-diafiltración fría.

- 5 Si el método se implementa como un proceso continuo, las duraciones relacionadas al procesamiento o condiciones específicas de la leche o de los retentados que contienen las micelas de caseína, son el tiempo medio al que la micela de caseína se somete al procesamiento o condición específica mencionado.

La Figura 2 se diferencia de la Figura 3 en que tiene una T_{pre} que es significativamente mayor que la T_{WMF} . En el método según la Figura 3, T_{pre} es aproximadamente la misma que T_{WMF} .

- 10 El empleo de un pre-calentamiento corto a una temperatura de pre-calentamiento relativamente alta seguido por una MF/MF-diafiltración caliente a T_{WMF} baja, representa una realización interesante ya que parece reducir la digestión de beta-caseína causada por plasmina.

- 15 Aunque se prefiere que el método de la presente invención se implemente con un control estricto de la temperatura y del tiempo, pueden aceptarse algunas fluctuaciones de la temperatura, siempre y cuando T_{pre} , T_{WMF} , $T_{\text{fría}}$ permanezcan dentro de los intervalos mencionados en la presente memoria.

Se prefiere que el tiempo en el que la leche y los flujos que contienen las micelas de caseína relacionadas, se efectúen a una temperatura elevada y se mantengan en un mínimo. Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, el tiempo medio, t_{caliente} , al que se mantiene la micela de caseína a una temperatura de al menos 20 grados Celsius, es como máximo 6 horas.

- 20 Por ejemplo, el tiempo medio, t_{caliente} , al que se mantiene la micela de caseína a una temperatura de al menos 20 grados Celsius, puede ser como máximo 3 horas. El tiempo medio, t_{caliente} , al que se mantiene la micela de caseína a una temperatura de al menos 20 grados Celsius, puede ser, por ejemplo, como máximo 1 hora. Alternativamente, el tiempo medio, t_{caliente} , al que se mantiene la micela de caseína a una temperatura de al menos 20 grados Celsius, puede ser como máximo 0,5 horas. Incluso es posible un procesamiento más rápido, por tanto, el tiempo medio, t_{caliente} , al que se mantiene la micela de caseína a una temperatura de al menos 20 grados Celsius, puede ser como máximo 0,1 horas.

Reducir el tiempo medio a alta temperatura parece reducir el nivel de la digestión de beta-caseína por plasmina, mejorando así el rendimiento de beta-caseína.

- 30 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el retentado resultante de las etapas b) o c) se someten a una etapa de inactivación de la plasmina, tal como, por ejemplo, una etapa de inactivación por calor. La etapa de inactivación por calor puede implicar, por ejemplo, ajustar la temperatura del retentado a una temperatura en el intervalo de 70-100 grados Celsius y, mantener la temperatura de la leche-alimento relacionado, en este intervalo durante un periodo en el intervalo de 10-500 segundos. La etapa de inactivación por calor puede implicar, por ejemplo, ajustar la temperatura del retentado a una temperatura en el intervalo de 85-95 grados Celsius y, mantener la temperatura de la leche-alimento relacionado, en este intervalo durante un periodo en el intervalo de 10-100 segundos.

Parece particularmente ventajoso inactivar la plasmina después de que las proteínas del suero lácteo hayan sido eliminadas, al menos parcialmente, mediante la MF/diafiltración MF caliente, ya que las proteínas del suero lácteo son más susceptibles a la desnaturalización térmica que las caseínas.

- 40 La inactivación de la plasmina resulta también en una reducción del nivel de la digestión de beta-caseína por plasmina y se mejora de esta manera el rendimiento de beta-caseína.

Los flujos que contienen beta-caseína, por ejemplo la leche y posteriores retentados que contienen caseína, normalmente tienen un pH en el intervalo de 6-8, y preferiblemente un pH en el intervalo de 6,5-7,5. Los valores de pH mencionados en la presente memoria se miden a 25 grados Celsius, a menos que se indique de otra manera.

45 Ejemplos

Ejemplo 1 – Producción de beta-caseína según la invención

Se produjo un aislado de beta-caseína según el método de la presente invención.

Microfiltración/MF-diafiltración caliente:

- 50 Se pre-calentaron 25 m³ de una leche desnatada fría no-pasteurizada a 55 grados Celsius durante 10 minutos en un tanque que retiene el calor y, se sometió a microfiltración en continuo utilizando membranas enrolladas en espiral de 6" del tipo FR6338 de Synder Filtration, Vacaville, California, EE.UU, con 46 mil espaciadores y un valor de corte

nominal de 800.000 Daltons. La velocidad de flujo del alimento era 4000 L/h. En el equipamiento de microfiltración continuo se presentaban cuatro bucles. El área total de la membrana era de 1208 m². La filtración se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: La leche desnatada se concentró con un factor de concentración de 1,3. La temperatura se mantuvo a 50 grados Celsius, y la presión media se mantuvo a 0,53 bares a través de los dos elementos de filtro con una presión de alimentación de 0,15 bares. El permeato de la microfiltración se dirigió hacia un proceso de ultrafiltración paralelo, y el permeato del proceso de ultrafiltración se dirigió de nuevo de forma continua hacia el retentado de filtración para llevar a cabo la diafiltración del retentado de microfiltración. Se llevó a cabo el 287% de la diafiltración, es decir el volumen del permeato de ultrafiltración empleado para la diafiltración era 2,87 veces el volumen de la leche desnatada suministrado en el proceso de microfiltración. El flujo medio fue aproximadamente 17 L/m²/h. El retentado de microfiltración procesado fue continuamente sometido a tratamiento por calor a 74 grados Celsius durante 15 segundos, enfriado a 6 grados Celsius y recogido en un tanque. Se recogió un total de 18 m³ de una disolución MCI (aislado de caseína micelar) al final del proceso de microfiltración. El contenido de proteína en la disolución MCI era 4,1% (gramo de proteína por 100 gramos de disolución).

Ultrafiltración del permeato de la microfiltración caliente:

Se recogió el permeato del proceso de microfiltración en un tanque de alimentación para el proceso continuo de ultrafiltración. Simultáneamente con el proceso de microfiltración, la ultrafiltración se llevó a cabo utilizando membranas enrolladas en espiral de 6" del tipo HFK-328 6338 de Koch Membrane Systems, Wilmington, Massachusetts, EE.UU, con 31 mil espaciadores y un valor de corte nominal de 5.000 Daltons. El equipamiento de microfiltración continuo presentaba dos bucles. El área total de la membrana era de 528 m². La filtración se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: La temperatura se mantuvo a 50 grados Celsius, y la presión media se mantuvo de 2,8 a 3,5 bares a través de los tres elementos de filtro para suministrar el permeato de ultrafiltración hasta el proceso de microfiltración con el mismo flujo al que se eliminó el permeato del proceso de microfiltración. El flujo medio fue de aproximadamente 30 L/m²/h.

Almacenamiento de la disolución MCI:

La disolución MCI se almacenó a 6 grados Celsius durante un periodo de 60 horas.

Microfiltración fría de la disolución MCI:

Se sometieron a microfiltración 1200 litros de la disolución MCI almacenada utilizando membranas enrolladas en espiral de 6" del tipo FR6338 de Synder Filtration, Vacaville, California, EE.UU, con 46 mil espaciadores y un valor de corte nominal de 800.000 Daltons. El área total de la membrana era de 382 m². La filtración se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: La temperatura se mantuvo a aproximadamente 6 grados Celsius, y la presión media se mantuvo a 0,40 bares a través de los dos elementos de filtro con una presión de alimentación de 0,05 bares. El permeato de la microfiltración se dirigió hacia un proceso de ultrafiltración paralelo, y el permeato del proceso de ultrafiltración se dirigió de nuevo de forma continua hacia el retentado de filtración para llevar a cabo la diafiltración del retentado de microfiltración. Se llevó a cabo el 500% de la diafiltración, es decir, el volumen del permeato de ultrafiltración empleado para la diafiltración era cinco veces el volumen de la disolución MCI suministrado en el proceso de microfiltración. El flujo se midió como 5,0 L/m²/h.

Concentración del permeato de la MF fría mediante ultrafiltración:

Se recogió el permeato del proceso de microfiltración en un tanque de alimentación para el proceso de ultrafiltración. Simultáneamente con el proceso de microfiltración fría, la ultrafiltración se llevó a cabo con membranas enrolladas en espiral de 6" del tipo HFK-328 6338 de Koch Membrane Systems, Wilmington, Massachusetts, EE.UU, con 31 mil espaciadores y un valor de corte nominal de 5.000 Daltons. El área total de la membrana era de 176 m². La filtración se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: La temperatura se mantuvo a aproximadamente 6 grados Celsius, y la presión media se mantuvo de 1,5 a 3,0 bares a través de los dos elementos de filtro para suministrar el permeato de ultrafiltración hasta el proceso de microfiltración con el mismo flujo al que se eliminó el permeato de microfiltración del proceso de microfiltración. El flujo medio fue de aproximadamente 11 L/m²/h. Después de que se completará el proceso de filtración tras 3 horas, se recogieron aproximadamente 400 litros del retentado de ultrafiltración. Posteriormente el retentado se sometió a diafiltración en el cual se añadieron 3.000 litros de agua del grifo con el mismo flujo al que se eliminó el filtrado para eliminar la lactosa. Después de la diafiltración se concentró el retentado hasta que el contenido proteico en el retentado fuese 3%. El volumen final del retentado fue de 150 litros. Las condiciones de filtración fueron las mismas que anteriormente.

Pasteurización y secado por pulverización del permeato-UF que contiene beta-caseína:

Aproximadamente 70 litros del retentado final de la diafiltración fría se sometieron a pasteurización a 72 grados Celsius durante 15 segundos. Después de la pasteurización se llevó a cabo una etapa de secado por pulverización de la disolución proteica empleando parámetros estándar incluyendo una temperatura de entrada de aire de 180 grados Celsius y una temperatura de salida de aire de 90 grados Celsius. Se obtuvo un polvo de 2,1 kg.

El contenido de proteína en el polvo se midió como 91% (gramo de proteína por 100 gramos de polvo), y el contenido de la materia seca en el polvo se midió como 95% (gramo de materia seca por 100 gramos de polvo). El

contenido de beta-caseína del polvo se analizó como se describe en el Ejemplo 3 y se determinó a 75% (gramo de beta-caseína por 100 gramos de proteína).

Se analizó el contenido del aminoácido prolina según el Ejemplo 3 y se determinó a 13,0 gramos de prolina por 100 gramos de proteína.

5 Ejemplo 2 – Producción de beta-caseína según la invención

Se produjo otro aislado de beta-caseína según el método de la presente invención.

Microfiltración/MF-diafiltración caliente:

El pre-calentamiento y la microfiltración de la leche fría desnatada pasteurizada se llevó a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, excepto por lo siguiente: se utilizaron 35 m³ de leche desnatada, y la leche desnatada se pre-calentó a 55 grados Celsius durante 7 minutos en un tanque que retiene el calor. Se utilizaron tanto membranas enrolladas en espiral de 6" como de 8", y en el equipamiento de microfiltración en continuo se presentaban cinco bucles. El área total de la membrana era de 1399 m². La velocidad de flujo del alimento era 5000 L/h. La presión media se mantuvo a 0,53 bares a través de los dos elementos de filtro con una presión de alimentación de 0,15 bares. Se llevó a cabo el 327% de la diafiltración, es decir, el volumen del permeato de ultrafiltración empleado para la diafiltración era 3,27 veces el volumen de la leche desnatada suministrado en el proceso de microfiltración. El flujo medio se midió como 16 L/m²/h. Al final del proceso de microfiltración se recogió un total de 27 m³ de disolución MCI (aislado de caseína micelar). El contenido proteico en la disolución MCI fue 4,6% (gramo de proteína por 100 gramos de disolución).

Ultrafiltración del permeato de la microfiltración caliente:

El proceso de ultrafiltración se llevó a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 excepto por lo siguiente: Se utilizaron membranas con 31 mil, 46 mil y 80 mil espaciadores. El equipamiento de ultrafiltración presentaba cuatro bucles. El área total de la membrana era de 1331 m². El flujo medio era aproximadamente 15 L/m²/h.

Almacenamiento de la disolución MCI:

25 La disolución MCI se almacenó a 5 grados Celisius durante un periodo de 29 horas.

Microfiltración fría del aislado de caseína micelar:

Los 27 m³ de la disolución MCI almacenada se sometieron a microfiltración continua utilizando membranas enrolladas en espiral de 6" y 8" del tipo FR6338 de Synder Filtration, Vacaville, California, EE.UU, con 46 mil espaciadores y un valor de corte nominal de 800.000 Daltons. El equipamiento de microfiltración continuo presentaba cinco bucles. El área total de la membrana era de 1399 m². La filtración se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: La temperatura se mantuvo a 7 grados Celsius, y la presión media se mantuvo a 0,58 bares a través de los dos elementos de filtro con una presión de alimentación de 0,15 bares. El permeato de la microfiltración se dirigió hacia un proceso de ultrafiltración paralelo, y el permeato del proceso de ultrafiltración se dirigió de nuevo de forma continua hacia el retentado de filtración para llevar a cabo la diafiltración del retentado de microfiltración. Se llevó a cabo el 469% de la diafiltración, es decir, el volumen del permeato de ultrafiltración empleado para la diafiltración era 4,69 veces el volumen de la disolución MCI suministrado en el proceso de microfiltración. El flujo medio fue aproximadamente 8 L/m²/h. El retentado de microfiltración procesado fue recogido continuamente en un tanque.

Concentración del permeato de la MF Fría mediante utrafiltración:

Se recogió el permeato del proceso de microfiltración en un tanque de alimentación para el proceso continuo de ultrafiltración. Simultáneamente con el proceso de microfiltración, la ultrafiltración se llevó a cabo con membranas enrolladas en espiral de 6" del tipo HFK-328 6338 de Koch Membrane Systems, Wilmington, Massachusetts, EE.UU, con 31 mil, 46 mil y 80 mil espaciadores y un valor de corte nominal de 5.000 Daltons. En el equipamiento de microfiltración continuo se presentaban cuatro bucles. El área total de la membrana era de 1331 m². La filtración se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: La temperatura se mantuvo a 7 grados Celsius, y la presión media se mantuvo de 2,0 a 5,0 bares a través de los tres elementos de filtro para suministrar el permeato de ultrafiltración hasta el proceso de microfiltración con el mismo flujo al que se eliminó el permeato del proceso de microfiltración. El retentado del proceso de ultrafiltración se sometió continuamente a diafiltración usando agua desmineralizada. El flujo medio fue de aproximadamente 15 L/m²/h. Al final de la filtración, se recogieron 1400 litros de retentado de ultrafiltración.

Pasteurización y secado por pulverización del permeato-UF que contiene beta-caseína:

Los 1400 litros del retentado de ultrafiltración se concentraron mediante ósmosis inversa (RO, de sus siglas en inglés) empleando condiciones de operación estándar. Se obtuvieron 880 litros del concentrado RO, y el contenido proteico en el retentado RO era 12%. El retentado RO se sometió a pasteurización a 72 grados Celsius durante 15

segundos. Después de la pasteurización, se llevó a cabo una etapa de secado por pulverización de la disolución proteica empleando parámetros estándar incluyendo una temperatura de entrada de aire de 180 grados Celsius y una temperatura de salida de aire de 88 grados Celsius. Se obtuvo un polvo de 125 kg.

- 5 El contenido de proteína en el polvo se midió como 83% (gramo de proteína por 100 gramos de polvo), y el contenido de materia seca en el polvo se midió como 96% (gramo de materia seca por 100 gramos de polvo). El contenido de beta-caseína del polvo se analizó como se describe en el Ejemplo 3 y se determinó a 76% (gramo de beta-caseína por 100 gramos de proteína).

Ejemplo 3 – Análisis de la pureza de beta-caseína y del perfil aminoácido.

Determinación de la pureza de beta-caseína

- 10 La pureza de beta-caseína en los productos en polvo se determinó mediante cromatografía líquida en alta resolución (HPLC, de sus siglas en inglés) en fase inversa como se indica por Bobe et al. empleando una columna C18 de Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EE.UU, y un sistema de disolvente agua/acetonitrilo. Antes del análisis, la muestra se disuelve en 6M de urea y 20 mM de ditioireitol con el propósito de obtener una disolución proteica reducida y desnaturalizada.

- 15 Determinación del perfil aminoácido

El perfil aminoácido de los productos en polvo se analizó mediante análisis aminoácido estándar.

Ejemplo 4 – Análisis por electroforesis capilar y comparación con la técnica anterior

- 20 El polvo enriquecido en beta-caseína producido en el Ejemplo 1 se comparó con un producto de beta-caseína disponible comercialmente. Esta comparación se llevó a cabo mediante el análisis de dos productos por electroforesis capilar.

Los electroferogramas obtenidos se muestran en la Figura 4 (producto del Ejemplo 1) y en la Figura 5 (producto de la técnica anterior), y los picos individuales conocidos se expresan en la Tabla 1.

Tabla 1: Denominación de los picos en las Figuras 4 y 5.

Pico ID	Componente
IS	Patrón interno
1	Alfa-lactoalbúmina
2	Beta-lactoglobulina
3	Alfa-S2-caseína
4	Alfa-S1-caseína (variante1)
5	Alfa-S1-caseína (variante2)
6	Beta-caseína (variante 1)
7	Beta-caseína (variante 2)
8	Beta-caseína (variante 3)

- 25 En general, los picos en el electroferograma para el producto disponible comercialmente son mucho más amplios que los picos en el electroferograma para el producto del Ejemplo 1. Esto demuestra que ha ocurrido una modificación significativa de las proteínas en el producto disponible comercialmente. Los picos en el electroferograma para el producto del Ejemplo 1 son marcados, lo que no demuestra o demuestra sólo, un grado de modificación insignificante. Además, la razón de otras caseínas frente a beta-caseína es mucho más grande para el producto disponible comercialmente comparado con el producto del Ejemplo 1, indicado mediante el gran pico para
- 30 alfa-S1-caseína (variante 1) en el electroferograma para el producto disponible comercialmente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición que contiene beta-caseína, el método comprende las etapas de:
 - a) pre-calentar la leche ajustando la temperatura de pre-calentamiento (T_{pre}) en el intervalo de 20-60 grados Celsius con un tiempo de mantenimiento en el intervalo de 1 minuto – 1 hora, proporcionando así una leche caliente,
 - b) someter a la leche caliente a microfiltración (MF), proporcionando así un primer permeato MF y un primer retentado MF,
 - c) opcionalmente, someter al primer retentado MF a MF-diafiltración,
 - d) ajustar la temperatura de una primera composición derivada del primer retentado MF a una temperatura fría ($T_{fría}$) en el intervalo de 0-15 grados Celsius y, mantener la temperatura de la primera composición dentro de dicho intervalo durante una duración ($t_{frío}$) de al menos 0,5 horas, obteniendo así una primera composición fría,
 - e) someter a la primera composición fría a MF, obteniendo así un segundo retentado y un segundo permeato, cuyo segundo permeato está enriquecido en lo que respecta a beta-caseína, y
 - f) opcionalmente, someter el segundo retentado MF a MF-diafiltración,
 - g) opcionalmente, someter a la segunda composición derivada del segundo permeato a una o más de otras etapas de procesamiento, por ejemplo a otra purificación y/o etapas de concentración,

proporcionando de esta manera la composición que contiene beta-caseína.
2. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el filtro para la MF de la leche caliente, tiene un tamaño de poro nominal en el intervalo de 0,005-0,3 micras.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la temperatura del alimento durante la MF de la leche caliente se mantiene a una temperatura (T_{wMF}) de al menos 20 grados Celsius.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la temperatura del alimento y del flujo de retentado se mantiene dentro del rango de temperatura de la MF caliente durante al menos parte de la MF-diafiltración.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos parte de la MF-diafiltración implica el uso de un diluyente que tiene una concentración de Ca^{2+} de al menos 0,01 g/kg.
6. El método según la reivindicación 5, en donde el primer diluyente tiene un pH en el intervalo de 6-8.
7. El método según la reivindicación 5 ó 6, en donde el primer diluyente comprende ultrafiltración (UF) del permeato de la leche o suero.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la primera composición comprende una cantidad total de caseína de al menos 90% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición y una cantidad total de proteína de suero lácteo de como máximo 10% (p/p) relativa a la cantidad total de proteína de la primera composición.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la primera composición comprende una cantidad total de beta-caseína de al menos 20% (p/p) relativa a la cantidad total de caseína.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el método comprende la etapa c) y en donde la primera composición comprende diafiltración del retentado o un concentrado proteico del mismo.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la primera composición se mantiene dentro del intervalo de temperatura fría durante al menos 1 hora antes de la etapa e).
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la primera composición enfriada tiene una temperatura en el intervalo de 3-12 grados Celsius.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende la etapa g).
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa g) implica incrementar el porcentaje de peso de beta-caseína de la segunda composición hasta al menos 50% (p/p) expresado en peso seco.

15. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa g) implica incrementar el contenido de sólidos de la segunda composición hasta al menos 5% (p/p).
16. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración de la etapa g) implica uno o más procesos que se seleccionan del grupo que consiste en ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, evaporación, secado por pulverización y liofilización.

5

Fig. 1

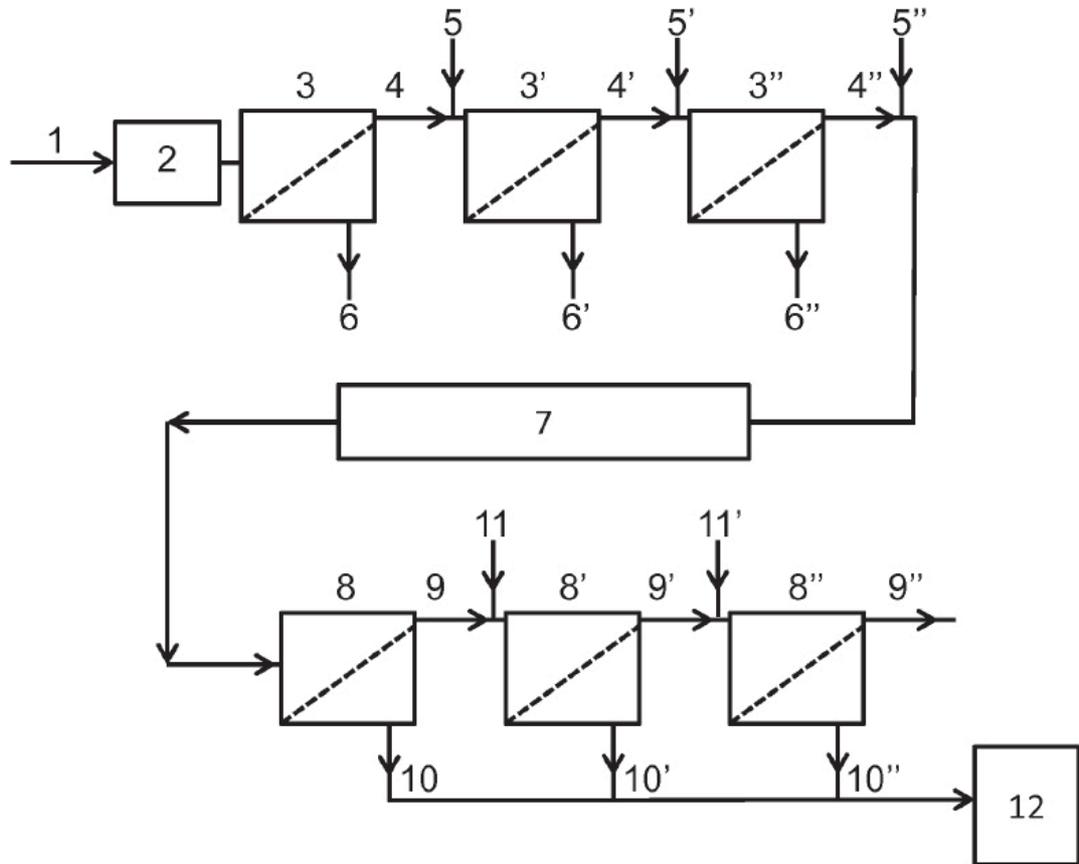


Fig. 2

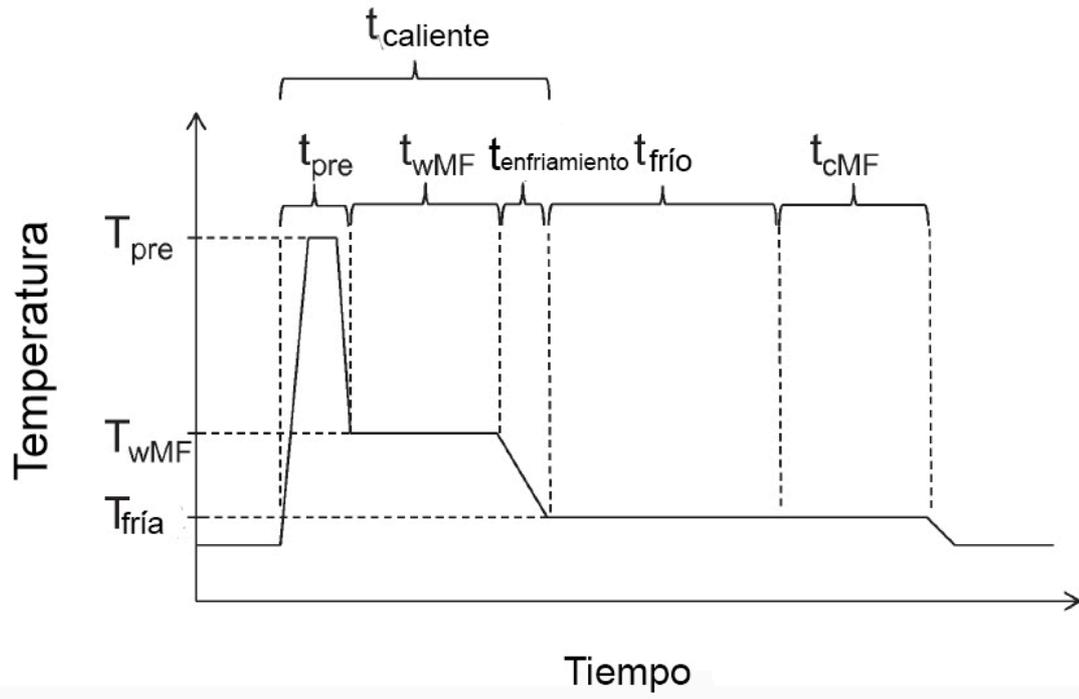


Fig. 3

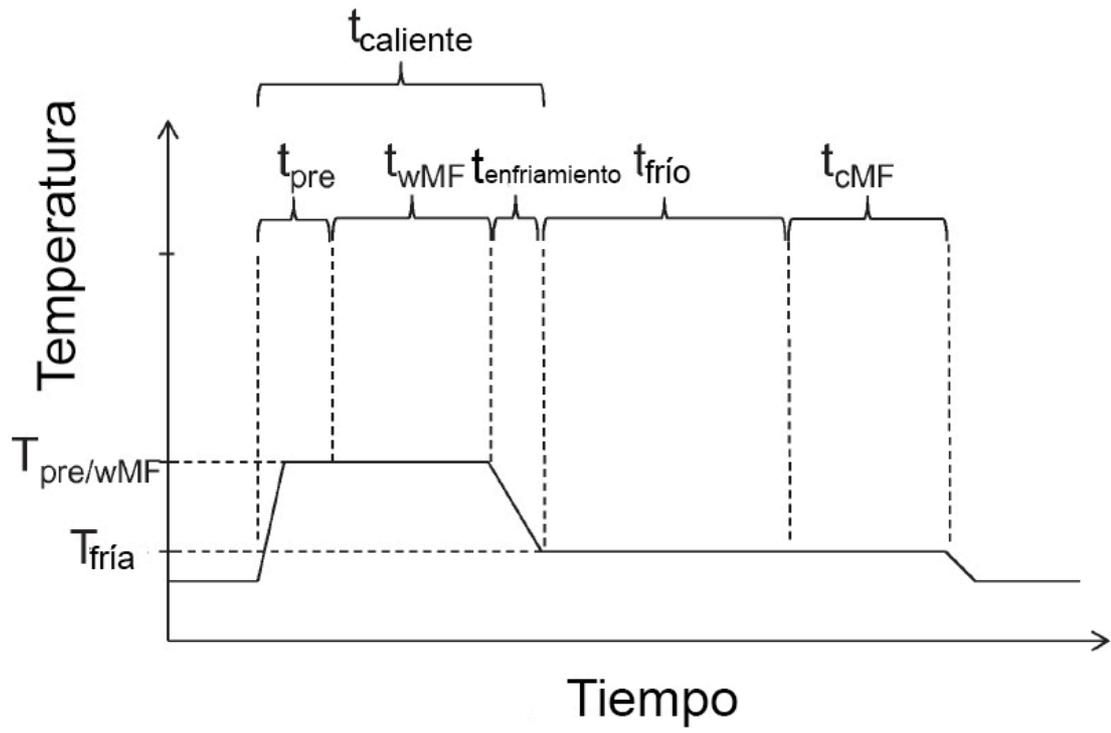


Fig. 4

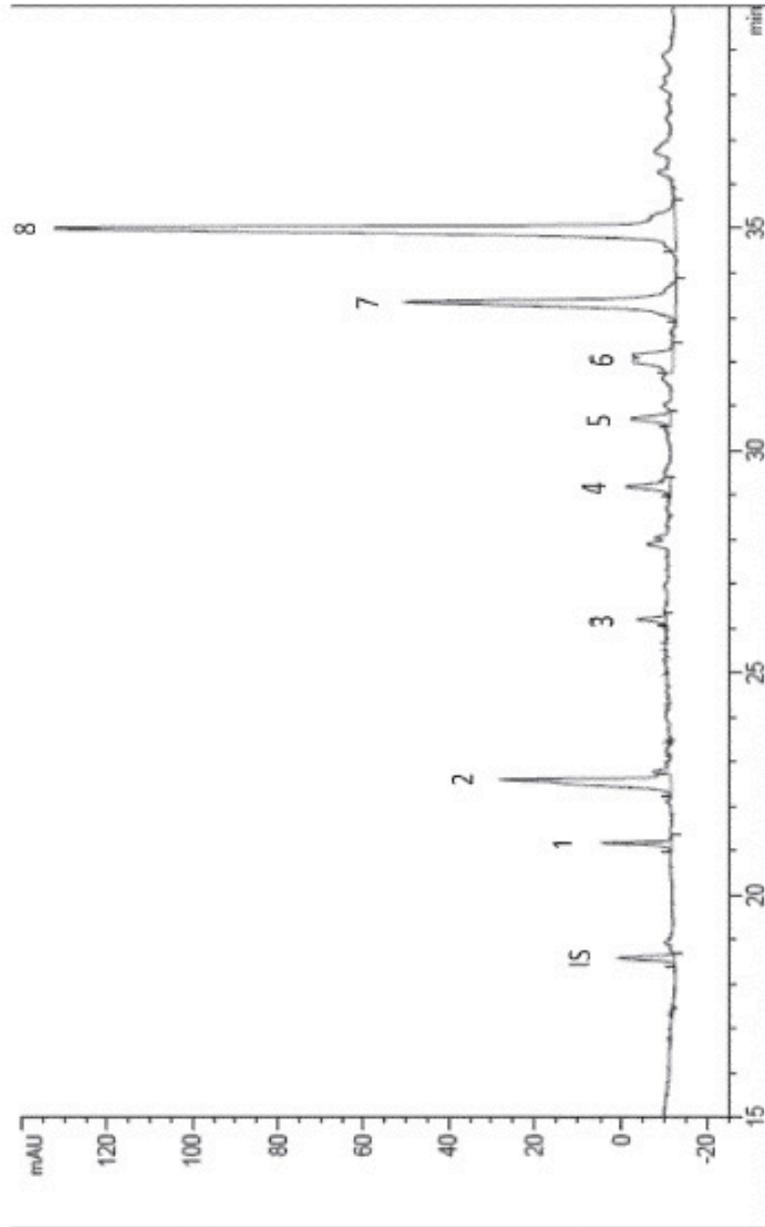


Fig. 5

