

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 164**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/142** (2006.01)

**A23C 9/152** (2006.01)

**A23C 19/05** (2006.01)

**A23J 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2013 PCT/EP2013/062407**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2013 E 13733965 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2861080**

54 Título: **Productos lácteos con un aumento de la unión del agua**

30 Prioridad:

**15.06.2012 DK 201270334**

**22.06.2012 EP 12173179**

**19.10.2012 EP 12189320**

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

**17.01.2018**

73 Titular/es:

**ARLA FOODS AMBA (100.0%)**

**Sønderhøj 14**

**8260 Viby J, DK**

72 Inventor/es:

**SØRENSEN, HANNE THEIL;**

**HOLST, HANS HENRIK y**

**KØNIGSFELDT, PREBEN BUSCH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 650 164 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Productos lácteos con un aumento de la unión del agua

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un novedoso concentrado de caseína modificada que tiene una elevada capacidad de unión al agua, a un proceso para preparar un concentrado de caseína modificada y a un novedoso queso o producto lácteo.

10

**Antecedentes de la invención**

La caseína es la proteína dominante en la leche de bovino y representa aproximadamente el 80 % de la proteína total. La leche desnatada comprende aproximadamente el 3,5 % de proteínas, de las cuales la caseína representa aproximadamente el 2,8 % y las proteínas séricas representan aproximadamente el 0,7 %. La caseína es relativamente hidrófoba y por tanto muy poco soluble en agua. La caseína se encuentra en leche como una suspensión de partículas, las micelas de caseína, que tienen partes hidrófilas que residen en la superficie. Las caseínas de las micelas se mantienen juntas mediante iones de calcio e interacciones hidrófobas. Las enzimas implicadas en la coagulación de la leche actúan sobre la superficie de las micelas al igual que otras conversiones de los constituyentes lácteos.

15

20

La quesería tradicional, que convierte la leche en requesón, comprende normalmente la desestabilización de las micelas de caseína mediante la adición de bacterias acidolácticas (BAL) y enzimas de cuajo seguida por tratamiento posterior, maduración, etc. La calidad, textura y diversidad del queso final depende de la leche de partida, del procesamiento de la leche, y de la tecnología de la fabricación de queso. Son parámetros importantes de la calidad del producto final, la estructura y el contenido de agua. El control del pH y del calcio en la leche y en el producto final, es importante para dichos parámetros.

25

En la fabricación tradicional de queso, tiene lugar una concentración de la proteína en la cuba de queso como consecuencia de la sinéresis y de la presión posterior. La etapa de concentración de la producción de queso puede sustituirse alternativamente por el uso de leche filtrada con membrana. La concentración se puede llevar a cabo mediante ultrafiltración (UF) o mediante microfiltración (MF). La caseína y las proteínas del suero se concentran proporcionalmente mediante UF, mientras que las proteínas del suero se eliminan con el permeado durante la MF. La microfiltración posibilita de esta manera concentrar la fracción de caseína en la leche desnatada para agotar el retenido de las proteínas del suero. Sin embargo, la estructura del queso MF no se comprende bien y, para diseñar un proceso para la producción de queso MF, es crucial comprender las interacciones entre la proteína, el agua y el calcio tanto en el concentrado como en el queso.

30

35

El queso MF es un campo de investigación relativamente nuevo y solamente existen unos pocos informes que describan las propiedades del queso MF. La funcionalidad y la estructura se han investigado por Ardisson-Korat & Rizvi, 2004; Brandsma y Rizvi, 2001 a, b; Neocleous, Barbano, y Rudan, 2002a, b; Larsson, 2004; Nelson y Barbano, 2005. Las características fisicoquímicas del retenido UF se han estudiado en algún detalle por ejemplo, por Bienvenue, Jimenez-Flores, y Singh, 2003; Fox y McSweeney, 1998; Karlsson, 2005, aunque las características fisicoquímicas del concentrado MF siguen estando poco investigadas.

40

45

Solanki y Rizvi (2001) descubrieron que la filtración con membrana aumentaba la concentración de fosfato y por tanto la capacidad tampón. Señalan también que el aumento en la concentración de proteínas (caseína principalmente) es el resultado de la utilización de la MF y que la reducción paralela en la proteína sérica alteró de forma importante las propiedades fisicoquímicas del retenido de la leche desnatada, que presentó un comportamiento pseudoplástico en una concentración de entre 11 y 17 % de sólidos. La propia fracción volumétrica depende de factores tales como el grado de hidratación de la proteína además del contenido y composición de las proteínas. El retenido a un pH mayor (pH 6,5 frente a pH 6,0) presentó un mayor contenido de sólidos, pero de forma más importante, una mayor cantidad de proteínas y cenizas, lo que refleja una mayor densidad. Solanki y Rizvi (2001) descubrieron también que el contribuyente principal a la viscosidad era la caseína y la viscosidad del retenido se redujo por tratamientos que disminuyeron la estabilidad de la caseína (adición de NaCl o citrato, reducción del pH) y por consiguiente alteraron la conformación estructural de las micelas de caseína.

50

55

El documento US 2003/0077357 describe una microfiltración de leche desnatada usada en fabricación de queso que implica una reducción del pH efectuada añadiendo acidulante y/o un cultivo iniciador a la leche desnatada/retenido a procesar produciendo por tanto una cantidad aumentada de calcio en el retenido y proporcionado una relación de calcio a proteína en el retenido deseada para la fabricación del queso. El valor del pH durante el proceso de microfiltración está en el intervalo de 5,8 a 6,4.

60

El documento WO 2012/110706 se refiere a un método para producir queso que comprende someter la materia prima láctea a microfiltración y preacidificación para producir un concentrado de caseína acidificada, en el que la microfiltración se lleva a cabo antes que la preacidificación, o de manera simultánea, concentrando el concentrado

65

de caseína acidificado para producir un prequeso concentrado completo. El concentrado acidificado tenía un valor de pH de 5,7.

5 Harte et al (Innovative Food Science and Emerging Technologies 9 (2008) 1-8) describen la perturbación y sedimentación de las micelas de caseína y los aislados de micelas de caseína con homogeneización a alta presión. La leche desnatada se somete a microfiltración y homogeneización a alta presión a un valor de pH ajustado de 6,7. HPH dio como resultado el aumento del tamaño de partículas y la agregación de micelas de caseína a presiones elevadas del orden de 250 MPa.

10 Govindasamy-Lucey et al. (use of cold microfiltration retentates produced with polymeric membranes for standardization of milks for manufacture of pizza cheese, Journal of dairy science, American Dairy Science Association, US, vol 90, n.º 10, 1 de octubre de 20107, páginas 4552-4568, XP026956200) divulga la microfiltración de retentatos lácteos acidificados a un pH de 6,4 o 6,3 y su uso en la fabricación de queso.

15 Roach Et Al. (Disruption and sedimentation of casein micelles and case isolates under high-pressure homogenization, Innovative Food Science and Emerging Technologies, vol. 9, n.º 1, 26 de noviembre de 2007, páginas 1-8, XP022361823) divulga la preparación de un retenido MF seguida por acidificación para alcanzar un valor de pH de 6,7 y divulga además la aplicación de la homogeneización a alta presión a una presión en el intervalo de 100 MPa a 350 MPa.

20

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un concentrado de caseína modificada que tiene una elevada capacidad de unión al agua, tal como de al menos 1,5 g H<sub>2</sub>O/g de caseína. Esta mayor capacidad de unión al agua de la caseína permite un producto de queso con una alta capacidad de unión.

25

La invención se refiere a un concentrado de caseína en el que la proteína láctea comprende como máximo un 10 % de proteína sérica, y en el que las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro; y en el que el concentrado tiene un pH por debajo de 6,7 y una concentración de calcio de al menos 5 mg/ml en la fase sérica.

30

Para obtener el producto concentrado de caseína, la leche se trata en un proceso. Un producto intermedio para el concentrado de este proceso es una composición de caseína que comprende un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica. En dicho aspecto, la invención se refiere a una composición de caseína que comprende proteína láctea y como máximo un 10 % de proteína sérica, en el que las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro; y en el que la composición comprende un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica.

35

40 La invención se dirige a un concentrado de caseína mediante un método que comprende las etapas de

- (i) tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida
- (ii) añadir un ácido desplazando el equilibrio entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica y disminuir el pH del retenido de caseína para estar en el intervalo de 4,5 y 6,0
- (iii) tratar el retenido de caseína acidificada (ii) en un proceso dinámico de alta cizalladura a una presión de al menos 300 MPa.

45

La invención se refiere además a un proceso de preparar un concentrado de caseína que comprende dichas etapas.

50

La presente invención se refiere también a un proceso de preparar un producto de queso que comprende las etapas de

- (i) tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida
- (ii) añadir un ácido desplazando el equilibrio entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica y disminuir el pH del retenido de caseína para estar en el intervalo de 4,5 y 6,0
- (iii) tratar el retenido de caseína acidificada (ii) en proceso dinámico de alta cizalladura a una presión de al menos 300 MPa
- opcionalmente, mezclar el producto con leche natural
- llevar a cabo un proceso de queso.

55

60

### Breve descripción de los dibujos

65 La invención se ilustra adicionalmente por los dibujos, en los que

La Figura 1 muestra la viscosidad aparente (Pa s) en función de la velocidad de cizalladura ( $1 \text{ s}^{-1}$ ) para las muestras con un 4 % de caseína. Las muestras de MCI a pH 6,6 se marcan con un triángulo, muestras sin homogeneización ( $\Delta$ ) y muestras con homogeneización ( $\blacktriangle$ ). Las muestras de MCI a pH 5,8 se marcan con un cuadrado, muestras sin homogeneización ( $\square$ ) y muestras con homogeneización ( $\blacksquare$ ) (se presentan los datos del experimento A).

La Figura 2 muestra la viscosidad aparente (Pa s) en función de la velocidad de cizalladura ( $1 \text{ s}^{-1}$ ) para las muestras con un 8 % de caseína. Las muestras de MCI a pH 6,6 se marcan con un triángulo, muestras sin homogeneización ( $\Delta$ ) y muestras con homogeneización ( $\blacktriangle$ ). Las muestras de MCI a pH 5,8 se marcan con un cuadrado, muestras sin homogeneización ( $\square$ ) y muestras con homogeneización ( $\blacksquare$ ) (se presentan los datos del experimento A).

La Figura 3 muestra el coeficiente de difusión medido ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) de moléculas de agua en muestras con un 4 % de caseína. Las muestras de MCI que se han homogeneizado se marcan con barras negras, mientras que las muestras con homogeneización se marcan con barras blancas (se presentan los datos del experimento A).

La Figura 4 muestra el coeficiente de difusión medido ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) de moléculas de agua en muestras con un 8 % de caseína. Las muestras de MCI que se han homogeneizado se marcan con barras negras, mientras que las muestras con homogeneización se marcan con barras blancas (se presentan los datos del experimento A).

La Figura 5 muestra el diámetro hidrodinámico promedio z (nm) de las micelas de caseína para muestras con un 4 % de caseína procedentes de dos experimentos independientes (coloreados respectivamente en blanco y negro).

La Figura 6 muestra el diámetro hidrodinámico promedio z (nm) de las micelas de caseína para muestras con un 8 % de caseína procedentes de dos experimentos independientes (coloreados respectivamente en blanco y negro).

La Figura 7 muestra los datos de dispersión SAXS del MCI con un 8 % de caseína. Las muestras de MCI a pH 6,6 se marcan en gris y las muestras a pH 5,8 en negro. Las muestras con homogeneización se marcan con líneas sólidas y las muestras sin homogeneización se marcan con líneas punteadas (se presentan los datos del experimento B).

La Figura 8 muestra los datos de dispersión SAXS del MCI con un 8 % de caseína. Las muestras de MCI a pH 6,6 se marcan en gris y las muestras a pH 5,8 en negro. Las muestras con homogeneización se marcan con líneas sólidas y las muestras sin homogeneización se marcan con líneas punteadas (se presentan los datos del experimento B).

La Figura 9 ilustra la fase sérica que se puede separar tras la ultracentrifugación de las muestras con un 4 % de caseína como indicación de la capacidad de unión al agua.

La Figura 10 ilustra la fase sérica que se puede separar tras ultracentrifugación de las muestras con un 8 % de caseína como una indicación de la capacidad de unión al agua.

#### Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción detallada de la invención, se hace referencia a los ejemplos, incluyendo las tablas y figuras.

La presente invención se refiere a concentrados de caseína modificada adecuados para fabricar queso y otros productos lácteos de una manera alternativa a los procesos tradicionales. Se describe la manera en la que los cambios en la acidificación y la homogeneización a alta presión afectan a la estructura y propiedades del concentrado MF. El valor del pH y la homogeneización a alta presión son fundamentales en el proceso de la invención para la fabricación del queso MF.

La presente invención aborda además la capacidad del calcio de crear estructura y de conseguir la unión al agua en los productos lácteos y el queso. La presente invención se refiere además a alteraciones en el proceso de producción del queso, tales como el control del nivel del calcio en el material de partida y en el producto final y el efecto resultante en la microestructura.

En consecuencia, el objetivo técnico de la invención es proporcionar un novedoso concentrado de caseína modificada para fabricar queso u otros productos lácteos, que muestra una unión del agua mejorada en el concentrado de caseína y en el producto final y que tiene las mismas propiedades funcionales o mejoradas que el queso conocido. Otro objetivo es proporcionar queso u otros productos lácteos mediante un proceso que es alternativo a los procesos tradicionales de fabricación de queso.

De manera sorprendente, combinando las etapas de 1) reducción de la cantidad de proteínas séricas, 2) modificación del equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica, y 3) tratamiento dinámico mediante alta cizalladura, se obtienen micelas de caseína que son diferentes de las micelas en la leche no tratada. Las micelas obtenidas son "micelas de caseína de tamaño reducido", lo que se pretende que signifique que son más pequeñas que las micelas convencionales, que tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro mientras que las micelas de caseína convencionales varían normalmente de tamaño entre 250 nm y 500 nm.

El contenido de ion calcio, que junto con las interacciones hidrófobas mantienen juntas las micelas de caseína, se modifica en el proceso de la invención (etapa 2), dejando por lo tanto micelas modificadas lábiles para el tratamiento de alta cizalladura, y el tratamiento de alta cizalladura disgrega además las micelas produciendo las micelas de caseína de tamaño reducido. Las micelas de caseína resultantes tienen una capacidad potenciada de unión al agua, con un área superficial total más grande de proteína caseína. Es una hipótesis de no unión que las micelas resultantes sean más fácilmente accesibles a las enzimas, lo que puede conducir a una madurez acelerada del queso.

La unión al agua, y por tanto, el contenido de agua en el concentrado de caseína modificada final y en el queso o producto lácteo fabricado a partir del concentrado o composición de la invención son elementos determinantes en la calidad del producto y para el procesamiento adicional del concentrado a por ejemplo, un queso. El concentrado de caseína de la invención y los productos obtenidos mediante el proceso de la invención tienen sorprendentemente mayor capacidad de unión al agua que la caseína en queso preparado tradicionalmente y en el propio queso. Tal como se muestra, la composición de caseína de la invención, cuando se procesa para producir queso, puede mostrar una unión al agua que puede ser hasta un 30 % mayor que la unión al agua en el queso convencional.

Se pretende que el término "leche" signifique leche animal reciente, por ejemplo, leche de bovino o de cabra, que opcionalmente se ha pasteurizado o bien leche en polvo que se ha rehidratado.

Se pretende que el término "procedimiento dinámico de alta cizalladura" signifique empujar el producto a alta presión a través de un canal o cámara estrecha, acelerándolo de esta forma hasta una velocidad muy alta.

La composición de caseína de la invención se refiere al producto intermedio en el proceso de la invención que comprende un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica. Una vez que el equilibrio se ha desplazado desde las micelas hasta la fase sérica, el producto se denomina como concentrado de caseína.

La composición de caseína puede proceder de cualquier forma o tipo de leche, incluyendo leche desnatada, leche semidesnatada, leche con contenido de grasa natural o leche entera.

En una realización de la invención, se prepara un concentrado de caseína según un método que comprende las etapas de

- (i) tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida
- (ii) añadir un ácido desplazando el equilibrio entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica y disminuir el pH del retenido de caseína para estar en el intervalo de 4,5 y 6,0
- (iii) tratar el retenido de caseína acidificada (ii) en un proceso dinámico de alta cizalladura a una presión de al menos 300 MPa.

Una composición de caseína de la invención comprende normalmente como máximo un 10 % de proteína sérica y tiene una capacidad de unión al agua de al menos 1,5 g H<sub>2</sub>O/g de caseína.

Una composición de caseína de la invención comprende normalmente micelas de caseína que tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro.

El método puede comprender además las etapas de ultrafiltración del permeado procedente de dicha microfiltración y la diafiltración de dicho retenido de microfiltración con el permeado de ultrafiltración.

En un ejemplo, la composición de caseína comprende proteína láctea y como máximo un 10 % de proteína sérica, en el que las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro; y en el que la composición comprende un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica.

La composición o concentrado de caseína puede comprender de 0,5 % a 50 % de proteína láctea. Normalmente, el contenido de proteína láctea en la composición es de aproximadamente 1 % a 30 %, tal como de 2 % a 25 %, tal como de 3 % a 20 %. En una realización de la invención, la composición de caseína puede ser un concentrado que comprende de 4 a 8 % de caseína.

En una combinación de características preferidas, la composición de caseína o el concentrado de caseína comprende preferentemente de 3 a 20 % de proteína láctea y como máximo un 5 % de proteína sérica.

5 En una realización adecuada, el concentrado de caseína comprende proteína caseína, como máximo un 10 % de la proteína láctea es proteína sérica, las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 175 nm de diámetro; y el concentrado de caseína tiene un valor de pH por debajo de 6,7, tal como por debajo de 6,5, normalmente por debajo de 6,2. El concentrado de caseína adecuado comprende al menos un 3 % de caseína, tal como al menos un 4 %, normalmente, aproximadamente de 3 al 25 % de caseína.

10 Como se ha indicado, se consigue una unión al agua mejorada proporcionando un concentrado de caseína que tiene 1) una reducción de la cantidad de proteínas séricas, y 2) una modificación del equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica con el fin de obtener "micelas de caseína de tamaño reducido". Los anteriores estudios indican que el pH tiene un papel en el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica. Como se ha indicado, la composición de la  
15 invención comprende un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica. Normalmente, el agente se selecciona entre el grupo que comprende un ácido, un intercambiador de aniones y un agente quelante natural.

20 Como se muestra en los estudios adjuntos, un ácido es un agente muy adecuado capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica. El ácido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en un ácido orgánico o inorgánico y un ácido producido mediante microorganismos. Un ácido orgánico puede ser mono, di y triácidos. El agente puede ser un ácido seleccionado entre ácido láctico y ácido cítrico, preferentemente ácido cítrico.

25 Como alternativa, el agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica puede ser un intercambiador de aniones o un agente quelante natural, tal como un agente quelante de calcio. En consecuencia, el agente puede seleccionar entre hexametáfosfato, oxalato, citrato, ortofosfato y clorofila.

30 La proteína láctea del concentrado de caseína puede comprender como máximo un 10 % de proteína sérica, y tiene micelas de caseína con un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro. El concentrado tiene un pH por debajo de 6. La concentración del calcio en la fase sérica es al menos de 0,45 mg/ml.

35 La composición de caseína y el concentrado pueden tener micelas de caseína diferentes de las micelas convencionales. Una composición y concentrado de caseína de la invención tiene micelas con un tamaño promedio de menos de 120 nm, tal como menos de 100 nm de diámetro. El tamaño de las micelas se mide por medio de la dispersión de luz dinámica (DLS).

40 Calculado de otra forma, en una realización preferida, al menos un 90 % de las micelas tienen menos de 250 nm de diámetro, tal como menos de 200 nm, tal como menos de 175 nm menos de aproximadamente 150 nm. Más preferentemente, al menos un 95 % de las micelas tienen menos de 200 nm de diámetro, tal como un 95 % de las micelas tienen un diámetro de menos de 175 nm o menos de aproximadamente 150 nm.

45 En una combinación de realizaciones preferidas, la composición o concentrado de caseína comprende de 3 a 20 % de proteína láctea en la que al menos un 90 % de las micelas tienen menos de 250 nm de diámetro y la composición comprende como máximo un 5 % de proteína sérica.

50 Normalmente, en el concentrado de caseína, la proteína láctea comprende como máximo un 10 % de proteína sérica; las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 200 nm, tal como menos de 150 nm de diámetro; y el pH es de 5,0 a 6,6. Un importante aspecto de la invención se refiere al concentrado de caseína. El contenido de calcio sérico en el concentrado de caseína es normalmente significativamente mayor que en la leche no tratada, tal como al menos un 50 % mayor, y puede ser al menos un 100 % mayor o al menos un 200 % mayor que en la leche desnatada no tratada. Como puede observarse en la Tabla 3, la acidificación conduce a un concentrado de caseína con un alto contenido de calcio en la fase sérica.

55 Como se ha indicado, se puede usar ácido para desplazar el equilibrio entre el calcio unido en las micelas de caseína hacia la fase sérica. De esta manera disminuye el pH. En consecuencia, el concentrado tiene un pH por debajo de 7 y una concentración de calcio de al menos 5 mg/ml en la fase sérica.

60 El pH es de 4,5 a 6,7, tal como de 5,0 a 6,6, tal como de 5,0 a 6,5, tal como de 5,5 a 6,5, tal como 5,5 a 6,0, tal como 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 y 6,0.

65 Como se ha indicado, el ácido desplaza el equilibrio del calcio hacia la fase sérica, aumentando por tanto el contenido de calcio en la fase sérica en comparación con la leche no tratada. El concentrado de caseína tiene una concentración de calcio de al menos 0,45 mg/ml en la fase sérica, tal como al menos 0,5 mg/ml en la fase sérica, tal como al menos un 0,55 mg/ml, normalmente al menos 0,6 mg/ml. La concentración del calcio en la fase sérica

## ES 2 650 164 T3

puede ser de 0,45 a 1,5 mg/ml, preferentemente de 0,55 a 1,5 mg/ml, tal como de 0,55 a 1,2 mg/ml, tal como entre 0,6 y 1,2 mg/ml en la fase sérica.

5 El contenido de caseína está normalmente entre 4,5 mg/ml y 15 mg/ml, tal como entre 5,0 y 15 mg/ml, tal como entre 5,5 y 12 mg/ml, en la fase sérica, normalmente entre 6 y 12 mg/ml.

10 En una combinación de realizaciones preferidas del concentrado de caseína, la proteína láctea comprende como máximo un 10 % de proteína sérica, las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro, el pH está entre 4,5 y 6,7 y el contenido de calcio en la fase sérica es de 5,0 y 15 mg/ml.

La capacidad de unión al agua es normalmente al menos de 1,5 g de H<sub>2</sub>O/g de caseína en el concentrado de caseína de la invención tal como al menos 1,8 g de H<sub>2</sub>O/g de caseína, al menos 2,0 g de H<sub>2</sub>O/g de caseína o al menos 2.2 g de H<sub>2</sub>O/g de caseína.

15 La capacidad de unión al agua puede medirse en términos de, por ejemplo, coeficiente de difusión del agua, donde un coeficiente de difusión reducido refleja una mayor unión del agua en términos de suero separado en una muestra tras ultracentrifugación, donde un suero menos separado refleja una mayor unión de agua.

20 Los aspectos adicionales se refieren a un producto lácteo que comprende la composición de caseína de la invención y a un queso que comprende la composición de la invención. El queso puede ser de cualquier tipo y puede ser un queso cremoso, queso amarillo, queso blanco, queso mohoso, queso bajo en grasa y queso de tipo pasta hilada.

Un aspecto adicional más puede referirse a un proceso de preparar un concentrado de caseína que comprende las etapas de

25 a. reducir la cantidad de proteínas séricas en un aislado en comparación con la leche de partida; y  
b. modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica tratándolo con un agente adecuado.

30 Como se ha indicado, estas etapas permiten un concentrado que tiene micelas de caseína con un tamaño reducido y un concentrado con mayor capacidad de unión al agua. Sin embargo, se pueden obtener mejoras adicionales mediante un proceso que comprende además la etapa c, concretamente, tratando el producto resultante en un proceso dinámico de alta cizalladura a una presión de al menos 100 MPa.

35 El concentrado de caseína se prepara preferentemente de tal manera que el concentrado acidificado se somete a un proceso dinámico de alta cizalladura llevado a cabo a una presión de al menos 200 MPa, o al menos 240 MPa, preferentemente al menos 250 MPa, tal como al menos 275 MPa, tal como al menos 300 MPa, de manera más preferente a una presión de 300 a 400 MPa.

40 Con el objetivo de conseguir una mejor comprensión de cómo cambian los parámetros de proceso, se investigó un concentrado lácteo microfiltrado fraccionado, tales como la acidificación y la homogeneización a presión ultra alta afectan a la estructura y a las propiedades. Se usó un nuevo modelo de micela de caseína para la dispersión de rayos X con ángulo pequeño (SAXS) para describir los datos SAXS. Los parámetros obtenidos de muestras de un grupo con un pH alto se juntaron independientemente del tratamiento con presión, mientras que las muestras con pH  
45 bajo se separaron claramente dependiendo del tratamiento con presión. Las muestras con pH bajo y tratamiento con presión ultra alta tenían un radio promedio en número más grande ( $\langle R \rangle$ ), una anchura más grande de la distribución por tamaño ( $\sigma_R$ ), una fracción volumétrica más grande ( $\eta$ ) y un factor de escalado más grande entre el radio de interacción y el radio real ( $s$ ) de las micelas, véase la tabla 4, del ejemplo 1.

50 Las viscosidades aparentes (véanse la figura 1 y 2) fueron mayores para las muestras acidificadas homogeneizadas a alta presión en comparación con otras muestras. Cuanto mayor es el contenido de materia seca, se observó un efecto más pronunciado de la acidificación y la homogeneización a presión.

55 A pH 5,8, el coeficiente de difusión del agua fue más rápido para las muestras que no se habían homogeneizado a alta presión en comparación con las muestras que se habían homogeneizado a alta presión. A pH 6,7, sin embargo, no se observó efecto significativo de homogeneización a alta presión. Además, se observó un efecto de pH con coeficientes de difusión más rápidos a pH 6,6 en comparación a pH 5,8, véanse la figura 3 y 4.

60 Las Figuras 5 y 6 muestran los datos de DLS. Se observó un diámetro hidrodinámico promedio  $z$  diferente más grande para las muestras con un 4 % y un 8 % de caseína acidificada a pH 5,8 con y sin homogeneización a alta presión. El efecto de la homogeneización a alta presión es menos pronunciado a pH 6,6, las muestras con un 4 % de caseína mostraron un diámetro hidrodinámico significativamente más pequeño cuando las muestras se homogeneizaron a alta presión que sin homogeneización a alta presión.

65 El proceso puede comprender normalmente las etapas de

- tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida; y
- añadir un ácido para modificar el pH de 5,0 a 6,5,
- tratar el producto resultante en un proceso dinámico a alta cizalladura a una presión de al menos 100 MPa, tal como al menos 200 MPa.

De otra manera, este aspecto se refiere a un proceso para preparar una composición de caseína que tiene una capacidad de unión al agua de al menos 1,5 g de H<sub>2</sub>O/g de caseína, comprendiendo la composición como máximo un 10 % de proteína sérica, mediante un proceso que comprende las etapas de

- tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida
- añadir un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica
- tratar el producto resultante en un proceso dinámico a alta cizalladura a una presión de al menos 100 MPa, tal como al menos 200 MPa.

Se aplican las mismas etapas a un proceso de preparación de una composición de caseína que comprende proteína láctea y como máximo un 10 % de proteína sérica, en el que las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro; y en el que la composición comprende un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica.

Los procesos de la invención comprenden además normalmente las etapas de ultrafiltración del permeado procedente de dicha microfiltración y la diafiltración de dicho retenido de microfiltración con el permeado de ultrafiltración.

El queso que comprende el concentrado de caseína de la invención o el concentrado de caseína obtenible mediante el proceso de la invención puede, por ejemplo, ser un queso del tipo de queso de tipo crema, queso amarillo, queso blanco, queso mohoso, queso bajo en grasa y queso de tipo pasta hilada. El producto lácteo de la invención puede ser, por ejemplo, un ingrediente alimentario funcional, un polvo de caseína o un producto lácteo fermentado.

Se describe además un proceso para preparar un concentrado de caseína modificada en el que la proteína láctea comprende como máximo un 10 % de proteína sérica, y en el que las micelas de caseína tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro; y en el que el concentrado tiene un pH por debajo de 6,7 y una concentración de calcio de al menos 0,45 mg/ml en la fase sérica, tratando leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida

- añadir un agente capaz de modificar el equilibrio químico entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica
- tratar el producto resultante en un proceso dinámico a alta cizalladura a una presión de al menos 100 MPa, tal como al menos 200 MPa.

Se mostró que el tratamiento a alta presión afectaba a las micelas de caseína a pH 5,8, pero no a pH 6,6. Esto indica que es necesaria alguna disociación del fosfato cálcico coloidal a fin de fabricar micelas de caseína propensas a la disociación producida por alta presión. En el nivel macroscópico, los cambios inducidos en las micelas de caseína tras una disminución del pH y el tratamiento a alta presión condujeron a una viscosidad significativamente aumentada. Por lo tanto, el control diligente del pH combinado con la homogeneización a alta presión de los concentrados de MF proporciona posibilidades para el diseño de novedosos quesos basándose en el control de la microestructura de las micelas de caseína.

Se divulga además un proceso de preparación de un concentrado de caseína que comprende las etapas de

- tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida
- añadir un agente capaz de modificar el valor del pH del retenido (opcionalmente tras dilución) a un valor de 5,0 a 6,6,
- tratar el producto resultante en un proceso dinámico a alta cizalladura a una presión de al menos 100 MPa, tal como al menos 200 MPa, tal como al menos 240 MPa, tal como al menos 250 MPa, tal como 300 MPa.

En otra realización la invención se refiere además a un proceso para preparar un producto lácteo en forma de polvo que comprende las etapas anteriormente mencionadas y que comprende además

- opcionalmente, mezclar con leche natural
- llevar a cabo un proceso de formación de polvo tal como un secado mediante pulverización o una liofilización.

Normalmente, la etapa de microfiltración se realiza con membranas que tienen un valor de corte molecular de al menos 100 kDa, a saber, moléculas con un peso molecular de más de 100 kDa o un tamaño de más de 30 nm se retienen en el retenido mediante la membrana. En una realización preferida, las membranas tienen un valor de corte molecular de al menos 800 kDa.

5 El proceso dinámico de alta cizalladura se lleva a cabo a una presión de al menos 100 MPa empujando el producto como un chorro de alta presión a través de un canal/cámara estrecho. Esta presión acelera el producto a una velocidad muy alta, creando por tanto una cizalladura controlada de la caseína y mezclando y combinando el producto para conseguir un producto con micelas de caseína de tamaño reducido y una distribución más uniforme.  
10 En una realización de la invención la presión es al menos de 200 MPa. En una realización adecuada la presión es al menos de 300 MPa, tal como de 300 a 400 MPa. Normalmente, el proceso a alta cizalladura se lleva a cabo a una presión de 100-400 MPa, tal como de 200-350 MPa.

15 En este tratamiento, la leche se conduce a una primera unidad de filtración, que comprende membranas de microfiltración (MF), que retiene micelas de caseína y grasa láctea, mientras que el permeado contiene moléculas más pequeñas tales como proteínas séricas, componentes de nitrógeno no proteico (NNP), lactosa, minerales solubles y agua que pasan a través del microfiltro. Las proteínas séricas pueden concentrarse en una segunda unidad de filtración por membrana que comprende membranas de ultrafiltración (UF). El permeado procedente de las membranas de ultrafiltración que consiste en lactosa, NNP y minerales solubles puede utilizarse en un proceso de diafiltración (DF). En la DF el permeado de UF retorna a la planta de MF, donde se mezcla con el retenido de MF en las diversas etapas para potenciar el agotamiento de las proteínas séricas.  
20

El retenido de UF contiene las proteínas séricas, que quedan retenidas en la membrana de UF. La etapa de UF como parte de la DF se lleva a cabo normalmente con membranas que tienen un valor de corte de entre 1 y 20 kDa.  
25 En una realización preferida, la membrana tiene un valor de corte de 5 kDa. La etapa de DF puede implicar también la adición de agua, permeado de OI (ósmosis inversa) o permeado de NF (nanofiltración). El principal objetivo de la etapa de diafiltración es producir un producto de un aislado de caseína que comprende una cantidad mínima de proteínas séricas.

30 En los procesos para preparar un concentrado de caseína o un producto de queso, respectivamente, se puede añadir calcio.

En el proceso de preparar un producto de queso puede ser conveniente, después del tratamiento dinámico a alta cizalladura, añadir leche natural a fin de aumentar el pH. El valor del pH puede también aumentarse hasta el nivel de la leche natural, a saber, aproximadamente 6,7, para facilitar el proceso tradicional del queso.  
35

El proceso del queso utilizado en el proceso de preparar un producto de queso puede ser cualquiera utilizado tradicionalmente.

40 Se divulga además un concentrado de caseína modificada obtenible mediante el proceso de la invención y un queso obtenible mediante el proceso de la invención.

En consecuencia, en otro aspecto más, la invención se refiere al uso del proceso de la invención para preparar dicho queso y productos lácteos. El queso puede ser de cualquier tipo tal como; queso cremoso, queso amarillo, queso blanco, queso mohoso, queso bajo en grasa y queso de tipo pasta hilada. El producto lácteo puede ser un ingrediente alimentario funcional, una bebida láctea, yogur, un polvo de caseína o un producto lácteo fermentado.  
45

Todas las realizaciones anteriormente mencionadas pueden combinarse de otras maneras de forma que cada realización descrita para los productos, procesos y usos, respectivamente, puede combinarse con otra realización, y aquellas descritas para los productos se pueden aplicar también a los procesos y usos y viceversa.  
50

En general, el proceso de la invención se lleva a cabo de la siguiente manera. La leche pasteurizada o la leche desnatada se trata mediante microfiltración en una unidad de MF (microfiltración) provista de membranas adecuadas. El retenido resultante se concentra de forma discontinua hasta el nivel deseado de caseína. Opcionalmente, se lleva a cabo la diafiltración conduciendo el permeado de MF a una unidad de UF (ultrafiltración) equipada con membranas adecuadas. El retenido de UF resultante se descarta, y el permeado de UF se mezcla con el retenido de la planta de MF. El retenido final de la planta de MF tiene agotada la proteína sérica, y este producto se designa como aislado de caseína micelar (MCI), concentrado de caseína micelar (CCM) o simplemente concentrado lácteo. El producto bien se acidifica como se ha prescrito o bien se añade un agente quelante o se utiliza un intercambiador de iones. El producto se trata también mediante un proceso dinámico de alta cizalladura.  
55  
60

El proceso comprende normalmente una pasterización a baja temperatura opcional (60-80°C, 15 s) de la leche, tal como leche desnatada, y seguido por calentamiento a 50°C. El proceso de MF se lleva a cabo (500 l h<sup>-1</sup>) con un corte de pesos moleculares nominal de aproximadamente 800 kDa. De manera adecuada, se lleva a cabo una pluralidad de diafiltraciones, microfiltraciones y, opcionalmente, una unidad de ultrafiltración (UF). La leche desnatada puede concentrarse de forma discontinua a, por ejemplo, un 4 % y 8 % de caseína. Se puede llevar a  
65

cabo la diafiltración utilizando agua o un permeado de UF. A continuación se acidifican los aislados de caseína hasta un valor de pH de 6,6 a 5,5. La acidificación se lleva a cabo de forma adecuada con ácido cítrico al 20 % (p/p) homogeneizado en un proceso dinámico de alta cizalladura a 200-350 MPa.

5 Los datos mostraron que la relación de queso por gramo de caseína era mayor para el queso preparado a partir de leche MF tratada en un proceso dinámico de alta cizalladura preacidificada, en comparación con leche MF solo preacidificada antes de la preparación de la cuajada. El rendimiento mayor del 35 % se puede ser atribuir a un aumento de la unión al agua en la cuajada basada en la leche, que se ha tratado mediante un proceso dinámico a alta cizalladura a 300 MPa antes de la preparación de la cuajada.

10 Se ha observado que el concentrado lácteo (leche MCI) puede unir más agua, con la condición de que la leche se pretrate de acuerdo con la invención, por ejemplo, con una combinación de acidificación con ácido cítrico a un pH de 5,8 seguida por una homogeneización dinámica a presión ultra alta. El objetivo era examinar si esta unión al agua mejorada se puede transferir a sistemas de queso.

15 La crema añadida a la leche MCI puede precalentarse y a continuación añadir el cultivo iniciador, tras un tiempo de premaduración se añadió el cuajo para obtener la coagulación.

20 El concentrado de caseína puede procesarse adicionalmente en la cuajada del siguiente modo: El producto se calienta a, por ejemplo, 30-50 °C y si es necesario se ajusta el pH. El concentrado se drena para producir la cuajada.

25 Como se observa de la tabla 7 (ejemplo 4) el contenido de materia seca de los quesos de la prueba eran mucho menores que en los quesos de referencia, lo que apoya que el contenido de agua de los quesos de la prueba fueron mayores que los de los quesos de referencia.

30 En la tabla 8, se muestra que los quesos basados en la leche que se ha tratado mediante un proceso dinámico de alta cizalladura obtienen un rendimiento de más del 30 % que los quesos basados en la leche MCI sin tratamiento dinámico de alta cizalladura. En consecuencia, la invención puede referirse a un proceso para la preparación de queso con capacidad de unión al agua potenciada.

La capacidad de unión al agua potenciada puede proporcionar algunas ventajas claras en la fabricación del queso:

- Ahorro de costes: se obtiene un mayor rendimiento de la cuajada del queso a partir de una cantidad de leche de partida dada.
- El consumidor experimenta menos liberación de humedad desde el producto, conocido también como sinéresis en por ejemplo, un queso cremoso.
- Una mejor funcionalidad, tal como la cremosidad en, por ejemplo, un queso cremoso con un contenido bajo de grasa.
- En algunas situaciones, esto posibilita evitar el uso de aditivos o reduce la necesidad.
- Nuevas posibilidades y perspectivas de maduración debido al mejor acceso de las enzimas de maduración.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Concentrado lácteo

#### Propósito

50 El objetivo de los experimentos era conseguir una comprensión de cómo los cambios en los parámetros del proceso, tales como la acidificación y el tratamiento dinámico de alta cizalladura con presión, afectan a la estructura y a las propiedades del concentrado de leche microfiltrada (MF) con una base respectivamente del 4 % y el 8 % de caseína en la leche MF.

#### Materiales y métodos

Preparación de muestras de leche desnatada MF:

60 Leche desnatada pasteurizada a baja temperatura (73°C, 15 s) de Arla Foods se calentó a 50°C. Se llevó a cabo el proceso de MF utilizando una unidad de microfiltración (500 l h<sup>-1</sup>) (Arla Foods, Videbæk, Dinamarca) equipada con 24 membranas FR3B-6338 (Synder, Vacaville, EE.UU.) con un corte nominal de pesos moleculares de 800 kDa y una unidad de ultrafiltración (UF) (Arla Foods, Videbæk, Dinamarca) equipada con 16 membranas HFK328-6338 (Koch, Wilmington, EE.UU.) con un corte nominal de pesos moleculares de 5 kDa. La leche desnatada se concentró de forma discontinua a un 4 % y un 8 % de caseína, respectivamente, y se llevó a cabo la diafiltración utilizando tres volúmenes de permeado UF. La composición (materia seca, proteína, caseína y grasa) del concentrado de MF se midió durante la producción con un Milkoscan™ (Foss electric, Hillerød, Dinamarca). Las dos fracciones de MF se

volvieron a pasteurizar (75°C, 15 s) y se enfriaron a 8 °C utilizando un intercambiador de calor tubular (APV, Silkeborg, Dinamarca). A partir de cada fracción, de 4 % y 8 % de caseína, respectivamente, se prepararon 6 muestras para un tratamiento diferente en un diseño de experimentos (véase la tabla 1) que se creó utilizando Modde 70 (Umetrics, Umeå, Suecia). Cuatro muestras de un aislado de 4 % y 8 % de caseína, respectivamente, se acidificaron a pH 5,8 y dos muestras no se acidificaron, a saber, el pH fue de 6,7. La acidificación se llevó a cabo con ácido cítrico al 20 % (p/p) (Jungbunzlauer, Basilea, Schweiz) y tres de las 4 muestras acidificadas se homogeneizaron en un proceso dinámico a alta cizalladura a 300 MPa (SFP FPG11300, Stansted, Inglaterra). Una muestra a pH 6,7 se homogeneizó (300 MPa) y otra no. El concentrado de MF se vertió en matraces de plástico de 1 l enfriados y almacenados a 5 °C antes del análisis. Se analizaron todas las muestras después de 2-5 días de almacenamiento. En la tabla 1 se resume el diseño experimental.

**Tabla 1:**  
Diseño experimental<sup>a</sup>

| Número | Caseína (%) | pH  | Homogeneización (MPa) |
|--------|-------------|-----|-----------------------|
| P1     | 4, 8        | 6,7 | 300                   |
| P2     | 4, 8        | 6,7 | 0                     |
| P3     | 4, 8        | 5,8 | 300                   |
| P4     | 4, 8        | 5,8 | 0                     |
| P5     | 4, 8        | 5,8 | 300                   |
| P6     | 4, 8        | 5,8 | 300                   |

<sup>a</sup> Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

#### 15 Análisis químico

La leche desnatada de partida y las muestras aisladas de la caseína tratada se analizaron como sigue: El pH se midió directamente utilizando un PHM-240 (Hach Lange, Broenshoej, Dinamarca). Se determinó el contenido de sólidos totales de acuerdo con los métodos de la norma IDF (International Dairy Federation 21 B, 1987). Se determinó la grasa de acuerdo con el método gravimétrico de Röse-Gottlieb a partir del método de la norma IDF (International Dairy Federation 1D, 1996). Se determinó el nitrógeno utilizando el método de la norma IDF (International Dairy Federation 20-3, 2004). Se estimó el contenido de proteínas multiplicando el contenido de nitrógeno por un factor Kjeldahl de 6,38 para la proteína láctea, mientras que el contenido de caseína se determinó multiplicando el contenido de nitrógeno por un factor de 6,36 (van Boekel & Ribadeau-Dumas, 1987). Se determinó el nitrógeno no proteico de acuerdo con el método de la norma IDF (International Dairy Federation 2002). Se determinó el contenido de cenizas de acuerdo con el método de la norma NMKL (Nordisk Metodikkomite for levnedsmidler, 2005). Se llevó a cabo la determinación de la lactosa utilizando un kit de ensayo enzimático de lactosa/D-galactosa de Boehringer Mannheim (Roche, Basilea, Suiza). Se determinaron el contenido total de calcio, magnesio, sodio, cloruro, potasio y fosfato utilizando espectroscopía de plasma acoplado inductivamente (ICP) (Perkin-Elmer, Massachusetts, EE.UU.). Se determinó el contenido de calcio sérico del siguiente modo: se centrifugaron las muestras en primer lugar (170.000g, 4C, 1h) (Beckman Coulter Inc, Brea, EE.UU.) a fin de separar la grasa y la proteína de la fase sérica. Posteriormente, las muestras se filtraron a través de un filtro de corte de 3 K para eliminar las proteínas solubles restantes. Se mezcló 1 ml de sobrenadante con 15 ml de acetato de sodio 0,1 M, y se ajustó el pH de las muestras a 5,9 utilizando hidróxido de sodio. A continuación, las muestras se inyectaron en un cromatógrafo líquido a alta presión (HPLC) provisto de una columna de cambio iónico y un detector de conductividad (Waters, Milford, EE.UU.).

#### *Mediciones reológicas*

Se obtuvieron las curvas de flujo viscométricas del concentrado de MF utilizando un reómetro de tensión controlada (AR 2000, TA Instruments Ltd., New Castle, EE.UU.). El sistema de medición era de cilindros dobles concéntricos (radio externo del rotor 21,96 mm, radio interno del rotor 20,38 mm) y una copa de espacio doble. Se llevaron a cabo las mediciones de viscosimetría con una etapa previa de cizalladura a una velocidad de cizalladura de 1.420 s<sup>-1</sup> durante 5 min tras lo cual se llevaron a cabo las mediciones en el intervalo de velocidad de cizalladura de 1 a 800 s<sup>-1</sup>. Se recogieron 5 puntos de datos por década en modo logarítmico con un estado estacionario de 1 min. por punto de datos. Los 100 g del concentrado de MF se calentaron durante 10 min a 40 °C y se atemperaron durante una hora en un armario calefactor (25°C) antes de la medición de 5 ml de concentrado de MF. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C y se realizaron por duplicado.

#### 50 Resonancia magnética nuclear de campo bajo (LF-RMN)

Se llevaron a cabo mediciones de relajación del concentrado en un analizador de RMN 1H Maran Bench top Pulsed (Oxford Instruments Ltd., Witney, Reino Unido) con una fuerza del campo magnético de 0,47 T, correspondiente a una frecuencia de resonancia de 23,2 MHz. El instrumento se equipó con una sonda de temperatura variable de 18 mm. Se usaron cantidades de 3 ml de concentrado de MF, y la muestra se atemperó durante 1 hora a 25 °C antes de la medición. Se midió la difusión utilizando una secuencia de eco de espín con gradiente de campo pulsado (PGSE). Se llevó a cabo el experimento de difusión (m<sup>2</sup>/s) con un valor  $\tau$  (tiempo entre pulso de 90° y 180°) de 100  $\mu$ s. Se adquirieron los datos como repeticiones de dos barridos. El retraso en la repetición entre dos barridos sucesivos era

de 1 s. Se llevaron a cabo las mediciones de difusión a 25 °Cy se realizaron por duplicado.  
*Dispersión de luz dinámica (DLS)*

Se utilizaron los métodos de dispersión de luz dinámica para estudiar el tamaño de las micelas de caseína individuales. La dispersión de luz dinámica requiere que la concentración de los puntos de dispersión sea suficientemente diluida para que un fotón de luz incidente se disperse solo una vez por la muestra y que no exista interacción individual entre las partículas. Esto es un riesgo si las micelas preservan su estado y características originales cuando se diluyen en tampón (Dalglish y Hallett, 1995). El tamaño de partícula promedio, que se obtiene de la DLS, se expresa como el diámetro hidrodinámico promedio  $z$  de las micelas de caseína. Se midió utilizando un equipo de dispersión de la luz dinámica (MalvernNano S ZEN1600, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). El instrumento utiliza un láser con una longitud de onda de 633 nm y la intensidad de la luz dispersada se detecta a un ángulo de 173°. Se utilizó un análisis de distribución de la función de autocorrelación de la intensidad para derivar un valor y distribución promedios de los coeficientes de difusión, que se convirtieron en diámetros hidrodinámicos utilizando la ecuación de Stokes-Einstein para partículas esféricas. Las muestras se diluyeron 50 veces con una solución de NaCl 10 mM (25°C) para ajustar el requisito y conseguir mediciones de la DLS válidas. Se llevaron a cabo las mediciones de dispersión de la luz a 25 °Cy se iniciaron 5 min después de la dilución con la solución de NaCl. Todos las mediciones se llevaron a cabo por duplicado.

*Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS)*

Se llevaron a cabo las mediciones de SAXS utilizando el instrumento SAXS del Departamento de Química de la Aarhus University (Pedersen, 2004). El instrumento es una versión modificada del NanoStar (Bruker AXS), que es una cámara estenopeica equipada con espejos Göbel para monocromar y enfocar el haz y un detector de gases bidimensional sensible a la posición (HiSTAR). Se registraron los modelos de dispersión en el intervalo de longitudes del vector de dispersión  $q$  ( $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$ , donde  $2\theta$  es el ángulo de dispersión y  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos x)  $0,0034 - 0,211 \text{ \AA}^{-1}$ , utilizando un instrumento de ajuste. El tamaño del haz en la posición de la muestra era de 0,5 mm y la distancia del detector a la muestra era de 106 cm. Las muestras se transfirieron a tubos capilares de cuarzo y se midieron a 25°C. Todas las muestras se midieron con un tiempo de adquisición de tres horas (tres ciclos de una hora cada uno). No se observó efecto dependiente del tiempo. Se corrigieron los espectros brutos respecto al fondo del tampón, el agua y la capilaridad de acuerdo con el procedimiento normalizado. Se convirtieron las intensidades a una escala absoluta y se corrigieron según las variaciones en la eficacia del detector normalizando la dispersión del agua pura (Pedersen, 2004).

*Función de dispersión del modelo de micelas de caseína*

Se han propuesto varios modelos para la estructura de las micelas de caseína en la bibliografía. Se ha desarrollado un nuevo modelo para analizar los datos SAXS experimentales basado en el modelo micelar de la caseína de Hansen et al. (1996) que describe la estructura como micelas esféricas compuestas de submicelas esféricas y el modelo "bola de nieve sucia" más reciente de Keerl et al. (2009). El modelo de caseína propuesto se basa en un conjunto de subestructuras más pequeñas recogidas en un objeto esférico más grande, que describe la micela de caseína global. El modelo está estrechamente relacionado con el modelo original de Hansen et al. (1996) y la versión extendida más reciente de Keerl et al. (2009). La función de dispersión se proporciona por

$$I(q) = N\Delta\rho^2V^2P_{sub}(qR_{sub})[n + n(n - 1)P(qR)] \quad (1)$$

donde  $q$  es la longitud del vector de dispersión,  $N$  es la densidad en número de las partículas de caseína,  $V$  es el volumen de una subestructura de tamaño  $R_{sub}$ , y  $n$  es el número de subestructuras en la partícula completa (micela de caseína) de radio  $R$ . Cuando la densidad de longitud de la dispersión entre las esferas se ajusta a cero, el modelo de las micelas de caseína descrito en el trabajo de Hansen et al. (1996) se recuperó con una pequeña corrección.

$P(q)$ , proporcionada por

$$P(x) = \left[ \frac{3(\sin x - x \cos x)}{x^3} \right]^2 \quad (2)$$

es el factor de forma de una esfera. Para el factor de forma,  $P_{sub}(x)$ , de las subestructuras, se usa una función de dispersión de tipo polinómico modificado:

$$P_{sub}(q, \xi, \sigma) = \frac{1}{1 + (q\xi)^2} \exp(-\sigma^2 q^2) \quad (3)$$

donde  $\xi$  es una longitud de correlación, que aquí debe considerarse como el tamaño de los dominios de la subestructura (es decir,  $R_{sub}$  en la ec.1), que se identifica también en otros estudios. El término exponencial que contiene  $\sigma$  hace que la función decaiga más rápidamente para una  $q$  alta que la función lorentziana típica. Las subestructuras con forma esférica simple (ecuación 2) no se ajustan a los datos experimentales y, por tanto, se introdujo el factor de forma en (3).

Los modelos de dispersión indican algunas correlaciones entre las estructuras, lo se verifica por un pico

característica a una  $q$  alta ( $q \sim 0,07\text{\AA}^{-1}$ ). El primer término en el corchete de (la ecuación 1) está relacionado con las correlaciones de corto alcance entre las subestructuras, mientras que el segundo término es el de las correlaciones de largo alcance relacionadas con el hecho de que las subestructuras conforman partículas mayores. Con una reordenación de (la Ec. 1), la ecuación puede reescribirse en la forma:

$$I(q) = Nn\Delta^2 V^2 P_{\text{sub}}(qR_{\text{sub}}) [1 + (n-1)P(qR_{\text{sub}})] [1 + (n-1)P(qR)] \quad (4)$$

donde  $A$  es ahora simplemente un factor de escala. Suponiendo que las correlaciones entre las partículas se originan a partir de un estado líquido desordenado de las subestructuras, el sistema puede describirse por un factor de estructura  $S(q)$ . Se selecciona el factor de estructura para esferas duras, que es una forma analítica simple y depende solo de dos parámetros, la fracción volumétrica local,  $\eta_{\text{sub}}$ , de las subestructuras contenidas en las esferas grandes, y su radio de interacción  $R_{\text{hs,sub}}$ ; es decir,  $S_{\text{hs}} = S_{\text{hs}}(q, \eta_{\text{sub}}, R_{\text{hs,sub}})$  (Kinning & Thomas, 1984; Percus & Yevick, 1958). Para asegurar la normalización correcta, la ecuación finaliza como:

$$I(q) = AP_{\text{sub}}(qR_{\text{sub}}) [S_{\text{hs}}(q, \eta_{\text{sub}}, R_{\text{hs,sub}}) + (n - S_{\text{hs}}(q=0, \eta_{\text{sub}}, R_{\text{hs,sub}})) P(qR)] \quad (5)$$

Las micelas grandes deben describirse como polidispersas de acuerdo con los datos experimentales. Con la concentración relativa alta de las micelas de caseína, los inventores describirán por tanto los efectos de la concentración resultante de la interacción entre las partículas grandes de acuerdo con un factor de estructura polidisperso estricto. Una distribución de tamaño gaussiana, y los efectos del factor de estructura, se han incluido en la aproximación monodispersa local (Pedersen, 1994), que funciona bien para polidispersidades grandes tales como las que se presentan en el sistema micelar de la caseína. Con esto, el promedio del factor de estructura y el factor de forma son:

$$\langle P(q)S_{\text{hs}}(q) \rangle = \frac{\int_{\min\{0, R-3\sigma_R\}}^{R+3\sigma_R} R^6 P(qR) S_{\text{hs}}(q, \eta, sR) G(R, \langle R \rangle, \sigma_R) dR}{\int_{\min\{0, R-3\sigma_R\}}^{R+3\sigma_R} R^6 G(R, \langle R \rangle, \sigma_R) dR} \quad (6)$$

donde  $s$  es un factor de escala proporcionado por la relación entre el radio de la partícula y el radio de interacción y el gaussiano es:

$$G(R, \langle R \rangle, \sigma_R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_R^2}} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(R - \langle R \rangle)^2}{\sigma_R^2}\right) \quad (7)$$

En esta función  $\sigma_R$  es la anchura gaussiana de la distribución de tamaños de la caseína micelar y  $\langle R \rangle$  es el radio promedio en número.

La expresión para el ajuste de los datos se convierte por tanto en

$$I(q) = AP_{\text{sub}}(q, \xi, \sigma) [S_{\text{hs}}(q, \eta_{\text{sub}}, R_{\text{hs,sub}}) + (n - S_{\text{hs}}(q=0, \eta_{\text{sub}}, R_{\text{hs,sub}})) \langle P(q)S_{\text{hs}}(q) \rangle] \quad (8)$$

con la notación utilizada para las funciones y parámetros. Los parámetros de ajuste son  $A$  (factor de escalado),  $\sigma_R$  (anchura de la distribución de tamaño gaussiana),  $\langle R \rangle$  (radio promedio en número),  $n$  (número de subestructuras en una partícula más grande de radio  $R$ ),  $\eta$  (fracción volumétrica),  $sR$  (radio de interacción micelar de la caseína), siendo  $s$  un factor de escalado entre el radio de interacción y el radio real,  $R$ ),  $\eta_{\text{sub}}$  (fracción volumétrica de las subpartículas),  $R_{\text{hs,sub}}$  (radio de interacción de las subpartículas),  $\xi$  (longitud de correlación), y  $\sigma$  (rugosidad de la superficie de las subpartículas).

Un modelo más explícito tendría un contraste de dispersión finito de la matriz entre las subestructuras. Los inventores intentaron originalmente dicho modelo, sin embargo, los ajustes mostraron una correlación muy grande entre el contraste relativo de la matriz y las subestructuras por una parte y el número de subestructuras por la otra. Por tanto, los inventores decidieron ajustar el contraste de la matriz a cero con la consecuencia desafortunada de que el parámetro,  $n$ , que describe originalmente el número de subestructuras deja de tener esta interpretación simple.

## Resultados y discusión

La composición química y el pH de la leche desnatada y las muestras de MF tratadas se presentan en las Tablas 2 y 3.

**Tabla 2**

5 Composición química de la leche desnatada y el concentrado de MF <sup>a</sup>. A y B indican experimentos separados.

|              | Leche desnatada | A-4 % de caseína     | B-4 % de caseína     | A-8 % de caseína     | B-8 % de caseína     |
|--------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Materia seca | 8,73            | 9,31 <sup>a</sup>    | 9,54 <sup>a</sup>    | 14,12 <sup>a</sup>   | 14,28 <sup>a</sup>   |
| Proteína     | 3,45            | 4,58                 | 4,57                 | 9,01 <sup>a</sup>    | 8,90 <sup>a</sup>    |
| Grasa        | 0,06            | 0,07 <sup>a</sup>    | 0,09 <sup>a</sup>    | 0,18                 | 0,18                 |
| Lactosa      | 4,65            | 3,60 <sup>a</sup>    | 3,82 <sup>a</sup>    | 3,31 <sup>a</sup>    | 3,54 <sup>a</sup>    |
| Ceniza       | 0,39            | 0,87 <sup>a</sup>    | 0,79 <sup>a</sup>    | 1,25 <sup>a</sup>    | 1,22 <sup>a</sup>    |
| Calcio       | 0,12000         | 0,16917 <sup>a</sup> | 0,17000 <sup>a</sup> | 0,31692              | 0,31608              |
| Magnesio     | 0,01073         | 0,01220 <sup>a</sup> | 0,01210 <sup>a</sup> | 0,01797 <sup>a</sup> | 0,01766 <sup>a</sup> |
| Sodio        | 0,03440         | 0,03129              | 0,03085              | 0,03159 <sup>a</sup> | 0,03150 <sup>a</sup> |
| Cloruro      | 0,09000         | 0,08000              | 0,08000              | 0,07200 <sup>a</sup> | 0,08000 <sup>a</sup> |
| Potasio      | 0,14500         | 0,12900 <sup>a</sup> | 0,13033 <sup>a</sup> | 0,13058              | 0,13417              |

<sup>a</sup> Muestras con el mismo % de caseína son significativamente diferentes

**Tabla 3**

Leche desnatada y concentrado de MF, valores de pH y calcio sérico<sup>a</sup>

| 4 % de P1           | P2          | P3          | P4          | P5          | P6          |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| caseína             |             |             |             |             |             |
| A-pH                | 6,79        | 6,78        | 6,08        | 6,07        | 6,08        |
| B-pH                | 6,78        | 6,79        | 6,12        | 6,09        | 6,12        |
| Calcio <sup>b</sup> | 0,21 ± 0,06 | 0,23 ± 0,09 | 0,71 ± 0,03 | 0,68 ± 0,02 | 0,71 ± 0,02 |
| 8 % de P1           |             |             |             |             |             |
| A-pH                | 6,76        | 6,77        | 6,01        | 5,95        | 6,01        |
| B-pH                | 6,75        | 6,75        | 5,98        | 5,92        | 5,96        |
| Calcio <sup>b</sup> | 0,26 ± 0,03 | 0,24 ± 0,01 | 0,90 ± 0,02 | 0,78 ± 0,05 | 0,91 ± 0,00 |

<sup>a</sup> calcio sérico de leche desnatada 0,30 ± 0,06 mg Ca ml<sup>-1</sup> en la fase sérica.

<sup>b</sup> mg Ca ml<sup>-1</sup> en la fase sérica

10 La composición química de las muestras con 4 % y 8 % de caseína fue significativamente diferente para algunos de los componentes; estos componentes se han marcado con una a en la Tabla 2. Las diferencias en la composición química implican que los datos de los dos ensayos A y B deben tratarse por separado.

15 El calcio sérico fue mayor a ambas concentraciones de caseína para las muestras con un pH bajo cuando se aplicó tratamiento a alta presión (P3, P5, P6 en comparación con P4). A un pH alto (P1, P2) se observaron resultados similares en las muestras con un 8 % de caseína, mientras que para las muestras con un 4 % de caseína no se observó efecto significativo del tratamiento a alta presión. Esto concuerda con Knudsen y Skibsted (2010), que notificaron un calcio sérico mayor para muestras de leche tratadas con una presión de 150 - 400 MPa.

## 20 Mediciones reológicas

Se presentan las curvas de flujo del concentrado de MF concentrado como viscosidad aparente frente a la velocidad de cizalladura en la figura 1 y 2.

25 Los datos muestran que las viscosidades aparentes fueron mayores para las muestra acidificadas homogeneizadas a alta presión en comparación con las otras muestras. A un contenido de materia seca mayor se observó un efecto más pronunciado de la acidificación y la homogeneización a alta presión. A las dos concentraciones diferentes (aprox. 40 g caseína l<sup>-1</sup> y 80 g caseína l<sup>-1</sup>) las dispersiones se comportaron como fluidos newtonianos en el intervalo de la velocidad de cizalladura de 0,01 - 800 s<sup>-1</sup> investigada. Las mediciones a velocidades de cizalladura inferiores que se presentan en la figura 1 y 2 proporcionaron resultados con mucho ruido (por tanto, no se muestran los datos). El aumento en la concentración de proteínas con MF (caseína principalmente) y la consiguiente reducción en las proteína séricas afectó a las propiedades fisicoquímicas del retentato. Bouchoux et al. (2009) notificaron el comportamiento newtoniano en la concentración de caseína por debajo de 100 g de caseína l<sup>-1</sup> y el comportamiento pseudoplástico a valor superior. Esto concuerda muy bien con los resultados de los investigadores.

35 El comportamiento pseudoplástico de los materiales alimentarios a velocidades de cizalladura alta es un fenómeno habitual. Para los fluidos de esferas duras, los movimientos brownianos son predominantes a velocidades de cizalladura bajas, mientras que los movimientos se determinan por la hidrodinámica a velocidades de cizalladura altas. Solanki y Rizvi (2001) notificaron que el retenido de MF comenzó presentando un comportamiento no newtoniano (comportamiento pseudoplástico) entre un contenido del 11 % y 17 % de sólidos.

*Resonancia magnética nuclear de campo bajo (LF-RMN)*

5 Los coeficientes de difusión del agua medidos basados en la secuencia eco de espín de gradiente de campo pulsado (PGSE) se cartografiaron en la figura 3 y 4.

10 A pH 5,8 el coeficiente de difusión del agua fue mayor para las muestras que no se habían homogeneizado a alta presión ( $D_{H_2O(4\%)}=1,868 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ;  $D_{H_2O(8\%)}=1,633 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), en comparación con las muestras que se habían homogeneizado a alta presión ( $D_{H_2O(4\%)}=1,632 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ;  $D_{H_2O(8\%)}=1,373 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). A pH 6,6, sin embargo, no se observó efecto significativo del tratamiento a presión.

15 Además, se observó un efecto de pH con coeficientes de difusión aumentados a pH 6,6 en comparación a pH 5,8. Una explicación posible para el coeficiente de difusión del agua reducido en muestras acidificadas que se han homogeneizado a alta presión podría ser una desintegración inicial de las micelas de caseína debido a la acidificación primaria. A continuación puede suponerse que las micelas de caseína desintegradas se perturban adicionalmente durante la etapa de homogeneización a alta presión (las mediciones de DLS mostraron adicionalmente un diámetro hidrodinámico promedio  $z$  más pequeño con homogeneización a alta presión, como se describe a continuación). Los estudios de RMN  $^1\text{H}$  sobre dispersiones y geles de caseína (Mariette, Topgaard, Jönsson, & Soderman, 2002) han mostrado un coeficiente de difusión del agua disminuido con una concentración aumentada de proteína, pero no se observa diferencia entre la difusión en un caseinato de Na (10 nm) y una dispersión de caseína micelar (150 nm). La influencia de la concentración de caseína en el coeficiente de autodifusión del agua puede explicarse por las obstrucción de las moléculas de caseína. Además, se ha mostrado que la solvatación queda potenciada en la leche desnatada acidificada tratada a presión entre pH 5,2 y 6,1, aunque de forma dependiente del pH solamente por encima de pH 6,1 (Famelart, Gaucheron, Mariette, Le Graet, Raulot, & Boyaval, 1997).

*Dispersión de luz dinámica (DLS)*

30 En las figuras 5 y 6 se presentan los datos obtenidos de la dispersión de luz dinámica.

35 Se observó una diferencia más grande en el diámetro hidrodinámico promedio  $z$  diferente para las muestras acidificadas a pH 5,8 y sin homogeneización a alta presión. El 4 % y el 8 % de las muestras dieron como resultado respectivamente  $78 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  y  $75 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  con homogeneización frente respectivamente  $114 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  y  $112 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  sin homogeneización. El efecto de la homogeneización a alta presión fue menos pronunciado a pH 6,6, donde las muestras con un 4 % de caseína mostraron un diámetro hidrodinámico significativamente disminuido como consecuencia de la homogeneización a alta presión. Una tendencia similar, pero menos evidente, se observó para muestras con un 8 % de caseína.

40 Se midieron el diámetro hidrodinámico promedio  $z$  en las fracciones MF con 4 % y 8 % de caseína antes de la homogeneización en un intervalo de 80 a 100 nm. Los pretratamientos de la leche tales como la pasteurización, microfiltración y bombeo pueden alterar el tamaño de las micelas, y el diámetro hidrodinámico medido en la leche desnatada pasteurizada antes del procesamiento adicional era de 138 nm. Esto puede ser, sin embargo, problemático para comparar los tamaños micelares de la caseína según se mide en soluciones diluidas y en soluciones más concentradas, debido al riesgo de si la caseína preserva o no su estado original cuando se diluye, como se ha descrito anteriormente.

50 Knudsen (2005) observó que las micelas de caseína en lecha tratada a presión a 150 MPa y 200 MPa presentan la misma estructura que se observa en leche no tratada, pero con tamaños ligeramente reducidos. A 300 MPa se observaron micelas de caseína de 50 y 500 nm, mientras que a 400 MPa el tamaño se redujo a 30-70 nm. El tamaño promedio de la micela de caseína no cambia significativamente al eliminar parte del fosfato de calcio coloidal de acuerdo con Lin et al. (1972) y Griffen et al. (1988), mientras que Roefs et al. (1985), Horne & Davidson (1986) encuentran que el cambio dependiente del pH en la composición de la micela se refleja en una disminución relativamente pequeña en el radio de la micela medido como diámetro hidrodinámico promedio (de 315 nm a pH 6,7 a 290 nm a pH 5,5). El tratamiento térmico moderado y alto no afecta el tamaño, incluso aunque estos tratamientos térmicos iniciarán la desnaturalización de las proteínas del suero, mientras que la adición de cuajo y la posterior eliminación de la caseína  $\kappa$  produce una disminución significativa en el diámetro promedio de la micela, aproximadamente de 10 nm (Walstra, Bloomfield, Wei, & Jenness, 1981).

*Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS)*

60 La Figura 7 muestra los resultados de la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), representando gráficamente la intensidad dispersada en función del vector de dispersión,  $q$ . En la figura 7 se presentan cuatro tratamientos diferentes a un nivel de caseína del 8 % (y los ajustes correspondientes de los datos). Los correspondientes experimentos para cuatro tratamientos diferentes a un nivel de caseína del 4 % mostraron las mismas tendencias (no se presentan los datos).

Todas las curvas de dispersión presentadas en la figura 7 se caracterizan por dos rebotes pronunciados: uno a valores de  $q$  bajos ( $q \sim 5 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ ) y uno a valores de  $q$  altos ( $q \sim 7 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$ ), como se observó normalmente para sistemas de caseína (de Kruif y May, 1991; Hansen, Bauer, Lomholt, Quist, Pedersen, & Mortensen, 1996; Holt, de Kruif, Tuinier, & Timmins, 2003; Marchin, Putaux, Pignon, & Léonil, 2007). Aunque que los datos de SAXS para todas las muestras muestran dichas características cualitativas similares, también presentan diferencias claras y sistemáticas como resultado de los diferentes tratamientos. Las curvas de dispersión características con dos rebotes desvelan una estructura con dos escalas de longitud bien definidas, definidas como partículas y subestructuras, respectivamente, de acuerdo con el modelo presentado anteriormente. Existe un acuerdo general de que la parte de  $q$  baja de la función de dispersión, las "partículas", refleja las características globales de las micelas de caseína (de Kruif y May, 1991; Hansen et al., 1996; Holt et al., 2003; Marchin et al., 2007) aunque se propone que el modelo de dispersión observado a una  $q$  alta refleje subestructuras de fosfato de calcio coloidal (Holt et al., 2003; Marchin et al., 2007). Las imágenes Cryo-TEM respaldan esta hipótesis, que muestra que las micelas de caseína contienen partículas más oscuras distribuidas uniformemente con un diámetro estimado de 2-3 nm (Marchin et al., 2007). En el modelo SAXS se supone que el modelo de dispersión a  $q$  alta refleja las subpartículas de fosfato de calcio coloidal en la micela.

La eliminación de algo del fosfato de calcio coloidal de la micela (cuando se comparan las muestras a pH 5,8 con la muestra a pH 6,6) dio como resultado una curva más suave a valores de  $q$  mayores para las muestras acidificadas de manera independiente al tratamiento a presión (figura 8, que es una ampliación de la figura 7) de acuerdo con el modelo de los inventores. Esto se ha confirmado también en Marchin et al. (2007). Si las muestras se comparan al mismo pH, las muestras tratadas a presión tienen también una curva más suave a valores de  $q$  altos en comparación con las muestras que no se han presurizado (figura 8).

Para tener una mejor comprensión del tamaño e interacción de las partículas y subpartículas, los datos de SAXS se ajustaron a la ecuación 8 del modelo de caseína. En la Tabla 4 se resumen los parámetros resultantes.

**Tabla 4**  
**Resumen de los parámetros obtenidos ajustando la  $I(q)^a$  experimental**

|                       | Radio promedio en número | Anchura de la distribución de tamaño gaussiana 1 | Número de subpartículas contenidas en una partícula más grande de radio R | Fracción volumétrica | Factor de escalado entre el radio de interacción y el radio real, R | Fracción volumétrica de las subpartículas | Radio de interacción de las subpartículas | Tamaño de las subestructuras | Rugosidad de la superficie de las subestructuras |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------|
| Tratamiento (pH, MPa) | $\langle R \rangle$ (nm) | $\sigma_R$ (nm)                                  | N(número)                                                                 | $\eta$               | s                                                                   | $\eta(\text{sub})$                        | $R_{\text{hs, sub}}$ (nm)                 | $\xi$ (nm)                   | $\sigma \times 10$ (nm)                          |
| 6,6, 300              | 39,90 ± 1,11             | ±12,24<br>0,35                                   | ±14345                                                                    | 0,39±0,01            | 0,8662                                                              | 0,14±0,00                                 | 3,70 ± 0,05                               | 1,54 ± 0,04                  | 4,31 ± 0,07                                      |
| 6,6, 0                | 42,16 ± 0,56             | ±10,99<br>0,95                                   | ±14053                                                                    | 0,36±0,03            | 0,8180                                                              | 0,14±0,01                                 | 3,73 ± 0,03                               | 1,49 ± 0,08                  | 4,45 ± 0,21                                      |
| 5,8, 300              | 45,93 ± 1,46             | ±19,31<br>0,27                                   | ±35315                                                                    | 0,67±0,01            | 1,0219                                                              | 0,12±0,00                                 | 3,54 ± 0,02                               | 1,42 ± 0,05                  | 3,86 ± 0,04                                      |
| 5,8, 0                | 38,12 ± 0,07             | ±11,55<br>0,08                                   | ±9974                                                                     | 0,33±0,00            | 0,9551                                                              | 0,15±0,00                                 | 3,72 ± 0,03                               | 1,56 ± 0,02                  | 3,71 ± 0,04                                      |
| 5,8, 300              | 46,58 ± 0,76             | ±19,42<br>0,43                                   | ±38832                                                                    | 0,66±0,02            | 1,0133                                                              | 0,12±0,00                                 | 3,55 ± 0,02                               | 1,39 ± 0,05                  | 3,98 ± 0,13                                      |
| 5,8, 300              | 45,67 ± 1,33             | ±19,54<br>0,20                                   | ±34987                                                                    | 0,68±0,01            | 1,0276                                                              | 0,12±0,00                                 | 3,50 ± 0,05                               | 1,47 ± 0,03                  | 3,80 ± 0,08                                      |

<sup>a</sup> Se presentan solo los datos para las muestras de MCI al 8 %

El tratamiento de los datos ajustados con el análisis de datos multivariante muestra una división de las muestras en tres grupos, como se muestra en la figura 9. Las muestras con un pH alto se agrupan entre si independientemente del tratamiento a presión, mientras que las muestras con pH bajo se separan claramente dependiendo del tratamiento aplicado con presión. Las muestras con pH bajo y tratamiento con presión ultra alta tenían un radio promedio en número más grande ( $\langle R \rangle$ ) y una anchura más grande de la distribución del tamaño ( $\sigma_R$ ), fracción volumétrica más grande ( $\eta$ ), un número mayor (aparente) de subpartículas comprendidas en una partícula más grande ( $n$ ) y un radio de interacción más grande ( $sR$ ) de las micelas.

Los resultados del tratamiento a alta presión indican que se necesita cierta disociación del fosfato de calcio coloidal

(CCP) para desestabilizar la micela de caseína. El tratamiento a presión con pH bajo puede conducir a una perturbación aumentada de las micelas, que da como resultado a continuación una reasociación más desordenada, explicando por tanto la anchura más grande de la distribución de tamaños ( $\sigma_R$ ). Además, las muestras acidificadas tratadas a alta presión tienen una polidispersidad más grande ( $\sigma_R$ ), que puede deberse a superficies perturbadas y a reasociación. La reasociación de los fragmentos micelares podría explicar también el valor mayor de  $n$  observado. Si se supone que las subpartículas son fosfato de calcio, se espera tener menos subpartículas en una micela cuando se acidifican las muestras, debido a la solubilización del fosfato de calcio. El ajuste de los datos proporciona un valor  $n$  en las muestras acidificadas tratadas sin presión en comparación con las muestras tratadas a pH alto sin presión. El aislado de caseína láctea con 4 % de caseína muestra las mismas tendencias, sin embargo con un radio promedio en número observado más pequeño, que podría explicarse por una menor reasociación de los fragmentos de caseína debido a un tratamiento a presión dinámico más intenso a la menor concentración.

Las muestras a pH bajo sin tratamiento a presión fueron distintas principalmente de las muestras a pH alto que tenían una correlación de longitud ( $\xi$ ) ligeramente más grande y un valor menor de la rugosidad sobre la superficie de las subpartículas ( $\sigma$ ).

El modelo proporcionó un radio promedio de 38-47 nm para el aislado de caseína láctea con un 8 % de caseína y un radio de la subpartícula de 1,5 nm. Para validar el radio promedio ajustado de las partículas, se midió una muestra de leche desnatada con la misma configuración de SAXS para comparar los valores obtenidos en un trabajo anterior (Hansen et al., 1996; Holt et al., 2003). El ajuste de la muestra de leche desnatada proporcionó un radio promedio de  $46 \pm 13$  nm y un radio de la subpartícula de 1,5 nm. Se determinaron el radio micelar promedio de aproximadamente 100-120 nm y el radio de la subpartícula de aproximadamente 7 nm con una polidispersidad de aproximadamente 40 - 50 % con dispersión de neutrones de ángulo pequeño y dispersión de luz estática en muestras diluidas (Hansen et al., 1996). Holt et al. (2003) estudiaron las subestructuras de las micelas de caseína de bovino en soluciones diluidas y observaron que las subestructuras tenían un tamaño entre 4,5 - 6,7 nm dependiendo del tampón utilizado para la dilución. Los tamaños alcanzados de las micelas de caseína están en buena concordancia con el trabajo realizado por Hansen et al. (1996), mientras que las subpartículas se estimaron más pequeñas que Hansen et al. (1996) y Holt et al. (2003).

El área superficial total de la proteína se vuelve más grande y, por consiguiente, la unión del agua a las superficies de la proteína será más grande, y el coeficiente de difusión del agua se reduciría. El efecto de hidratación, la disminución de la difusión del agua podría explicarse teniendo en cuenta la interacción agua-proteína.

## Ejemplo 2: Suero

### Fase sérica separada a partir del concentrado

Se midió también la unión al agua en términos de suero separado en las muestras tras ultracentrifugación. La cantidades de la fase sérica (g) medidas se cartografiaban en las Figuras 10 y 11.

Las muestras que comprenden un 8 % de caseína que se habían acidificado y tratado a presión a alta cizalladura, a saber, muestras con un 8 % de P3, P5 y P6, mostraron una mayor unión al agua, a saber, suero menos separado tras la ultracentrifugación. Las muestras que comprendían un 4 % de caseína mostraron los mismos resultados que para las muestras acidificadas tratadas mediante presión a alta cizalladura, a saber, muestras con un 4 % de P3, P5 y P6.

### Contenido de calcio sérico

Se midió el contenido de calcio sérico como se describe en la sección de "análisis químico" anterior en las muestras que comprenden un 8 % de caseína. La cantidad de calcio (mg) medida se presenta en la Tabla 3. Las muestras que comprenden 8 % de caseína que se habían acidificado y tratado dinámicamente a presión a alta cizalladura, a saber, muestras con un 8 % de P3, P5 y P6, mostraron una mayor cantidad de calcio sérico/ml de suero.

## Ejemplo 3: Aplicación a la cuajada de queso ácida

### Propósito

El objetivo del experimento era conseguir una mejor comprensión de cómo los cambios en los parámetros de proceso tales como la acidificación y el tratamiento dinámico a presión a alta cizalladura afectan a la estructura y a las propiedades de la cuajada del queso basada en el concentrado de MF.

### Materiales y métodos

Preparación de la cuajada: 1 kg de concentrado de MF frío con un 3,6 % de caseína (pretratada como se describe en la sección de materiales y métodos del ejemplo 1) se calentó a 30°C. El concentrado de MF se acidificó con ácido

láctico al 10 % a pH 5,21 y se calentó (50°C, 30 min). El concentrado se drenó posteriormente (30 min) en moldes de queso con filtro. Se pesó la cantidad de cuajada (kg), y se calculó el rendimiento. Se llevaron a cabo dos experimentos, uno con una muestra, que se habían tratado mediante presión a alta cizalladura, y uno que no se había tratado.

5

**Resultados y conclusión**

En la Tabla 5 se presentan los resultados de los experimentos de dos quesos.

10

**Tabla 5:**  
Rendimientos de los dos experimentos con y sin tratamiento dinámico a presión a alta cizalladura

|                                                    | Rendimiento,<br>Cuajada (g) | Caseína en 1000 g de<br>leche (g) | Queso / caseína (g) |
|----------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| pH 5,8; + tratamiento a presión a alta cizalladura | 138                         | 36                                | 3,8                 |
| pH 5,8; + tratamiento a presión a alta cizalladura | 102                         | 36                                | 2,8                 |

Conclusión

15

Los datos mostraron que la relación de queso por gramo de caseína era mayor para el queso preparado a partir de leche MF tratada en un proceso dinámico de alta cizalladura preacidificada, en comparación con leche MF solo preacidificada antes de la preparación de la cuajada. El rendimiento mayor del 35 % se puede atribuir a un aumento de la unión al agua en la cuajada basada en la leche, que se ha tratado mediante un proceso dinámico a alta cizalladura a 300 MPa antes de la preparación de la cuajada.

20

**Ejemplo 4:** Aplicación de cuajo a la cuajada de queso

25

Se ha observado que el concentrado lácteo (leche MCI) puede unir más agua, con la condición de que la leche se pretrate de acuerdo con la invención, por ejemplo, con una combinación de acidificación con ácido cítrico a un pH de 5,8 seguida por una homogeneización dinámica a presión ultra alta. El objetivo era examinar si esta unión al agua mejorada se puede transferir a sistemas de queso.

Propósito

30

El objetivo de este experimento era comparar quesos basados en leche, que se habían tratado mediante proceso dinámico a alta cizalladura (UHPH) con quesos producidos con leche, que no se habían tratado mediante proceso dinámico a alta temperatura:

35

Vat 41-2-1: Leche MCI acidificada a pH 5,8, UHPH inversa a 35.000 psi (240 MPa) Vat 41-2-2: Leche MCI acidificada a pH 5,8

Método

40

A continuación se reseñan los métodos para la homogeneización dinámica a alta cizalladura y producción de queso.

Homogeneización de leche MCI

45

Se produjo leche MCI de igual manera a la descrita en el ejemplo 1. La leche MCI se trató mediante un proceso dinámico a alta cizalladura en configuración inversa a 35.000 psi (240 MPa) en una unidad de homogeneización a presión ultra alta (Bee International).

Producción de queso

50

La crema añadida a la leche MCI se precalentó y a continuación se añadió el cultivo iniciador, tras un tiempo de premaduración se añadió el cuajo para obtener la coagulación. La cuajada coagulada se cortó en cuadrados pequeños con un equipo de tipo lira metálica, tras cortar, los cuadrados reposaron un tiempo corto tras la agitación. Los granos de queso se agitaron para medir el pH. Los granos se prepressaron en la cuba a tres presiones diferentes y la cuajada prepressada se cortó en cuatro quesos y se colocó en los moldes antes del prensado. Los quesos se enfriaron en agua fría y se salaron en una solución salina antes de su almacenamiento en bolsas de plástico.

55

**Resultados y discusión**

60

Se presentan y discuten a continuación los resultados relevantes.

Concentrado de MCI, LF-RMN

La leche MCI se analizó con el equipo LF-RMN para determinar el coeficiente de difusión y, a partir de este, la movilidad del agua. Los coeficientes de difusión se reseñan en la tabla 6.

5

**Tabla 6:**  
Coeficiente de difusión medido en leche MCI.

|                         | 41-2-1 (Vat 1) $E^{-9}$ (m <sup>2</sup> /s) | 41-2-2 (Vat 2) $E^{-9}$ (m <sup>2</sup> /s) |
|-------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Coeficiente de difusión | 1,578                                       | 1,918                                       |

10

Como se observa a partir de la tabla 6, se obtuvo una reducción en la movilidad del agua con un tratamiento a presión ultra alta de la fracción MCI, que se ha observado también en los ensayos iniciales.

Datos químicos de la leche y el queso

Se presentan a continuación los datos químicos para la leche MCI, leche de queso, queso y suero.

15

**Tabla 7:**  
Datos químicos para la leche MCI, leche de queso, queso y suero

|                           | Materia seca (%) | Proteínas (%) | Grasa (%) / Grasa en materia seca (%) | Sal (%)            |
|---------------------------|------------------|---------------|---------------------------------------|--------------------|
| Leche MCI 41-2-1          | 9,40             | 4,23          | 0,08                                  |                    |
| Leche MCI 41-2-2          | 9,19             | 4,31          | 0,09                                  |                    |
| Leche de queso 41-2-1     | 13,17            | 4,01          | 4,27                                  |                    |
| Leche de queso 41-2-2     | 12,82            | 4,04          | 3,99                                  |                    |
|                           |                  |               | <b>pH</b>                             |                    |
| Queso 41-2-1 <sup>1</sup> | 44,54            | 19,39         | 4,85                                  | 21,2/(47,6) 1,25   |
| Queso 41-2-2              | 51,35            | 25,56         | 5,05                                  | 20,5 / (39,9) 1,20 |
| Suero 41-2-1              | 6,20             | 0,61          | 0,64                                  |                    |
| Suero 41-2-2              | 6,63             | 0,63          | 1,21                                  |                    |

<sup>1</sup> Queso de prueba

20

Como se observa a partir de la tabla 7, el contenido de materia seca de los quesos de la prueba eran mucho menores que en los quesos de referencia, lo que respalda que el contenido de agua de los quesos de la prueba fue mayor que el de los quesos de referencia.

25

En la tabla 8 siguiente se presenta el balance de masas. Los quesos basados en la leche que se ha tratado mediante un proceso dinámico de alta cizalladura obtienen un rendimiento de más del 30 % que los quesos basados en la leche MCI sin tratamiento dinámico de alta cizalladura.

**Tabla 8:**  
Balance de masas y balance de masas calculado

|                                                     | 41-2-1 (Vat 1) | 41-2-2 (Vat 2) |
|-----------------------------------------------------|----------------|----------------|
| Leche (kg)                                          | 15,150         | 15,150         |
| Suero (kg)                                          | 11,885         | 12,671         |
| Queso fresco (kg) (tras el prensado)                | 2,648          | 2,025          |
| Queso enfriado (kg) (tras el enfriamiento con agua) | 2,473          | 1,894          |
| Queso salado (kg) (tras el salado)                  | 2,425          | 1,843          |
| Produjo más queso (%)                               | 30 %           | 0 %            |

30 Conclusión

Ha sido posible producir queso sobre la base de leche MCI con y sin homogeneización dinámica a alta temperatura. Se observó una unión mejorada al agua del 30 % en queso producido sobre la leche MCI tratada mediante un proceso dinámico a alta cizalladura.

35

**Referencias**

40

- Anama, S.G. (2008). Effect of milk solids concentration on whey protein denaturation, particle size changes and solubilization of casein in high-pressure-treated skim milk. *International Dairy Journal*, 18, 228-235.
- Ardisson-Korat, A. V., y Rizvi, S. H. (2004). Vatless Manufacturing of Low-Moisture Part-Skim Mozzarella Cheese from Highly Concentrated Skim Milk Microfiltration Retentates. *Journal of Dairy Science*, 87, 3601-3613.
- Bienvenue, A., Jimenez-Flores, R., y Singh, H. (2003). Rheological Properties of Concentrated Skim Milk: Importance of Soluble Minerals in the Changes in Viscosity During Storage. *Journal of Dairy Science*, 86, 3813-3821.

- Bouchoux, A., Debbou, B., Gesan-Guiziou, G., Famelart, M.-H., Doublier, J.-L., y Cabane, B. (2009). Rheology and phase behaviour of dense casein micelle dispersions. *The Journal of Chemical Physics*, 131, 165106-1-165106-11.
- 5 Brandsma, R. L., y Rizvi, S. H. H. (2001 a). Effect of Manufacturing Treatments on the Rheological Character of Mozzarella Cheese made from Microfiltration Retentate Depleted of Whey Proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 601 - 610.
- Brandsma R. L., y Rizvi, S. H. H. (2001 b). Manufacture of Mozzarella Cheese from Highly Concentrated Skim Milk Microfiltration Retentate Depleted of Whey Proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 611-624.
- 10 Dalgleish, D. G., y Hallett, F. R. (1995). Dynamic light scattering: Applications to food systems. *Food Research International*, 28(3), 181-193.
- de Kruijff, C., y May, R. P. (1991).  $\kappa$ -Casein micelles: structure, interaction and gelling studied by small-angle neutron scattering. *European Journal of Biochemistry*, 200, 431-436.
- Famelart, M. H., Gaucheron, F., Mariette, F., Le Graet, Y., Raulot, K., y Boyaval, E. (1997). Acidification of Pressure-treated Milk. *International Dairy Journal*, 7, 325-330.
- 15 Fox, P. F., y McSweeney, P. L. H. (1998). Water in Milk and Dairy Products. En P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.), *Dairy Chemistry and Biochemistry* (pp. 294-316). Londres: Blackie Academic & Professional.
- Griffin, M. C., Lyster, R. L., y Price, J. C. (1988). The dis-aggregation of calcium-depleted casein micelles. *European Journal of Biochemistry*, 174, 339-343.
- 20 Hansen, S., Bauer, R., Lomholt, S. B., Quist, K. B., Pedersen, J. S., & Mortensen, K. (1996). Structure of casein micelles studied by small-angle neutron scattering. *European Biophysics Journal*, 24, 143-147.
- Holt, C., de Kruijff, C. G., Tuinier, R., & Timmins, P. A. (2003). Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213, 275-284.
- Horne, D. S., y Davidson, C. M. (1986). The effect of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles. *Colloid and Polymer Science*, 264, 727-734.
- 25 IDF Standard 1 D. (1996). Milk-Determination of Fat Content -Röse-Gottlieb Bravimetric Method. Int. Dairy Fed., Bruselas, Bélgica.
- Norma IDF 20-3. (2004). Determination of Nitrogen Content. Int. Dairy Fed., Bruselas, Bélgica.
- Norma IDF 20-4. (2002). Determination of non-Nitrogen Content. Int. Dairy Fed., Bruselas, Bélgica.
- 30 Norma IDF Standard 21 B modificada. (1987). Milk, cream and evaporated milk. Determination of the Total Solids Content. Int. Dairy Fed., Bruselas, Bélgica.
- Karlsson, A. O. (2005). Controlling physical properties of rennet-induced casein gels made from concentrated skim milk. Tesis doctoral, KU-LIFE, Copenhagen.
- Keerl, M., Pedersen, J. S., y Richtering, W. (2009). Temperature Sensitive Copolymer Microgels with Nanophase Separated Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8), 3093-3097.
- 35 Kinning, D.J. y Thomas, E.L. (1984). *Macromolecules* 17, 1712-1718.
- Knudsen, J. (2005). High Pressure effects on milk proteins. Tesis doctoral, KU-LIFE, Copenhagen.
- Knudsen, J., y Skibsted, L. H. (2010). High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry*, 119, 202-208.
- 40 Larsson, M. (2004). Renneted MF Retentate as a Model for Fat-Free Cheese - Texture Microstructure and Proteolysis Pattern During Storage. Tesis doctoral, Lund, Suecia.
- Lin, S. H. C., Leong, S. L., Dewan, R. K., Bloomfield, V. A., y Morr, C. V. (1972). Effect of Calcium Ion on the Structure of Native Bovine Casein Micelles. *Biochemistry*, 11, 1818-1821.
- Marchin, S., Putaux, J.-L., Pignon, F., y Leonil, J. (2007). Effects of the environment factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scatter/ultras-small-angle x-ray scattering. *The Journal of Chemical Physics*, 126, 045101-1 - 045101-10.
- 45 Mariette, F., Topgaard, D., Jönsson, B., y Soderman, O. (2002). 1H NMR Diffusometry Study of Water in Casein Dispersions and Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4295-4302.
- McMahon, D. J. y Oommen, B. S. (2008). Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *Journal of Dairy Science*, 91, 1709-1721.
- 50 Neocleous, M., Barbano, D. M., y Rudan, M. A. (2002a). Impact of Low Concentration Factor Microfiltration on Milk Component Recovery and Cheddar Cheese Yield. *Journal of Dairy Science*, 85, 2415-2424.
- Neocleous, M., Barbano, D. M., y Rudan, M. A. (2002b). Impact of Low Concentration Factor Microfiltration on the Composition and Aging of Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 2425-2437.
- 55 Nelson, B. K., y Barbano, D. M. (2005). A Microfiltration Process to Maximize Removal of Serum Proteins from Skim Milk Before Cheese Making. *Journal of Dairy Science*, 88, 1891-1900.
- NMKL n.º 173. (2005). Ash, gravimetric determination in foods. Nordisk Metodikkomite For Livsmedel.
- Pedersen, J. S. (1994). Determination of Size Distributions from Hard-sphere Interactions. *Journal of Applied Crystallography*, 27, 595-608.
- 60 Pedersen, J. S. (2004). a Flux- and background-optimized version of the NanoSTAR small-angle X-ray scattering camera for solution scattering. *Journal of Applied Crystallography*, 37, 369-380.
- Percus, J.K. y Yevick, G.J. (1958). *Physical Review* 110, 1-13.
- Roefs, S. P. F. M., Walstra, P., Dalgleish, D. G., y Horne, D. S. (1985). Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 39, 119-122.
- 65 Solanki, G., y Rizvi, S. S. H. (2001). Physico-Chemical Properties of Skim Milk Retentates from Microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 84, 2381-2391.

van Boekel, M. A. J. S., y Ribadeau-Dumas, B. (1987). Addendum to the Evaluation of the Kjeldahl Factor for Conversion of the Nitrogen-Content of Milk and Milk-Products to Protein-Content. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41.281-284.

5 Walstra, P., Bloomfield, V. A., Wei, G. J., y Jenness, R. (1981). Effect of Chymosin Action on the Hydrodynamic Diameter of Casein Micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 669, 258-259.

**REIVINDICACIONES**

1. Un concentrado de caseína preparado según un método que comprende las etapas de
- 5 (i) tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida  
(ii) añadir un ácido desplazando el equilibrio entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica y disminuir el pH del retenido de caseína para estar en el intervalo de 4,5 y 6,0  
10 (iii) tratar el retenido de caseína acidificada de (ii) en un proceso dinámico de alta cizalladura a una presión de al menos 300 MPa.
2. Un concentrado de caseína de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo la composición no más de un 10 % de proteína sérica y teniendo una capacidad de unión al agua de al menos 1,5 g H<sub>2</sub>O/g de caseína.
- 15 3. Un concentrado de caseína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, comprendiendo el concentrado micelas de caseína que tienen un tamaño promedio de menos de 150 nm de diámetro.
4. Un concentrado de caseína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el método además las etapas de ultrafiltración del permeado procedente de dicha microfiltración y la diafiltración de dicho retenido de microfiltración con el permeado de ultrafiltración.
- 20 5. Un concentrado de caseína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho tratamiento en un proceso dinámico a alta cizalladura se lleva a cabo a una presión de 300 a 400 MPa.
- 25 6. Un concentrado de caseína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ácido se selecciona entre diácidos y triácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, o a partir de ácidos producidos por microorganismos, tales como ácido láctico.
- 30 7. Un concentrado de caseína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos un 90 % de las micelas tienen menos de 250 nm de diámetro, tal como menos de 200 nm, tal como menos de 150 nm.
8. Un proceso de preparación de un concentrado de caseína que comprende las etapas de
- 35 (i) tratar leche mediante microfiltración para producir un retenido de microfiltración que comprende micelas de caseína y una cantidad reducida de proteínas séricas en comparación con la leche de partida  
(ii) añadir un ácido desplazando el equilibrio entre el calcio unido a las micelas de caseína y el que está presente en la fase sérica y disminuir el pH del retenido de caseína para estar en el intervalo de 4,5 y 6,0  
40 (iii) tratar el retenido de caseína acidificada de (ii) en un proceso dinámico de alta cizalladura a una presión de al menos 300 MPa.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además las etapas de ultrafiltración del permeado procedente de dicha microfiltración y la diafiltración de dicho retenido de microfiltración con el permeado de ultrafiltración.
- 45 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que el ácido se selecciona entre diácidos y triácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, o a partir de ácidos producidos por microorganismos, tales como ácido láctico.
- 50 11. Un proceso de preparación de un producto de queso que comprende las etapas de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y que comprende además las etapas de
- opcionalmente, mezclar el producto con leche natural
  - llevar a cabo un proceso de queso.
- 55 12. Un proceso de preparación de un producto lácteo en forma de polvo, que comprende las etapas de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y además las etapas de
- opcionalmente, mezclar con leche natural
  - llevar a cabo un proceso de formación de polvo, tal como un secado mediante pulverización o una
- 60 liofilización.
13. Uso del proceso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para preparar un producto de queso de uno de los siguientes tipos: queso cremoso, queso amarillo, queso blanco, queso mohoso, queso bajo en grasa y queso de tipo pasta hilada.
- 65 14. Uso del proceso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para preparar un producto lácteo, tal como un

ingrediente alimentario funcional, una bebida láctea, un polvo de caseína o un producto lácteo fermentado.

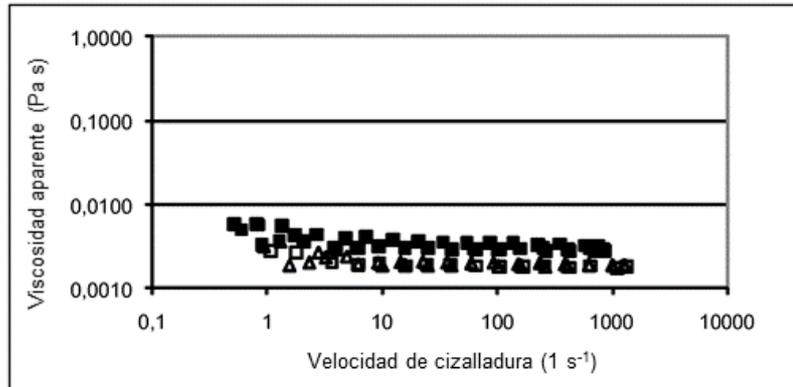


Fig. 1

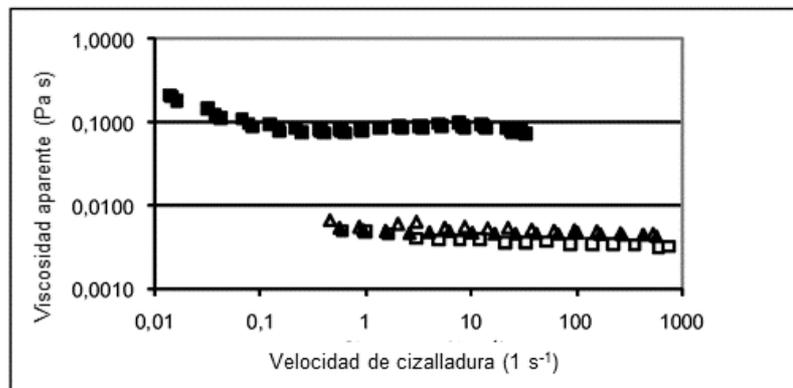


Fig. 2

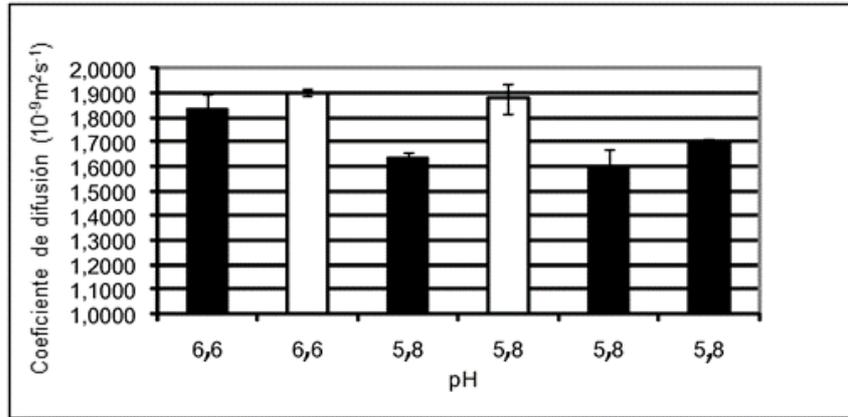


Fig. 3

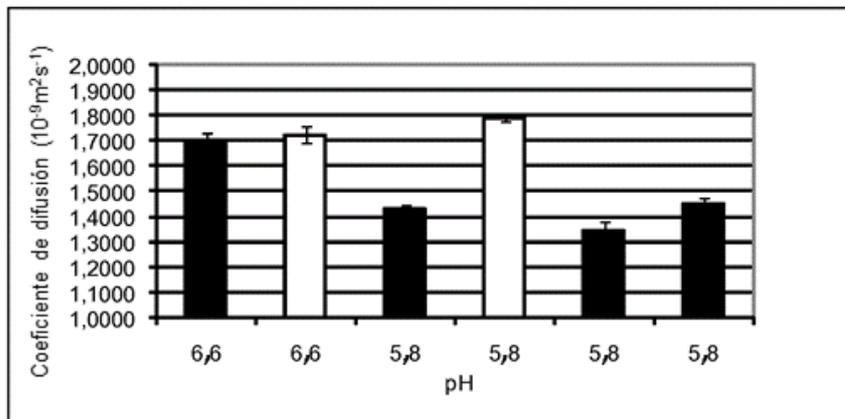


Fig. 4

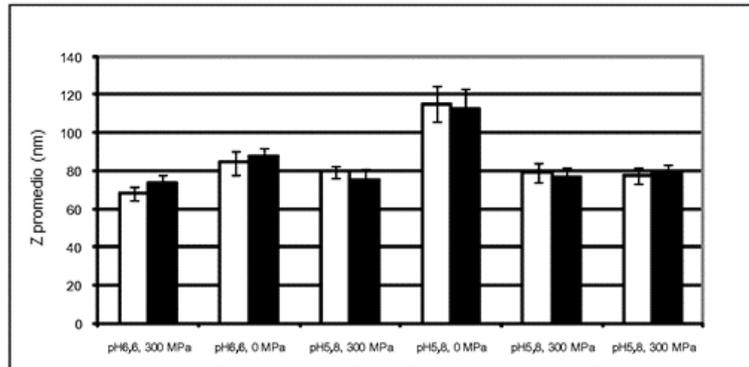


Fig. 5

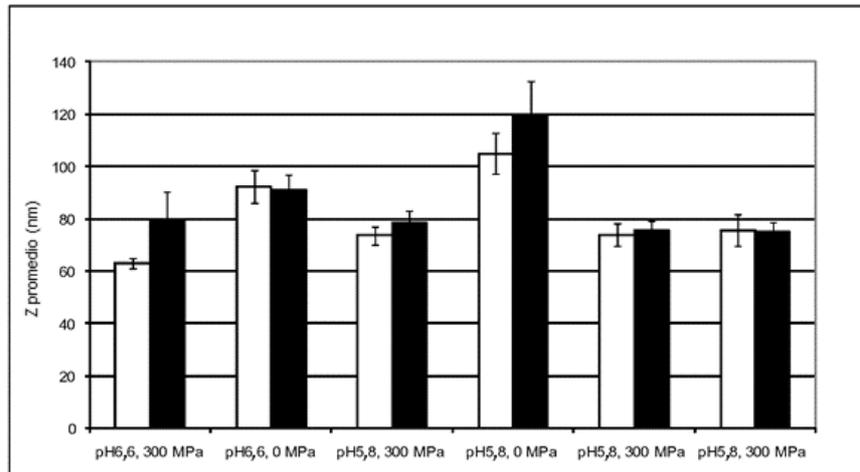
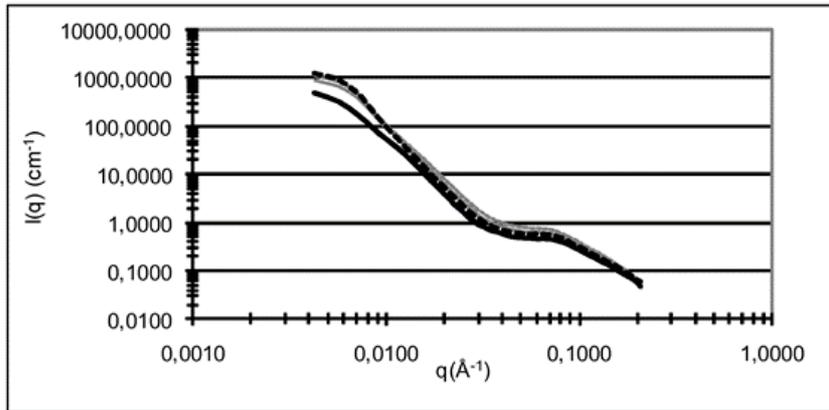
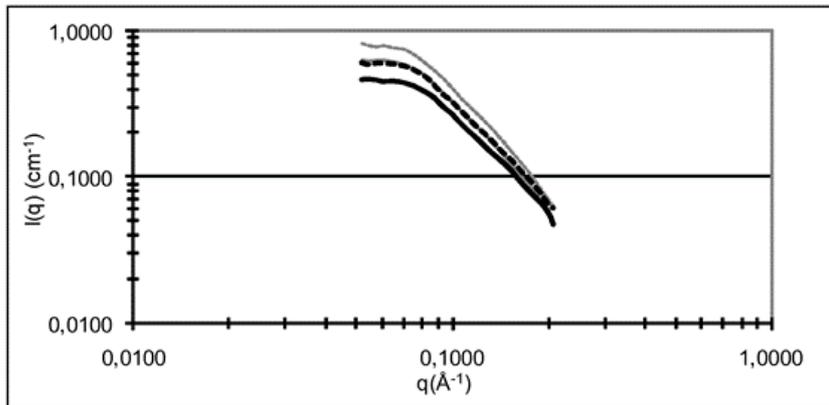


Fig. 6



**Fig. 7**



**Fig. 8**

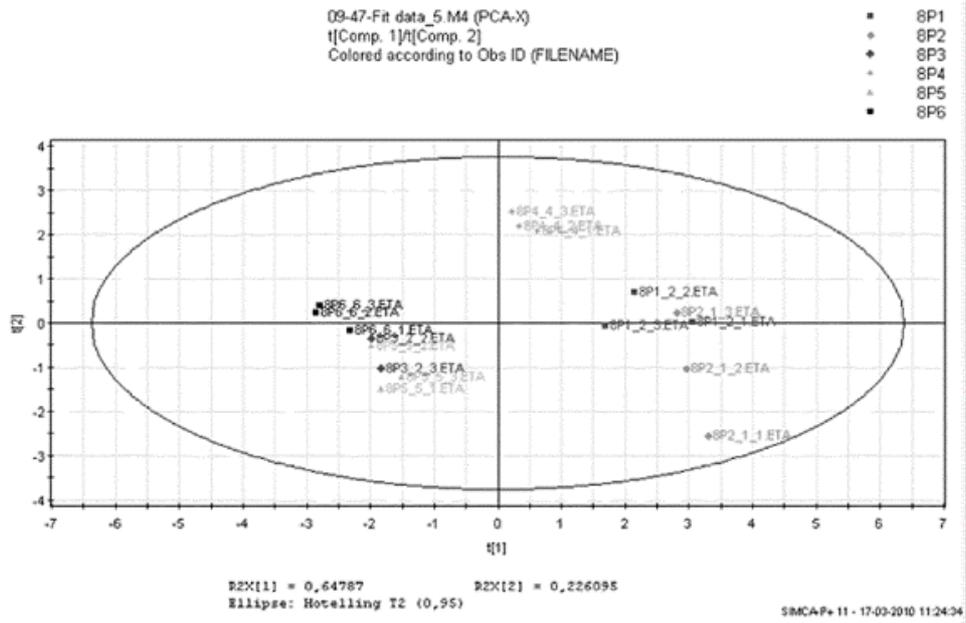


Fig. 9

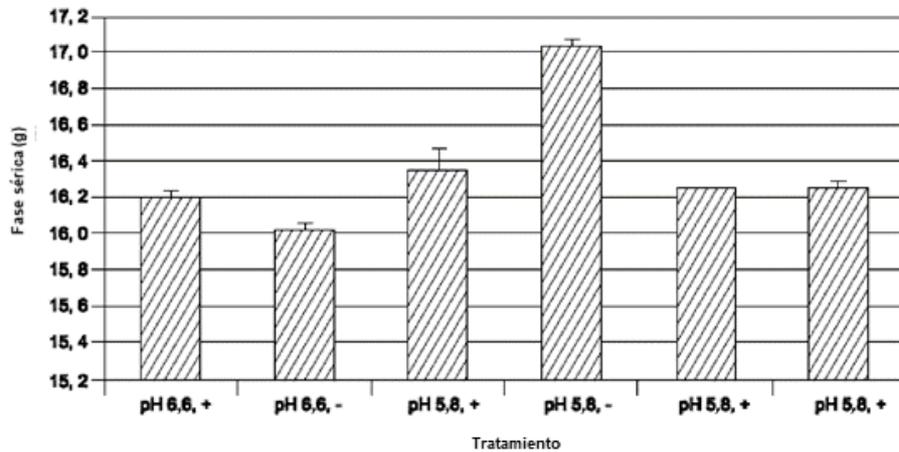


Fig. 10

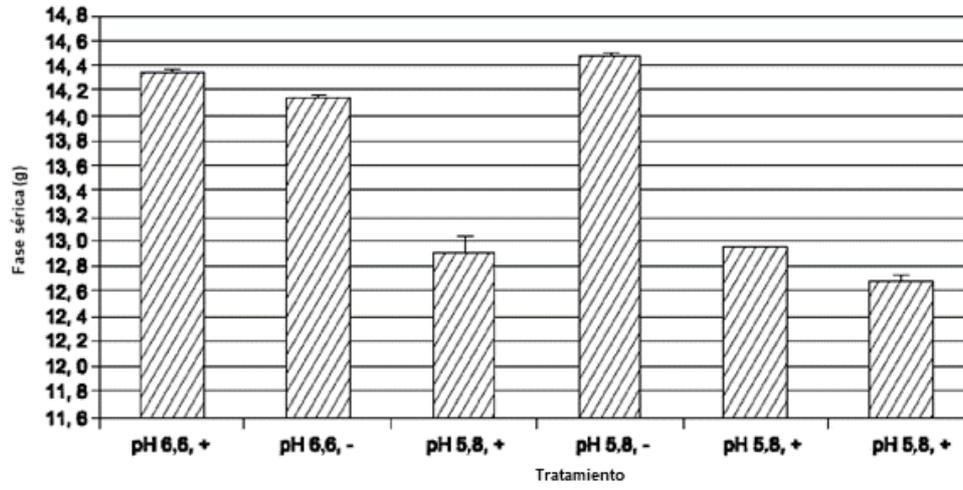


Fig. 11