

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 019**

51 Int. Cl.:

A23C 7/04 (2006.01)

A01J 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012 PCT/US2012/049590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13020081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12820641 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2739157**

54 Título: **Microfiltración de leche humana para reducir la contaminación bacteriana**

30 Prioridad:

03.08.2011 US 201161514673 P

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

16.02.2018

73 Titular/es:

**PROLACTA BIOSCIENCE, INC. (100.0%)
757 Baldwin Park Blvd.
City of Industry, CA 91746, US**

72 Inventor/es:

**FOURNELL, JOSEPH;
EAKER, SCOTT y
MONTTOYA, ARMANDO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 655 019 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

Microfiltración de leche humana para reducir la contaminación bacteriana

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a productos lácteos humanos. Específicamente, la presente divulgación se refiere a métodos para producir productos lácteos humanos con un contenido bacteriano más bajo, incluyendo *Bacillus cereus*, en comparación con la leche humana cruda.

10

Antecedentes

La leche humana y los productos basados en leche humana son el alimento preferido de los bebés prematuros. Dado que el sistema inmunitario de los bebés prematuros está relativamente poco desarrollado, es importante que los productos basados en leche humana no contengan niveles significativos de bacterias, incluyendo *Bacillus cereus*. Al mismo tiempo, es importante minimizar cualquier alteración del contenido de grasas y proteínas en la leche humana, ya que estos constituyentes son críticos para la salud y el desarrollo del bebé prematuro.

15

El archiconocido proceso de pasteurización se ha utilizado durante muchas décadas para destruir bacterias en la leche humana. La especie bacteriana *Bacillus cereus* es una bacteria formadora de endosporas y a menudo es la bacteria predominante encontrada en la leche humana pasteurizada ya que puede sobrevivir al proceso típico de pasteurización. Los procesos típicos de pasteurización (por ejemplo, temperaturas bajas o moderadas durante aproximadamente 30 minutos) generalmente no inactivan a las bacterias formadoras de esporas, tales como *Bacillus cereus*. Desafortunadamente, las temperaturas y presiones ultra altas necesarias en el proceso de pasteurización para inactivar a las bacterias formadoras de esporas, tales como *Bacillus cereus*, afectan negativamente a la composición, particularmente a la estructura de las grasas y proteínas presentes en la leche humana.

20

25

En la técnica se conocen diversos métodos de producción de leche no humana con un recuento bacteriano reducido utilizando filtración, sin embargo, ninguno de estos métodos ha encontrado una amplia aceptación. Los métodos de la técnica anterior generalmente adolecen de caudales bajos, lo que hace que el método no sea rentable a gran escala, o que afecte negativamente a la calidad de la leche no humana, haciendo que el producto no sea aceptable para los consumidores.

30

La publicación de patente sueca No. 380.422 describe un método en el que leche entera no humana se divide en fracciones de filtrado y concentrado por microfiltración. El filtrado, que pasa a través de los poros del filtro (el tamaño de los poros puede variar ampliamente de 0,1 micras a 10 micras), consiste en leche no humana con un contenido de grasas sustancialmente reducido y el concentrado, que es la fracción retenida por la superficie del filtro, consiste en nata. El filtro no solo retiene sustancialmente las bacterias sino también glóbulos grasos.

35

La Patente de Estados Unidos No. 5.064.674 se refiere a un método para fabricar leche no humana hipoalérgica por métodos de ultrafiltración que emplean membranas que permitirán el paso de moléculas que tienen un peso molecular menor o igual a aproximadamente 5 kDa. Los componentes excluidos que están atrapados por la membrana incluyen proteínas de la leche, bacterias viables o no viables, antígenos proteicos bacterianos y grasa de la leche. Por lo tanto, el filtrado recogido del proceso de ultrafiltración carece no solo de bacterias y antígenos proteicos bacterianos, sino también de grasas y proteínas lácteas, lo que hace que el producto como tal no sea adecuado para su uso como leche no humana. El documento US 5.576.040 describe un proceso de filtración de leche que elimina bacterias, incluida la eliminación de grasa de la leche, eliminando iones de calcio utilizando una resina de intercambio iónico o un agente quelante para impedir la obstrucción de los filtros, prefiltrado en presencia de un auxiliar de filtración al 3 %, y esterilización de la leche por filtración con un filtro de profundidad.

40

45

50

Por lo tanto, los poros de los filtros utilizados en la técnica para filtrar las bacterias de las composiciones lácteas, aunque son efectivos en la esterilización de la leche, también eliminarán la grasa y al menos algunas de las proteínas. Dicho filtro se obstruye rápidamente debido al material que queda atrapado; por lo tanto, el caudal a través del filtro disminuye rápidamente y el coste de un proceso tan ineficiente es generalmente prohibitivo. Además, debido a que el filtro retiene grasa y proteína, la calidad de la leche también se ve negativamente afectada.

55

Por lo tanto, existe la necesidad de un método de procesamiento de filtración de leche mejorado que pueda proporcionar un producto estéril o casi más estéril manteniendo al mismo tiempo el contenido nutricional de la leche humana y de los productos basados en leche humana.

60

Sumario de la invención

Se ha descubierto ahora que la microfiltración de la leche humana puede llevarse a cabo satisfactoriamente empleando auxiliares de filtración de partículas porosas, tales como tierra de diatomeas, sin los problemas de la técnica anterior de degradación de la calidad de la leche humana, obstrucción prematura del filtro y eliminación bacteriana inadecuada.

65

La presente invención se define a través de las reivindicaciones.

Una vez que la leche humana se separa, se añade un auxiliar de filtración poroso y particulado a la leche desnatada humana. Al realizar primero la separación de la leche humana, se reduce significativamente la cantidad y el tamaño de partícula de los glóbulos grasos de la leche. La adición del auxiliar de filtración permite la microfiltración de la leche humana.

La leche humana es una emulsión de partículas de grasa y proteínas en el agua. La separación de la leche humana en nata y leche desnatada proporciona un método para eliminar un alto porcentaje de partículas de grasa grandes en la emulsión. Después, la adición del auxiliar de filtración, que impide de manera eficaz que los sólidos comprimibles formen una masa impermeable que pueda obstruir el filtro, permite el paso de la leche humana a través de una membrana microporosa de tamaño adecuado, para retener las bacterias, incluida *Bacillus cereus*, contenidas en su interior, sin eliminación no deseada del contenido de proteínas de la leche.

Después de separar la leche humana en nata y leche desnatada, el auxiliar de filtración se añade a la leche desnatada humana, para impedir que los sólidos comprimibles formen una masa impermeable durante un proceso de filtración, que podría obstruir el filtro. Por tanto, la invención proporciona un método mejorado para producir productos lácteos humanos con un contenido bacteriano reducido, que incluye *Bacillus cereus*, sin la necesidad de tener que realizar pasteurización a alta temperatura.

En el presente documento se describe un método para tratar leche humana cruda para producir leche humana tratada que tiene un contenido bacteriano reducido, que incluye *Bacillus cereus*, en comparación con la leche humana cruda. El método comprende tomar leche humana cruda con un posible contenido bacteriano, por ejemplo, *Bacillus cereus*, y separar la leche humana cruda en una fracción de nata y una fracción desnatada, conteniendo la fracción desnatada entre aproximadamente 1,0 % y aproximadamente 0,1 % de grasa. A la fracción desnatada se le añade un auxiliar de filtración y después la leche se somete a microfiltración haciendo pasar la leche a través de una serie de microfiltros con un tamaño de poro promedio suficiente para reducir el contenido bacteriano de la leche que fluye a través de los mismos, para producir un filtrado que tiene un contenido bacteriano reducido en comparación con el de la leche humana cruda inicial. La leche humana desnatada resultante tiene un contenido bacteriano muy bajo, tal como, en promedio, de aproximadamente 10^1 bacterias por mililitro o menor, con un contenido de *Bacillus cereus*, en promedio, menor de aproximadamente 10^0 (es decir, menor de aproximadamente 1) por mililitro. Este producto puede procesarse, utilizarse y/o comercializarse posteriormente como leche humana desnatada (véase, por ejemplo, la FIG 1.)

En la presente invención también se describe un método para tratar leche humana cruda para producir leche humana tratada que tiene un contenido bacteriano reducido, por ejemplo, *Bacillus cereus*, en comparación con la leche humana cruda. El método comprende tomar leche humana cruda con un posible contenido bacteriano, por ejemplo, *Bacillus cereus*, y separar la leche humana cruda en una fracción de nata y una fracción desnatada, conteniendo la fracción desnatada entre aproximadamente 1,0 % y aproximadamente 0,1 % de grasa. A la fracción desnatada se le añade un auxiliar de filtración, y la mezcla se somete a microfiltración haciendo pasar la leche a través de una serie de microfiltros con tamaño de poro promedio suficiente para reducir el contenido bacteriano de la leche que fluye a través de los mismos, para producir un filtrado que tiene un contenido bacteriano reducido en comparación con el de la leche humana cruda inicial y un concentrado que tiene un contenido bacteriano más alto en comparación con el de la leche humana cruda inicial. La leche humana desnatada resultante tiene un contenido bacteriano muy bajo, tal como, en promedio, de aproximadamente 10^1 bacterias por mililitro o menor, con un contenido de *Bacillus cereus* en promedio menor de aproximadamente 10^0 (es decir, menor de aproximadamente 1) por mililitro. Después, una fracción de nata de leche humana que tiene un nivel bajo de *Bacillus cereus* puede mezclarse con la leche humana desnatada filtrada para crear un producto de leche humana entera con un contenido bacteriano muy bajo, que incluye menos de 10^0 por mililitro de *Bacillus cereus*. Este producto puede procesarse, utilizarse y/o comercializarse posteriormente como leche humana entera (véanse, por ejemplo, las Figuras 2 y 3).

También se describe un método para tratar leche humana cruda para producir leche humana tratada que tiene un contenido bacteriano reducido, por ejemplo, *Bacillus cereus*, en comparación con el de la leche humana cruda. El método comprende tomar leche humana cruda con un posible contenido bacteriano, por ejemplo, *Bacillus cereus*, y separar la leche humana cruda en una fracción de nata y una fracción desnatada, conteniendo la fracción desnatada entre aproximadamente 1,0 % y aproximadamente 0,1 % de grasa. A la fracción desnatada se le añade un auxiliar de filtración, y la mezcla se somete a microfiltración haciendo pasar la leche a través de una serie de microfiltros con un tamaño de poro promedio suficiente para reducir el contenido bacteriano de la leche que fluye a través de los mismos, para producir un filtrado que tiene un contenido bacteriano reducido en comparación con el de la leche humana cruda inicial y un concentrado que tiene un contenido bacteriano más alto en comparación con el de la leche humana cruda inicial. La leche humana desnatada resultante tiene un contenido bacteriano muy bajo, tal como, en promedio, de aproximadamente 10^1 bacterias por mililitro o menor, con un contenido de *Bacillus cereus* en promedio menor de aproximadamente 10^0 (es decir, menor de aproximadamente 1) por mililitro. A continuación, la leche humana desnatada y filtrada se concentra mediante ultrafiltración como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2008/0124430, a un contenido de proteína entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 15 %. Después, una fracción de nata de leche humana que tiene un nivel

bajo de *Bacillus cereus* puede mezclarse con la leche humana desnatada concentrada y filtrada para crear un productor fortificante basado en leche humana con un contenido de bacterias muy bajo, incluyendo menos de aproximadamente 10^0 (es decir, menos de aproximadamente 1) por mililitro de *Bacillus cereus*. Este producto puede procesarse, utilizarse y/o comercializarse posteriormente como un fortificante basado en leche humana (véanse, por ejemplo, las Figuras 4 y 5).

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra un proceso representativo para preparar una fracción de leche desnatada filtrada a partir de leche desnatada no filtrada de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 2** muestra un proceso representativo para preparar leche entera a partir de una fracción de leche desnatada filtrada de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 3** muestra un proceso representativo para preparar leche entera estandarizada a partir de una fracción de leche desnatada filtrada de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 4** muestra un proceso representativo para preparar un fortificante a partir de leche desnatada normal de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 5** muestra un proceso representativo para preparar un fortificante a partir de una fracción de leche desnatada filtrada de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 6** muestra un proceso representativo para filtrar una fracción de leche desnatada de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, las formas en singular "un", "uno(a)", "el" y "la", incluyen referentes en plural. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una muestra" incluye una pluralidad de dichas muestras y la referencia a "la proteína" incluye la referencia a una o más proteínas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta descripción. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica de los métodos y composiciones descritos, en este documento se describen métodos, dispositivos y materiales a modo de ejemplo.

Los sólidos comprimibles, como los descritos en el presente documento, pueden incluir grasas, proteínas y/u otros nutrientes que se encuentran generalmente en la leche humana. Los sólidos comprimibles también pueden comprender bacterias, fragmentos bacterianos, esporas, otros microorganismos (por ejemplo, levaduras, etc.) y/o células desprendidas de la piel y/o piel (por ejemplo, de una mujer que produce leche).

A menos que se especifique lo contrario, todas las referencias a la "leche" en este documento se refieren a la leche humana.

Durante mucho tiempo la leche humana ha sido reconocida como el alimento ideal para los bebés prematuros y a término debido a su composición nutricional y a sus beneficios inmunológicos. La leche humana es la fuente más deseable de dichos beneficios nutricionales e inmunológicos. Sin embargo, el valor nutricional de la leche de la donante varía y existe preocupación sobre la contaminación bacteriana, vírica y de otro tipo, de la leche de la donante. Para los bebés, pero particularmente para los bebés prematuros, la situación nutricional ideal comprende la leche materna. De manera alternativa, o adicional, la madre puede extraerse la leche utilizando un extractor de leche y almacenarla, para usarla posteriormente. Aunque hay pocas contraindicaciones para la lactancia materna, algunas contraindicaciones incluyen bebés con galactosemia, y cuando las madres tienen tuberculosis activa, son positivas al VLTH (virus linfotrópico de células T humanas) I o II, reciben radioisótopos, antimetabolitos o quimioterapia, o son drogadictas. Con respecto a la infección por VIH, la situación es más complicada y el equilibrio de riesgo con respecto a beneficio debe evaluarlo un profesional.

A pesar de los efectos positivos bien documentados de la lactancia materna, la tasa de iniciación hospitalaria actual en los Estados Unidos es solo del 64 por ciento y la tasa de duración, a los 6 meses después del parto, es de alrededor del 29 por ciento. Las alternativas a la lactancia materna son el uso de leche humana de donante, de una fórmula láctea como alimentación complementaria a la leche humana, y de la fórmula láctea sola. La fortificación de la leche extraída está indicada para muchos bebés de muy bajo peso al nacer.

La *Academy of Pediatrics Policy Statement* sugiere que la leche humana conservada puede ser una alternativa de alimentación adecuada para los bebés cuyas madres no pueden o no desean (p. ej., por razones sociales) proporcionar su propia leche.

Los bebés prematuros son alimentados comúnmente con una fórmula comercial para bebés diseñada específicamente para estos bebés o con la leche de su propia madre. La investigación todavía está en curso con

respecto a los requisitos nutricionales de estos bebés. Sin embargo, numerosos estudios han documentado que la leche de pretérmino no complementada y la leche a término conservada proporcionan cantidades inadecuadas de diversos nutrientes para satisfacer las necesidades de estos lactantes (Davies, DP, "Adequacy of expressed breast milk for early growth of preterm infants," ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD, 52, p. 296-301,1997). Los requisitos energéticos estimados del crecimiento de los bebés con bajo peso al nacer son de aproximadamente 120 Cal/kg/día, aunque las necesidades energéticas exactas de cualquier bebé individual pueden variar debido a las diferencias en cuanto a la actividad, el gasto de energía basal, la eficiencia de la absorción de nutrientes, enfermedades y la capacidad de utilizar la energía para la síntesis de tejidos. Alrededor del 50 % del consumo energético se destina a las necesidades metabólicas basales, a la actividad y al mantenimiento de la temperatura corporal. Aproximadamente el 12,5 % se usa para sintetizar tejido nuevo y el 25 % se almacena. El 12,5 % restante se excreta. La leche materna de pretérmino a menudo carece de aspectos nutricionales particulares. Por ejemplo, la leche humana pretérmino a menudo carece de calcio, fósforo y proteínas. Por lo tanto, se ha recomendado que cuando los bebés prematuros se alimenten con leche humana pretérmino, la leche humana se fortifique para satisfacer mejor las necesidades nutricionales del bebé prematuro.

Similac Natural Care® y Enfamil® Human Milk Fortifier son fortificadores de leche humana disponibles en el comercio. Los fortificadores difieren con respecto a su forma, fuente de ingredientes y composición energética y nutricional. Además, estos productos son artificiales por naturaleza. En la unidad de cuidados intensivos neonatal (UCIN) existe una necesidad de fortificadores de leche humana tanto líquidos como en polvo. Idealmente, el mejor fortificador es de origen humano tal como se describe en la solicitud de Patente de Estados Unidos 2008/0124430 y en la Solicitud PCT WO 2008/027572.

La secreción de líquido de la glándula mamaria femenina humana incluye diversos constituyentes a los que se hace referencia en lo sucesivo en el presente documento simplemente como leche. La leche exprimida no es generalmente estéril y contiene bacterias incluso cuando se obtiene en condiciones asépticas. La leche también se contamina muy rápidamente con microorganismos del medio ambiente (aire, dispositivos exprimidores, contacto con manos u otros objetos no estériles, un tanque o receptáculo de leche y similares) y patógenos específicos tales como *B. cereus* se propagan rápidamente incluso en leche pasteurizada.

La leche es un excelente medio de crecimiento para numerosas bacterias, y el número de dichas bacterias puede aumentar rápidamente a menos que la leche se procese adecuadamente. El crecimiento bacteriano puede deteriorar la leche o incluso plantear un peligro grave para la salud si hay bacterias patógenas. Las enfermedades que pueden transmitirse a través de la leche incluyen, pero sin limitación, tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), fiebre ondulante (*Brucella abortus*), fiebre tifoidea y fiebre Q (*Coxiella burnetii*). La contaminación puede proceder de un donante de leche, de la persona que manipuló la leche, del ambiente, o de los envases. Otros microorganismos que se pueden encontrar en la leche contaminada incluyen, pero sin limitación, *Staphylococcus spp.* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* beta hemolítico del grupo A), *Streptococcus spp.* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*), *Shigella spp.* (por ejemplo, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae*), *E. coli* enteropatógena clásica A, B y C, *E. coli* enteroinvasiva A y B, *Bacillus spp.* (por ejemplo, *Bacillus cereus*, *Bacillus coryneform*), *Pseudomonas spp.* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.* (por ejemplo, *Streptococcus spp.* alfa-gamma hemolítico), *Klebsiella spp.* (por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*), *Enterobacter spp.* (por ejemplo, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*), *Proteus spp.* (por ejemplo, *Proteus mirabilis*), *Citrobacter spp.* (por ejemplo, *Citrobacter freundii*), *Serratia spp.*, *Neisseria spp.*, *Candida spp.*, *Enterococcus spp.* (por ejemplo, *Enterococcus* del Grupo D), *Haemophilus spp.*, *Chromobacterium spp.* (por ejemplo, *Chromobacterium violaceum*), *Cedecea spp.*, *Stenotrophomonas spp.* (por ejemplo, *Stenotrophomonas maltophilia*), *Salmonella spp.*, bacterias mesófilas, termodúricas y psicrotróficas. Se comentan más detalles sobre la contaminación bacteriana de la leche en Cairo et al. (Braz J Infect Dis. Vol.12 no.3 Salvador junio de 2008), Ruediger (The Journal of Infectious Diseases Vol. 19, No. 4, octubre de 1916), Surjono et al. (Journal of Tropical Pediatrics, 26 (2): 58 - 61, 1980), Pirraed WB et al. (Am J Perinatol. 1991 Jan; 8 (1): 25-7) y Burrow (Public Health, junio de 1931, volumen 52, n.º 6, 234-252). Surjono et al. (Journal of Tropical Pediatrics, 26 (2): 58 - 61, 1980), Pirraed WB et al. (Am J Perinatol. Enero de 1991; 8 (1): 25-7), y Burrow (Public Health, junio de 1931, vol. 52, n.º 6, 234-252).

Bacillus es un género de bacterias gram-positivas con forma de varilla y un miembro del filo *Firmicutes*. Las especies de *Bacillus* pueden ser aerobias obligadas o anaerobias facultativas, y dan positivo para la enzima catalasa. De naturaleza ubicua, *Bacillus* incluye especies independientes y patógenas. En condiciones ambientales estresantes, las células de *Bacillus* producen endosporas ovales que pueden permanecer latentes durante períodos prolongados. Desde el punto de vista médico, dos especies de *Bacillus* se consideran significativas: *B. anthracis*, que causa carbunco, y *B. cereus* que causa una enfermedad transmitida por los alimentos similar a la de *Staphylococcus*. Una tercera especie, *B. thuringiensis*, es un patógeno de insectos importante, y algunas veces se utiliza para controlar plagas de insectos. *B. subtilis* es un destacable descomponedor de alimentos, causando viscosidad en el pan y en alimentos relacionados. *B. coagulans* también causa deterioro de los alimentos. Como ejemplos no limitantes de *Bacillus* se incluyen, *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. aminovorans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinoliticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infernus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B.*

polymyxa, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. sphaericus*, *B. sporothennodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatis* y *B. weihenstephanensis*.

5 *Bacillus cereus* es una bacteria endémica, habitante del suelo, gram positiva, con forma de varilla, formadora de endosporas, aerobia facultativa y betahemolítica. *B. cereus* es mesófila, crece óptimamente a temperaturas entre 20 °C y 40 °C, y es capaz de adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales. Se distribuye ampliamente en la naturaleza y se encuentra comúnmente en el suelo como un organismo saprófito. Algunas cepas son dañinas para los seres humanos y causan enfermedades transmitidas por los alimentos, mientras que otras cepas pueden ser beneficiosas como probióticos para los animales (Ryan KJ, Ray CG (editores) (2004), Sherris Medical Microbiology (4ª edición), McGraw Hill). Es la causante del "síndrome del arroz frito".

15 Las bacterias *B. cereus* son aerobias, y al igual que otros miembros del género *Bacillus* pueden producir endosporas protectoras y por lo tanto no son susceptibles a técnicas de pasteurización rutinarias. *B. cereus* es responsable de una minoría de enfermedades transmitidas por alimentos (2-5 %), causando náuseas, vómitos y diarrea intensos. Las enfermedades ocasionadas por *Bacillus* transmitidas por alimentos se producen debido a la supervivencia de las endosporas bacterianas cuando los alimentos no se cocinan de manera adecuada. Temperaturas de cocción inferiores o iguales a 100 °C (212 °F) permiten que algunas esporas de *B. cereus* sobrevivan. Este problema se complica cuando los alimentos se refrigeran incorrectamente, lo que permite que las endosporas germinen. Los alimentos cocinados no destinados al consumo inmediato o al enfriamiento rápido y la refrigeración deben mantenerse a temperaturas superiores a 60 °C (140 °F). La germinación y el crecimiento generalmente ocurren entre 10-50 °C (50-122 °F). El crecimiento bacteriano da como resultado la producción de enterotoxinas, una de las cuales es muy resistente, al calor y al pH entre 2 y 11; la ingestión conduce a dos tipos de enfermedades, el síndrome diarreico y emético (vómito).

25 Las infecciones por *B. cereus* son particularmente peligrosas para los neonatos y conducen a una tasa de mortalidad particularmente alta en los neonatos infectados (Milliard, et al. (2003) J. Clin. Microbiol, 41 (7): 3441 - 3444 y Lequin, et al. (2005) Am. J. Neuroradiol., 26: 2137 - 2143). Como se mencionó anteriormente, *B. cereus* es una bacteria patógena, formadora de esporas, que no se inactiva mediante la pasteurización, como es el caso de la mayoría de las otras bacterias que se encuentran en la leche humana. Si bien no existen pautas gubernamentales para niveles aceptables de *B. cereus* en productos nutricionales suministrados a neonatos, a raíz de la gran precaución debida a la alta tasa de mortalidad asociada a infecciones por *B. cereus* en neonatos, hemos establecido un límite inferior a 1 UFC/ml para nuestro producto lácteo humano final.

35 Los términos bebé "prematuro", "antes de término" y "de bajo peso al nacer (BPN)" se utilizan indistintamente y se refieren a bebés nacidos con menos de 37 semanas de edad gestacional y/o con un peso al nacer inferior a 2500 g. Las necesidades del bebé prematuro son particularmente acuciantes. Para los bebés con muy bajo peso al nacer (<1500 g), la mortalidad antes de 1 año es del 25 %. Para bebés con bajo peso al nacer (<2500 g), la mortalidad con 1 año es del 2 por ciento; aun considerablemente mayor que la cifra de 0,25 por ciento para los bebés con peso normal al nacer (> 2500 g).

40 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para obtener y procesar leche humana de un donante o de un grupo de donantes. Los métodos de la divulgación incluyen procesos que reducen el contenido bacteriano mientras que mantienen el valor nutritivo en una preparación fortificada. En general, los métodos incluyen medidas para identificar y cualificar donantes adecuados. Los individuos generalmente son recomendados como donantes por su médico de cabecera. Entre otras razones, esto ayuda a garantizar que los donantes no estén crónicamente enfermos. En la solicitud de patente de Estados Unidos 2010/0268658 se describen métodos y sistemas para cualificar y controlar la recogida y distribución de la leche.

50 Se realiza un proceso de exploración por entrevista, así como el procesamiento de muestras biológicas. Una muestra biológica se explora para detectar virus (p. ej., VIH 1 y 2, VLTH I y II, VHB y VHC) y sífilis, así como otros patógenos procariotas (p. ej., *B. cereus*) y se descartan las donaciones con resultados positivos.

55 Cualquier posible muestra cuyo resultado sea positivo en la exploración se retira del procesamiento y al donante de otras donaciones. Sin embargo, otra medida que se toma consiste en analizar una muestra o un conjunto de muestras de leche de donante para detectar drogas causantes de adicción.

60 Los donantes pueden recalificarse periódicamente. Por ejemplo, cada cuatro meses se puede requerir que un donante se someta a una exploración con el mismo protocolo que se utilizó en su cualificación inicial. Un donante que no se recalifica, o que no se cualifica, se difiere hasta el momento en que se vuelva a cualificar adecuadamente. En algunos casos, la donante se difiere permanentemente si los resultados de exploración de la recualificación lo justifican. En el caso de esta última situación, la leche restante proporcionada por esa donante se retira del inventario y se destruye.

65 Una donante cualificada puede donar en una instalación designada (por ejemplo, en una dependencia del banco de leche) o, por lo general, se extrae la leche en su domicilio. En un aspecto, a la donante cualificada se le proporciona en su domicilio los suministros necesarios para la recogida, conservación y envío de la leche extraída a través de un

banco de leche o directamente desde un procesador de leche (el banco de leche y el procesador pueden ser las mismas entidades o diferentes). Los suministros generalmente comprenderán un código legible por ordenador (por ejemplo, una etiqueta de código de barras) en los envases y pueden incluir además un extractor de leche. La donante puede entonces extraer y congelar la leche en su domicilio, preferiblemente a una temperatura de -20 °C.

5 En un aspecto, se acepta la leche de la donante siempre que los resultados del análisis de sangre sean satisfactorios 10-14 días después de la última visita al centro de leche de la donante; si dichos resultados son satisfactorios, se realiza una cita para que la donante deposite la leche en el centro o la recoja en su domicilio. El estado de la leche y del envase se examina y la información del código de barras se compara con la de la base de datos. Si el resultado es satisfactorio, las unidades se colocan en el centro de leche de la donante o en el congelador
10 del centro de procesamiento (- 20 °C) hasta que estén listas para su análisis y procesamiento posterior.

En otro aspecto, la donante se extrae la leche en su domicilio y después se recoge en la instalación de banco de leche, donde este proceso implica el muestreo de la leche de cada donante para que los marcadores garanticen que la leche provenga realmente de la donante registrada. Esto es necesario para garantizar que la leche provenga de la donante indicada en la muestra de leche enviada al procesador y no se recoja en persona. Dichas técnicas de identificación de sujeto son conocidas en la materia (véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 2007/035870). La leche puede conservarse (por ejemplo, a -20 °C) y ponerse en cuarentena hasta que se reciban los resultados del análisis.

15 A lo largo del proceso anterior, cualquier muestra de leche no conforme se descarta. Como ocurre en los centros de donación de sangre, el acceso a toda la información confidencial sobre la donante, incluidos los datos de análisis de sangre, está estrictamente controlado. La leche recogida, aprobada (por ejemplo, aprobada la prueba de factor de riesgo) se filtra después por los métodos de la presente invención.

Por "leche cruda" se entiende leche no tratada extraída de una madre.

25 Por "leche entera" se entiende leche cuya grasa no se ha eliminado.

Por "desnatada" o "leche desnatada" se entiende leche entera menos todo o parte del contenido de grasa. Por lo tanto, puede apreciarse que la "leche desnatada" incluye variantes tales como "leche semidesnatada" en la que se ha eliminado menos que sustancialmente todo el contenido de grasa.

30 Por "nata" o "parte grasa" se entiende la parte de leche entera separada de la leche desnatada. Generalmente, la nata comprende ácidos grasos de cadena larga, media y corta a una concentración más alta que la de leche desnatada obtenida de la misma preparación.

35 En la presente invención, la leche humana entera se separa en leche desnatada y nata (es decir, grasa). La leche se desgrasa en leche desnatada mediante métodos convencionales tales como centrifugación. En un aspecto, la leche agrupada se bombea a una centrífuga para separar la grasa (nata) del resto de la leche cuya leche desnatada se transfiere a un tanque de procesamiento donde permanece a 2-8 °C hasta la(s) etapa(s) de filtración. Después de la centrifugación, la nata fluye al interior de un pequeño recipiente de acero inoxidable. En un aspecto, la nata se pasteuriza y después se cuantifica el contenido calórico, proteico y graso. En otro aspecto, después de finalizar la separación, se determina el volumen, y el contenido proteico y graso de la nata y se añade de nuevo una parte de la nata a la leche desnatada para obtener el contenido calórico, proteico y graso del producto específico que se está fabricando.

40 Aunque no es necesario, se reconocerá que las composiciones de leche humana de la divulgación pueden modificarse o complementarse con constituyentes no naturales o heterólogos/heterogéneos. Por ejemplo, el contenido proteico puede ajustarse o modificarse utilizando una fuente de nitrógeno adecuada para el consumo humano. Dichas proteínas son muy conocidas por los expertos en la técnica y pueden seleccionarse fácilmente cuando se prepara dicha composición. Como ejemplos de constituyentes proteicos adecuados que pueden añadirse se incluyen caseína, suero, leche desnatada condensada, leche desgrasada, soja, guisante, arroz, maíz, proteína hidrolizada, aminoácidos libres, fuentes de proteínas que contienen calcio en una suspensión coloidal con la proteína y sus mezclas.

45 Otro constituyente de las composiciones lácteas de la divulgación comprende una fuente de grasa. Generalmente, la grasa es una fuente de energía para los bebés con bajo peso al nacer (BPN), no solo por su alta densidad calórica, sino también por su baja actividad osmótica en solución. De nuevo, aunque no es necesario, las composiciones lácteas de la divulgación pueden complementarse con constituyentes grasos. Dichos constituyentes grasos heterólogos/heterogéneos incluyen aceite de cártamo de alto contenido oleico, aceite de soja, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media, aceite MCT), aceite de girasol de alto contenido oleico, aceite de maíz, aceite de colza, coco, palma y palmiste, aceite de origen marino, aceite de semilla de algodón y ácidos grasos específicos tales como ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico.

50 El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso omega-3. El DHA es el AGP (ácido graso poliinsaturado) omega-3 de 20 carbonos más abundante en la leche humana. Sin embargo, el contenido de DHA en la leche humana variará mucho dependiendo de la dieta de la madre. Si la madre come pescado rico en DHA a menudo, su

leche contendrá niveles más altos de DHA, mientras que una madre con menos acceso al pescado tendrá niveles más bajos de DHA en su leche. En consecuencia, la leche humana puede requerir complementación con DHA para garantizar que el bebé prematuro esté recibiendo cantidades suficientes de DHA. La complementación con DHA generalmente viene acompañada de complementos de ácido araquidónico. En la patente de Estados Unidos No. 5.492.938 de Kyle et al., se describe un método de obtención de DHA a partir de dinoflagelados y su uso en una composición farmacéutica y complementos dietéticos.

Los hidratos de carbono son otro constituyente de las composiciones de la divulgación.

Los hidratos de carbono proporcionan una fuente de energía fácilmente disponible que ayuda al crecimiento y que reduce el riesgo de catabolismo tisular que da como resultado niños desnutridos que se desarrollan rápidamente. En la leche humana y en la mayoría de las fórmulas infantiles estándar a base de leche, el hidrato de carbono principal es la lactosa. Los bebés BPN (bajo peso al nacer) no pueden digerir completamente la lactosa debido a que la actividad de la lactasa en el intestino fetal no está completamente desarrollada hasta finales de la gestación (36 a 40 semanas). Por otro lado, la actividad de la sacarasa es máxima a las 32 semanas de gestación, y la actividad de la glucoamilasa, que digiere sólidos de jarabe de maíz (polímeros de glucosa), aumenta dos veces más rápido que la actividad de la lactasa durante el tercer trimestre. Las composiciones de leche humana de la divulgación pueden complementarse con hidratos de carbono. Como ejemplos de hidratos de carbono que pueden utilizarse para complementar las composiciones de leche humana de la divulgación se incluyen, pero sin limitación, almidón de maíz hidrolizado, maltodextrina, polímeros de glucosa, sacarosa, jarabe de maíz, sólidos de jarabe de maíz, jarabe de arroz, glucosa, fructosa, lactosa, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa y oligosacáridos indigeribles tales como fructooligosacáridos (FOS).

Las vitaminas y los minerales son importantes para la nutrición y el desarrollo adecuados de un bebé. Un bebé prematuro o un bebé BPN requieren electrólitos tales como sodio, potasio y cloruro para el crecimiento y el equilibrio ácido-base. También se necesitan consumos suficientes de estos electrolitos para reemplazar las pérdidas en la orina y las heces y de la piel. El calcio, fósforo y magnesio son necesarios para la correcta mineralización ósea. Para que los huesos crezcan, en la alimentación debe haber cantidades adecuadas de estos minerales.

Los oligoelementos están asociados con la división celular, la función inmunitaria y el crecimiento. Consecuentemente, se necesitan cantidades suficientes de oligoelementos para el crecimiento y desarrollo del bebé. Los oligoelementos que son importantes incluyen cobre, magnesio y hierro (que es importante para la síntesis de hemoglobina, mioglobina y de enzimas que contienen hierro). El zinc es necesario para el crecimiento, para la actividad de numerosas enzimas y para la síntesis de ADN, ARN y proteínas. El cobre es necesario para la actividad de diversas enzimas importantes. El manganeso es necesario para el desarrollo de hueso y cartílago y es importante en la síntesis de polisacáridos y glicoproteínas. Por consiguiente, las composiciones de leche humana y fortificante de la divulgación pueden complementarse con vitaminas y minerales.

La vitamina A. es una vitamina liposoluble esencial para el crecimiento, la diferenciación celular, la visión y el sistema inmunitario. La vitamina D es importante para la absorción de calcio y, en menor medida, de fósforo y para el desarrollo de huesos. La vitamina E (tocoferol) impide la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en la célula, impidiendo así el daño tisular. El ácido fólico es importante en el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos. Se ha demostrado que las concentraciones séricas de folato caen por debajo de lo normal después de las 2 semanas de edad en bebés BPN con una ingesta baja de ácido fólico. Además, diversas vitaminas B están presentes a bajas concentraciones en la leche de pretérmino.

Como se describió anteriormente, la variabilidad de las concentraciones de vitaminas y minerales en la leche humana y las mayores necesidades del bebé prematuro requieren una fortificación mínima para garantizar que un bebé en desarrollo esté recibiendo cantidades adecuadas de vitaminas y minerales. Como ejemplos de vitaminas y minerales complementarios en la composición de leche humana y fortificante de la divulgación se incluyen vitamina A, vitamina B, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, niacina, m-inositol, calcio, fósforo, magnesio, zinc, manganeso, cobre, sodio, potasio, cloruro, hierro y selenio. Los nutrientes adicionales cromo, molibdeno, yodo, taurina, carnitina y colina también pueden requerir complementación. Se proporcionan composiciones estériles carentes o carentes sustancialmente de contaminación bacteriana, que incluyen sin limitación, carecer o carecer sustancialmente de *B. cereus*, incluido un producto de leche entera de 67 Kcal/dl (20 calorías por onza), un producto de leche entera de 80 kcal/dl (24 calorías por onza), y un fortificador de leche humana. Dependiendo del contexto particular, se considera que una composición carece sustancialmente de bacterias, o carece sustancialmente de un género bacteriano, una especie (por ejemplo, *B. cereus*) o una cepa bacteriana, cuando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) es <1, o ≤1, o ≤2, o ≤3, o ≤4, o ≤5, o ≤10, o ≤20, o ≤30, o ≤40, ≤50 o ≤100. Las composiciones fortificantes de la leche comprenden de aproximadamente 20 a 70 mg/ml de proteína, de aproximadamente 35 a 85 mg/ml de grasa, de aproximadamente 70 a 115 mg/ml de hidratos de carbono y contienen IgA humana. Se pueden obtener diversas composiciones calóricas utilizando los métodos de la divulgación. Las composiciones a modo de ejemplo son una composición láctea de 24 calorías y una composición láctea fortificante.

Una composición a modo de ejemplo de leche entera comprende los siguientes constituyentes: leche humana,

glicerofosfato de calcio, citrato de potasio, gluconato de calcio, carbonato de calcio, fosfato de magnesio, cloruro de sodio, citrato de sodio, sulfato de zinc, sulfato cúprico y sulfato de manganeso.

5 La composición fortificante comprende los siguientes constituyentes: leche humana, carbonato de calcio, fosfato de potasio, fosfato de calcio, glicerofosfato de calcio, gluconato de calcio, citrato de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, fosfato de magnesio, sulfato de zinc, sulfato cúprico y sulfato de manganeso. En algunas realizaciones, el fortificante también contiene aproximadamente 35-85 mg/ml de proteína humana, aproximadamente 60-110 mg/ml de grasa, y aproximadamente 60-140 mg/ml de hidratos de carbono. En una realización, el fortificante contiene aproximadamente 90 mg/ml de grasa, aproximadamente 60-90 mg/ml de hidratos de carbono y aproximadamente 60 mg/ml de proteína humana.

15 La osmolaridad de las composiciones de leche humana y el fortificante de la divulgación son importantes para la adsorción, absorción y digestión de las composiciones. Una osmolaridad inadecuada puede provocar distensión abdominal y vómitos al bebé. La osmolaridad de la composición de la leche humana y del fortificante (una vez mezclado con leche) de la divulgación es generalmente inferior a aproximadamente 400 mOsm/kg de H₂O. Generalmente, la osmolaridad es de aproximadamente 310 mOsm/kg de agua a aproximadamente 380 mOsm/kg de agua. Cuando una composición de la divulgación se complementa con un hidrato de carbono o constituyente de grasa, la osmolaridad de las composiciones debe ajustarse. Por ejemplo, el tipo de constituyente (p. ej., hidrato de carbono o grasa) afecta a la osmolaridad de la leche humana fortificada. Cuanto más hidrolizado esté el hidrato de carbono, mayor será la actividad osmótica. Además, las fuentes de hidrato de carbono parcialmente hidrolizadas pueden aumentar aún más la osmolaridad cuando se reconstituyen con leche humana debido a una hidrólisis adicional por la amilasa de la leche humana. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el hidrato de carbono o la combinación de hidratos de carbono que dará como resultado la osmolaridad deseada de la composición reconstituida de fortificante/leche humana.

25 El fortificante generalmente se mezcla con leche humana para añadir 4 cal/onza. Por lo general, esta es una mezcla 80:20 de leche cruda; fortificante (por ejemplo, 8 ml de leche y 2 ml de fortificante). Otras mezclas típicas incluyen 70:30; 60:40; y 50:50, aunque en la presente invención se contempla cualquiera y todas las proporciones relativas o cantidades de leche con respecto a fortificante.

30 El fortificante generalmente viene en jeringas o frascos. Se puede incluir un frasco con las jeringas. En cualquier caso, el kit de la jeringa (p. ej., jeringa y frasco) o los frascos pueden incluir marcadores graduados (es decir, indicadores, líneas, etc.) para ayudar a una dilución adecuada. Por ejemplo, la leche materna puede analizarse para determinar su valor nutricional. La leche típica comprende, en promedio, 1,1 % de proteína, 4,2 % de grasa, 7,0% de lactosa (un azúcar), y suministra 70 kcal de energía por cada 100 gramos. La leche materna puede analizarse para determinar el valor nutricional y después ajustarse utilizando una composición fortificante de la divulgación para añadir 4 cal/onza a la leche materna cruda.

40 Una "dosis unitaria" se refiere a envases individuales de fortificante que contienen una cantidad de fortificante que se utilizará en una preparación láctea para el bebé. La cantidad de leche humana fortificada preparada para un bebé prematuro generalmente varía de 25 ml a 150 ml al día. En consecuencia, una sola dosis unitaria es la cantidad apropiada de fortificante para fortificar una preparación láctea de 8 a 40 ml. Se pueden añadir dosis unitarias adicionales para volúmenes más grandes. Por lo tanto, una dosis unitaria es 2 ml de fortificante por 8 ml de leche cruda o 10 ml de fortificante por 40 ml de leche. En un aspecto, la dosis unitaria comprende una jeringa de 10 ml y puede comprender marcas graduadas de 2 ml suficientes para preparar múltiples preparaciones lácteas.

50 Generalmente, la cantidad de leche humana preparada se basa en la cantidad de leche necesaria para proporcionar a un lactante un suministro nutricional de 24 horas. Por ejemplo, un lactante con un peso de 1500 gramos recibiría 150 ml de leche al día. Si se utiliza leche congelada, esta se coloca en un baño de agua tibia hasta que se descongele por completo. Se presta especial atención a la mezcla en los fortificantes. Se requiere una mezcla suave para evitar romper el glóbulo de grasa de la leche, que puede aumentar la adherencia de la grasa de la leche en los lados de los envases de alimentación y dar como resultado una pérdida significativa de grasa (energía). La cantidad prescrita de leche fortificada se prepara en jeringas y se etiqueta con una identificación. Cuando finaliza la preparación láctea, las tomas etiquetadas y divididas en partes alícuotas, se envían a la sala de neonatología y se colocan en frigoríficos para facilitar su acceso al personal de enfermería. Generalmente, la leche fortificada refrigerada se calienta antes de la alimentación. Por ejemplo, la leche fortificada se calienta en una incubadora de laboratorio de calor seco ajustada a un intervalo de temperatura de aproximadamente 35-45 °C durante aproximadamente 15 minutos. Esto hace que la temperatura de la leche fortificada esté a temperatura ambiente. La leche fortificada se puede administrar al bebé como una alimentación en bolo o a través de una bomba de infusión de jeringa para la alimentación continua. Si se utiliza una bomba de infusión, la punta de la jeringa se coloca en posición vertical para permitir una infusión continua de grasa y la jeringa se conecta directamente al tubo de alimentación para disminuir el área de superficie potencial a la que la grasa y los componentes inmunológicos pueden adherirse.

65 La divulgación proporciona una composición de leche humana y fortificante que no es xenogénica y que proporciona proteínas humanas que se ha demostrado que promueven el desarrollo inmunológico y el crecimiento

infantil. Además, las composiciones de leche humana y fortificante de la divulgación se toleran bien y maximizan los beneficios para la salud de la leche humana al tiempo que abordan la variabilidad de la leche humana como fuente de energía, proteínas, calcio, fósforo, sodio y otros micronutrientes.

5 Los envases de tamaño de dosis unitaria individual se suelen utilizar en envases a granel. Debido a los pequeños volúmenes de leche administrados a los bebés prematuros durante un día de alimentación, se preparan pequeños volúmenes de leche humana fortificada. La esterilidad en un recipiente a granel que se ha abierto varias veces, dividido y conservado en partes alícuotas, siempre es una preocupación en un entorno hospitalario. Las dosis unitarias individuales permiten la adición de pequeñas cantidades de fortificante a la leche humana sin la posibilidad de contaminación del fortificante restante.

10 Se dispone con facilidad de numerosos tipos de recipientes y una persona que practique la técnica los conoce. Como ejemplos de tipos de recipientes útiles en los métodos y composiciones de la divulgación se incluyen frascos, jeringas y latas (por ejemplo, de metal, vidrio o plástico).

15 Como se indicó anteriormente, la presente divulgación también se refiere a un método para proporcionar nutrición a bebés prematuros mediante la adición del fortificante de la divulgación a la leche humana para ajustar la leche humana cruda a un contenido nutricional deseado y administrar la leche humana fortificada a un bebé prematuro. La divulgación proporciona además un método para promover el crecimiento de un bebé prematuro administrando a dicho bebé una leche humana fortificada.

20 La parte de leche desnatada obtenida carece de bacterias, hongos y esporas. La nata filtrado se conserva después por separado o se recombina con la parte de grasa después de la filtración. Cuando la nata se conserva por separado, puede recombinarse posteriormente con una porción de grasa antes del consumo. Como alternativa, la parte desnatada puede ser consumida. La leche desnatada y/o recombinada puede conservarse durante largos periodos de tiempo preferiblemente a temperatura inferior a la ambiental y más preferiblemente a 4 °C.

25 En la FIG. 6 se ilustra un ejemplo de un equipo (también denominado aparato en el presente documento) que puede utilizarse en la presente invención. Un recipiente de proceso con camisa (100), conectado a un sistema de glicol frío para mantener la temperatura del recipiente, se llena con leche humana cruda.

30 El recipiente de proceso con camisa (100) está conectado a una bomba (200) que está conectada a un separador de leche (300). El puerto del separador de leche desnatada (300) está conectado a un recipiente de proceso receptor con camisa (400). El recipiente de proceso receptor con camisa (400) está conectado a un sistema de glicol frío para mantener la temperatura del recipiente. La leche humana cruda se bombea, con la bomba (200), desde el recipiente de proceso con camisa (100) a través del separador de leche (300), fluyendo la fracción desnatada al recipiente de proceso receptor con camisa (400). Como resultado, el recipiente de proceso receptor con camisa (400) contiene la fracción desnatada de la leche humana cruda.

35 Como se usa en este documento y dependiendo del contexto particular, el equipo puede referirse a componentes individuales o a piezas del equipo, o referirse colectivamente a dos o más componentes o equipos diferentes, o referirse a todos los componentes o equipos utilizados en los procesos de la presente invención. Los diversos componentes del equipo pueden estar en contacto físico directo como en un sistema continuo, relacionado dentro de una sola planta de producción o, como alternativa, uno o más componentes individuales o piezas del equipo se pueden separar físicamente según sea necesario. Por lo tanto, en algunas realizaciones, todos los equipos a modo de ejemplo mostrados en las figuras pueden estar juntos en la misma sala o en salas diferentes, estén o no directamente conectados. En algunas realizaciones, uno o más componentes o piezas del equipo se pueden ubicar en el mismo edificio o en diferentes edificios, estén o no directamente conectados. En otras realizaciones, uno o más componentes o piezas del equipo se pueden ubicar en la misma localización geográfica o en diferentes localizaciones geográficas. Por lo tanto, los métodos y sistemas de la presente invención incluyen tener varios componentes o piezas del equipo, físicamente separados dentro de salas o entre salas y requieren transferencia física de la leche y de los productos lácteos al siguiente componente o pieza de equipo en el sistema. Nada en la presente descripción debe interpretarse de modo que los equipos y sistemas que se muestran y describen en este documento deban estar en cualquier orden o disposición física particular siempre que las etapas de la presente invención se realicen tal como se describe en el presente documento. Un experto en la técnica comprenderá las diversas disposiciones de equipos posibles para llevar a cabo la presente invención.

40 El recipiente de proceso auxiliar de filtración (500) está conectado al recipiente de proceso receptor con camisa (400) y el recipiente de proceso auxiliar de filtración (500) se llena con auxiliar de filtración. El auxiliar de filtración se transfiere desde el recipiente de proceso auxiliar de filtración (500) al recipiente de proceso receptor con camisa (400). Durante el proceso, en el recipiente de proceso receptor con camisa (400) se mantiene una mezcla constante.

45 El recipiente de proceso receptor con camisa (400) está conectado a la bomba (600) que después se conecta al puerto de entrada de la carcasa del prefiltro (700). El filtro en la carcasa prefiltro (700) contiene un filtro con un tamaño de poro entre 1 y 10 µm. El puerto de salida de la carcasa prefiltro (700) está conectado al puerto de entrada de la carcasa del microfiltro (800). El filtro en la carcasa del microfiltro (800) contiene un filtro con un tamaño de poro

entre 0,2 y 1 μm . El puerto de salida de la carcasa del microfiltro (800) está conectado al recipiente de proceso con camisa de la fracción desnatada filtrada (900), que está conectado a un sistema de glicol frío para mantener la temperatura deseada del recipiente.

5 La fracción desnatada de leche humana mezclada con auxiliar de filtración en el recipiente de proceso receptor con camisa (400) se bombea, con la bomba (600), a través de la carcasa prefiltro (700) que contiene un filtro con un tamaño de poro entre 1 a 10 μm . El filtrado, la parte de la fracción de leche desnatada que pasa a través del filtro, pasa después a través de la carcasa del microfiltro (800). El filtrado de esta operación se recoge en un recipiente de proceso con camisa de la fracción desnatada filtrada (900). Esta leche humana desnatada filtrada no contiene, o
10 tiene un contenido bacteriano reducido (en relación con la leche antes de la microfiltración), con un cambio mínimo en el contenido graso y proteico. Después, la fracción de filtrado puede utilizarse directamente para preparar otros productos, tales como leche desnatada humana, leche entera humana o fortificante de leche humana a partir de leche 100 % humana.

15 La fracción filtrada superior a la leche humana, obtenida por técnicas de pasteurización convencionales (temperatura y presión ultra alta) que destruirían a las bacterias formadoras de esporas y psicrófilas como *Bacillus cereus*, ya que esas técnicas de pasteurización también cambian la forma y función de las grasas y proteínas de la leche humana. Además, la leche humana obtenida de acuerdo con la presente invención es más segura porque las bacterias, tales como las bacterias psicrófilas, especialmente *Bacillus cereus*, pueden eliminarse aplicando la
20 presente invención.

La primera fracción concentrada, que es la parte de la fracción de leche desnatada humana que queda retenida por, y se recupera de, la superficie de la membrana de retención del prefiltro (700), consiste en leche humana con un contenido bacteriano aumentado y en el auxiliar de filtración que se añadió a la fracción de leche desnatada humana
25 en un recipiente de proceso con camisa (400). Por lo tanto, la fracción concentrada se desecha posteriormente debido a su contenido bacteriano aumentado y al auxiliar de filtración.

La segunda fracción concentrada, que es la parte de la fracción de leche desnatada humana que queda retenida por, y se recupera de, la superficie de la membrana de retención del microfiltro (800), también consiste en leche humana con un contenido bacteriano aumentado y, por lo tanto, también se desecha posteriormente.
30

El filtrado resultante carece de auxiliar de filtración y contiene, si hubiese, un nivel insignificante de bacterias. En ciertas realizaciones, el filtrado resultante se pasteuriza a bajas temperaturas durante al menos 30 minutos en etapas de procesamiento adicionales para destruir cualquier bacteria remanente.
35

Filtración

En la presente invención, la filtración se realiza en dos etapas: filtración previa con un auxiliar de filtración y microfiltración. La forma física particular de las membranas no es crítica. Por lo tanto, el medio de membrana puede
40 tomar la forma de discos o cilindros, por ejemplo. En general, el prefiltro y el microfiltro comprenden una membrana. Las fracciones de leche humana se impulsan a través del filtro con una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica, para obligar al producto a pasar a través de las membranas del filtro.

La prefiltración se utiliza para filtrar partículas grandes de la fracción de leche humana antes de que el producto se filtre a través de un microfiltro. Esto es necesario porque la fracción de leche humana tiene demasiadas partículas grandes por unidad de volumen y obstruiría el microfiltro. Sin embargo, incluso utilizando una etapa de prefiltración (tamaño de poro entre 1 .0 y 10 μm), la fracción de leche humana puede obstruir el prefiltro. Esto es causado por sólidos comprimibles en la leche humana, que forman una masa impermeable que podría obstruir el filtro. Para remediar esta situación causada por sólidos comprimibles, se mezcla un auxiliar de filtración con la fracción de leche humana.
50

Filtros

Los filtros utilizados en los procesos de filtración y/o microfiltración descritos en este documento pueden comprender cualquiera de los materiales de filtro y/o conjuntos de filtro básicamente disponibles en el comercio. Los materiales de filtro típicos pueden ser sustancialmente no reactivos (p. ej., no reaccionarán químicamente con y/o modificarán los materiales que pasan a través de ellos) y generalmente no interaccionarán (por ejemplo, absorberán o adsorberán) materiales que son lo suficientemente pequeños como para pasar a través de los poros del material de filtro. Un ejemplo de material de filtro empleado en filtros y/o conjuntos de filtros disponibles en el comercio, y que puede ser adecuado para su uso en el presente proceso de filtración y/o microfiltración, es el politetrafluoroetileno (PTFE), aunque en el comercio se dispone de muchos otros materiales de filtro poliméricos equivalentes y pueden emplearse en los presentes procesos de filtración y/o microfiltración. Por ejemplo, otros materiales de filtro adecuados pueden incluir nailon, polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE) y microfibra de vidrio. Además, los materiales de filtro como los descritos en este documento, pueden presentar diferentes grados de hidrofilia o hidrofobia, y, en consecuencia, puede seleccionarse un material de filtro para minimizar las interacciones electrostáticas con los sólidos en la fracción de leche a filtrar.
65

Los tamaños de poro pueden seleccionarse para obtener resultados de filtración deseados (por ejemplo, un recuento específico de UFC de *B. cereus* después de la filtración). Los tamaños de poro del filtro pueden ser inferiores a aproximadamente 5 µm (por ejemplo, inferiores a aproximadamente 4 µm, inferiores a aproximadamente 3 µm, inferiores a aproximadamente 2 µm, inferiores a aproximadamente 1 µm, inferiores a aproximadamente 0,9 µm, inferiores a aproximadamente 0,8 µm, inferiores a aproximadamente 0,7 µm, inferiores a aproximadamente 0,6 µm, inferiores a aproximadamente 0,5 µm, inferiores a aproximadamente 0,4 µm, inferiores a aproximadamente 0,3 µm, inferiores a aproximadamente 0,2 µm, inferiores a aproximadamente 0,1 µm o cualquier otro valor o intervalo de valores en el mismo o en el siguiente).

10 **Auxiliares de filtración**

La expresión "auxiliar de filtración" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material particulado, que por lo general tiene alta porosidad y baja densidad. Como ejemplos de auxiliares de filtración pueden incluirse tierra de diatomeas, conocidos genéricamente como Celite o *kieselguhr*, o conocidos con numerosos nombres comerciales patentados bajo los cuales se comercializan diversas variedades tratadas y no tratadas de tierra de diatomeas. En este documento puede utilizarse indistintamente el nombre de auxiliar de filtración, Celite y tierra de diatomeas (y sus variaciones gramaticales o diversos nombres comerciales patentados de los mismos).

La tierra de diatomeas comprende restos fosilizados de diatomeas, un tipo de alga de caparazón duro. Estos restos fosilizados son muy permeables y porosos, y en consecuencia, son adecuados para aplicaciones de filtración. Sin embargo, también pueden emplearse materiales producidos sintéticamente (por ejemplo, materiales poliméricos, etc.) siempre que no modifiquen químicamente o reaccionen con la leche de una manera no deseada. Los ejemplos de auxiliares de filtración útiles pueden incluir sílice, celulosa de madera y perlita. Además, los auxiliares de filtración naturales o sintéticos deben tener suficiente porosidad para permitir que el producto de leche desnatada fluya libremente a través de ellos mientras que retienen de manera eficaz las grasas lácteas y/u otros sólidos en la almohadilla auxiliar de filtración formada durante un proceso de filtración. El auxiliar de filtración puede tener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 100 µm (por ejemplo, de aproximadamente 1 µm, aproximadamente 2 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 15 µm, aproximadamente 20 µm, aproximadamente 30 µm, aproximadamente 40 µm, aproximadamente 50 µm, aproximadamente 75 µm, aproximadamente 100 µm o cualquier otro valor o intervalo de valores en el mismo). El auxiliar de filtración se selecciona generalmente con un tamaño de partícula mayor que los poros del filtro a través del cual pasará el filtrado. El auxiliar de filtración de partículas puede tener tamaños de partículas relativamente uniformes, o puede tener un intervalo de tamaños de partículas (por ejemplo, como se describió anteriormente). El auxiliar de filtración puede ser estéril, y opcionalmente, también puede tratarse o modificarse químicamente (por ejemplo, el pH del mismo puede ser ácido o básico, el material puede calcinarse, etc.). Dicho tratamiento o modificación química puede ayudar a eliminar ciertos componentes en el producto lácteo, (por ejemplo, aquellos que pueden precipitarse al contacto con el auxiliar de filtración ácido o básico). Como alternativa, el tratamiento, tal como la calcinación, puede endurecer las partículas del auxiliar de filtración, proporcionando resistencia mecánica adicional al auxiliar de filtración de forma que no se comprima ni se deforme mecánicamente al aplicar presión durante un proceso de filtración.

Los auxiliares de filtración pueden utilizarse en forma de una "almohadilla" o capa a través de la cual se puede pasar una suspensión, para eliminar y/o retener la materia particulada suspendida. Sin embargo, dado que los auxiliares de filtración son materiales muy porosos, y también muy absorbentes, pueden suspenderse en el líquido a filtrar (por ejemplo, leche desnatada), absorbiendo el líquido de la mezcla a filtrar y formar una suspensión. Después de mezclar para formar una suspensión que incluye el auxiliar de filtración, la suspensión se puede pasar después sobre un filtro o microfiltro convencional (por ejemplo, como se describe en este documento). El filtro retiene el auxiliar de filtración y los sólidos arrastrados en la solución (es decir, el retenido o concentrado), y cuando la suspensión pasa y el filtro y el filtrado pasan, el auxiliar de filtración se acumula en una "almohadilla" que contiene sólidos arrastrados, que en sí mismo continúa actuando como un filtro, formando efectivamente un filtro tridimensional que continúa atrapando y eliminando sólidos mientras que permite que fluya materia particulada fluida o muy fina. Como el auxiliar de filtración es muy poroso, la almohadilla puede seguir aumentando sin obstruir el filtro a través del cual pasa el filtrado, pero no almohadilla de auxiliar de filtro.

En el presente proceso y métodos de filtración, puede añadirse un auxiliar de filtración en cantidades que varían de aproximadamente 10 gramos a aproximadamente 100 gramos de auxiliar de filtración por 500 ml de leche (por ejemplo, de aproximadamente 20 gramos a aproximadamente 60 gramos, de aproximadamente 30 gramos a aproximadamente 50 gramos, o cualquier otro valor o intervalo de valores en el mismo). La cantidad de auxiliar de filtración puede seleccionarse para maximizar la filtración y/o minimizar la obstrucción del filtro a la vez que se minimiza la cantidad de auxiliar de filtración requerida. En algunas realizaciones, el auxiliar de filtración está presente a aproximadamente 20 g/l, a aproximadamente 25 g/l, a aproximadamente 30 g/l, a aproximadamente 35 g/l, a aproximadamente 40 g/l, a aproximadamente 45 g/l o a aproximadamente 50 g/l.

En el presente proceso y métodos de filtración, el auxiliar de filtración puede seleccionarse con una permeabilidad tal que los sólidos que pueden obstruir un filtro aguas abajo, o los sólidos no deseados (por ejemplo, bacterias) sean eliminados por el auxiliar de filtración, mientras que otros sólidos deseados (p. ej. proteínas) se dejan pasar a

través del auxiliar de filtración, "Permeabilidad", como se usa en este documento, se refiere a la medida de la capacidad de un material poroso para permitir que los líquidos lo atraviesen. Por lo tanto, los auxiliares de filtración adecuados para su uso en los presentes métodos pueden tener una permeabilidad (Darcy) que varía de aproximadamente 0,100 a aproximadamente 1.000, de aproximadamente 0,200 a aproximadamente 0,800, de aproximadamente 0,300 a aproximadamente 0,700 o de aproximadamente 0,400 a aproximadamente 0,600. Como alternativa, el auxiliar de filtración puede tener una permeabilidad de aproximadamente 0,100, de aproximadamente 0,200, de aproximadamente 0,300, de aproximadamente 0,400, de aproximadamente 0,500, de aproximadamente 0,600, de aproximadamente 0,700, de aproximadamente 0,800, de aproximadamente 0,900 o de aproximadamente 1.000. En unidades del SI, 1 Darcy equivale a $9,87 \times 10^{-13} \text{ m}^2$. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el auxiliar de filtración puede seleccionarse con una permeabilidad tal que se capturen sólidos más grandes, mientras que se permite que pasen las proteínas, minimizando las pérdidas de proteína.

En algunas realizaciones, el auxiliar de filtración tiene una permeabilidad de aproximadamente 0,100 a aproximadamente 0,500, y se emplea a una carga (es decir, concentración en la fracción de leche) de aproximadamente 25 g/l a aproximadamente 50 g/l. En otras realizaciones, el auxiliar de filtración tiene una permeabilidad de aproximadamente 0,300 a aproximadamente 0,400, y se emplea a una carga de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 45 g/l. En otras realizaciones más, el auxiliar de filtración tiene una permeabilidad de aproximadamente 0,300 a aproximadamente 0,400, y se emplea a una carga de aproximadamente 35 g/l a aproximadamente 40 g/l. En ciertas realizaciones, el auxiliar de filtración tiene una permeabilidad de aproximadamente 0,300 y se emplea a una carga de 25 g/l a aproximadamente 50 g/l. En otras realizaciones, el auxiliar de filtración tiene una permeabilidad de aproximadamente 0,300 y se emplea a una carga de aproximadamente 50 g/l.

Como se describió anteriormente, el auxiliar de filtración impide que los sólidos comprimibles formen una masa impermeable que pueda obstruir un filtro convencional. Estos sólidos comprimibles se capturan, junto con el contenido bacteriano y todo el auxiliar de filtración, en el concentrado del prefiltro. El filtrado resultante contiene una cantidad mínima de sólidos comprimibles, una menor cantidad de contenido bacteriano y no contiene auxiliar de filtración. Con los sólidos comprimibles capturados en el concentrado, el filtrado del proceso de prefiltración pasa a través de un microfiltro con un tamaño de poro entre 0,2 y 1,0 μm .

Microfiltración

La microfiltración se utiliza en el filtrado de la etapa de prefiltración. Con casi todos los sólidos comprimibles capturados en la etapa de prefiltración, el filtrado puede fluir a través del microfiltro, con un tamaño de poro entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1,0 micras, con un mínimo de sólidos comprimibles para obstruir el microfiltro. El concentrado de la etapa de microfiltración contendrá los sólidos comprimibles restantes y el contenido bacteriano de la etapa de prefiltración, incluido *Bacillus cereus*. El filtrado resultante contendrá básicamente leche humana sin contaminación bacteriana.

Ultrafiltración

En algunas realizaciones, la leche microfiltrada se ultrafiltra adicionalmente. De acuerdo con una realización, una membrana de ultrafiltración utilizada para filtrar leche desnatada microfiltrada se dimensiona para impedir el paso de cualquier sustancia con un peso molecular mayor que 40 kDa. Dichas sustancias excluidas incluyen, pero sin limitación: proteína y grasa de la leche. Como alternativa, también pueden utilizarse membranas de ultrafiltración que impidan el paso de cualquier sustancia con un peso molecular mayor a 1-40 kDa y cualquier rango en el mismo. Por lo general, pueden utilizarse filtros que comprenden aproximadamente 0,45 μm o menor (por ejemplo, aproximadamente 0,2 μm). Por lo general, se utilizará un filtro de 0,2 μm . En algunas realizaciones, se puede utilizar filtración graduada (por ejemplo, una primera filtración a aproximadamente 0,45 μm y una segunda filtración a aproximadamente 0,3 μm y una tercera filtración a aproximadamente 0,2 μm , o cualquier combinación de los mismos). La separación de la grasa de la nata facilita la filtración. La esterilización puede realizarse mediante métodos conocidos, tales como filtración o filtración tangencial, utilizando filtros de profundidad o filtros de membrana apropiados.

Las siguientes proteínas de la leche pueden quedar atrapadas por la membrana de ultrafiltración (los pesos moleculares se indican entre paréntesis): lactalbúmina (-14 kDa); caseína (-23 kDa); lactoglobulina (~ 37 kDa); albúmina (-65 kDa); e inmunoglobulinas (> 100 kDa). Se dispone de membranas de ultrafiltración que tienen un corte de peso molecular de 3,5 kDa o menor, por ejemplo, en Advanced Membrane Technology, San Diego, California, y en Dow Denmark, Naskov, Dinamarca, respectivamente. También pueden utilizarse membranas de ultrafiltración fabricadas con materiales cerámicos. Los filtros de cerámica tienen una ventaja sobre los filtros sintéticos. Los filtros de cerámica pueden esterilizarse con vapor a presión.

Generalmente, para facilitar la filtración se aplica un gradiente de presión a través de la membrana de ultrafiltración. Generalmente, el gradiente de presión se ajusta para mantener un flujo de filtro deseado a través de la membrana. En un aspecto, la membrana ultrafiltrante se ceba primero con una pequeña cantidad de leche y antes de comenzar la filtración se desecha el permeado. Se cree que el cebado del filtro de esta manera es ventajoso para

una eficacia del filtrado.

General

- 5 Después de la microfiltración, el concentrado, tanto de la etapa de prefiltrado como de microfiltración, puede desecharse de cualquier manera aceptable.

El método de esta invención puede utilizarse para ventaja cuando el producto final deseado es leche humana entera, leche humana estandarizada, fortificante de leche humana o leche humana desnatada.

- 10 Las tasas de flujo a través de una membrana bacteriana retenedora de la leche humana con un contenido de grasa reducido, son normalmente más altas que las tasas de flujo de la leche humana con un alto contenido de grasa. En ciertas situaciones, es más ventajoso producir leche humana con un mayor contenido de grasa, tal como aproximadamente 3,5 % o aproximadamente 9,0 %, combinando leche humana desnatada filtrada con una fracción de grasa de leche humana pasteurizada. Esta fracción de grasa puede ser una fracción de nata con un contenido mínimo de grasa de aproximadamente 10 %.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

20 EJEMPLOS

Materiales y métodos

- 25 Método A: ajuste de temperatura de la leche humana

La leche humana empleada en los siguientes ejemplos se obtuvo de donantes de leche humana. La temperatura de la leche humana se ajustó a una temperatura de proceso adecuada (de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C) en un recipiente de procesamiento con camisa de 500 l conectado a un sistema de glicol.

- 30 Método B: Separación de las fracciones con nata y desnatada de la leche humana

El recipiente de procesamiento con camisa que contenía leche humana cruda, se conectó a un separador de leche Westfalia. Los puertos del separador Westfalia de leche con nata y desnatada se conectaron a recipientes de procesamiento similares. Aproximadamente 10 litros de la fracción de leche humana desnatada y 2 litros de la fracción de leche con nata se redirigieron a envases de polietileno de alta densidad para su filtración. Ambas fracciones se conservaron en un frigorífico (a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C) hasta que estuvieron listas para su uso en la filtración.

- 40 Método C: Introducción de bacterias en las fracciones de leche humana

En los experimentos, se utilizó siembra artificial de la fracción de leche humana para demostrar la reducción de título muy alta posible con la presente invención. Se añadió inóculo bacteriano, (incluyendo *Bacillus cereus*), a las fracciones de leche humana. Esto se logró mediante la adición de inóculo en un recipiente de proceso de fracción de leche humana durante la mezcla constante. Se mezcló suficiente inóculo con la fracción de leche humana para lograr un mínimo de 300 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC / ml).

Método D: Análisis de Ensayo Bacteriano

- 50 Dado que el inóculo utilizado para sembrar las fracciones de leche humana fue *Bacillus cereus*, se utilizó agar de manitol-yema de huevo-polimixina (agar MYP) ya que está diseñado para ser selectivo y diferencial para *Bacillus cereus*. Cuando se analizó *Bacillus cereus*, se sembraron muestras de 1 ml del producto de leche humana en tres placas de agar MYP, conteniendo cada placa 0,33 ml de muestra. Las placas se incubaron durante 24 horas a 32 °C y se efectuó su lectura. Se considera que todas las colonias de color rosáceo – rojizo, que también son positivas a lecitinasa, observadas como una zona de precipitado alrededor de las colonias, son presuntamente *Bacillus cereus*.

Método E: Análisis de ensayo de macronutrientes

- 60 Antes y después de que la fracción de leche se haya sometido al proceso de filtración, es conveniente medir el contenido de grasas, proteínas, hidratos de carbono y el contenido calórico total del filtrado final. Para los experimentos de este documento, se utilizó un analizador de leche por infrarrojos Acudairy, fabricado por Sterling Instruments, Westfield, Nueva York, Estados Unidos, para medir los macronutrientes.

Aparato de filtración

El prefiltro

- 5 Los prefiltros utilizados en los experimentos fueron los filtros mini cápsula Filtrix Filtrodisc BioSD. Estos filtros son de uso único diseñados para la separación celular. Los filtros se fabricaron en Filtrix AG, St. Gallen, Suiza.

El medio auxiliar de filtración

- 10 El medio auxiliar de filtración utilizado en el experimento fue Celpure®, fabricado por Advanced Minerals Corporation, Goleta, California, Estados Unidos.

El microfiltro

- 15 El microfiltro utilizado en los experimentos fue un filtro de cápsula de membrana PTFE Meissner. Los filtros Meissner se fabricaron en Meissner Filtration Products, INC, Camarillo, California, Estados Unidos.

Método F: Configuración de la filtración

- 20 Con tubos de 6,35 mm (un cuarto de pulgada), se configuró una bomba peristáltica Watson-Marlow. El tubo de la bomba se conectó primero a la entrada de un filtro mini cápsula Filtrix Filtrodisc BioSD. La salida del filtro mini cápsula Filtrix Filtrodisc BioSD se conectó después, a través de un tubo de 6,35 mm (¼ de pulgada), a la entrada del filtro de cápsula de membrana PTFE Meissner. El resultado fue que los dos filtros se conectaron en serie con el flujo proyectado del primer producto a través del filtro mini cápsula Filtrix Filtrodisc BioSD, después el filtro de cápsula de membrana PTFE Meissner. Utilizando un tubo de 6,35 mm (un cuarto de pulgada), la salida del filtro de cápsula de membrana PTFE Meissner condujo a un recipiente de recogida de 500 ml.

Método G: Filtración de la fracción de leche

- 30 Preparación del filtro

- Una vez finalizada la configuración de la filtración, los filtros deben humedecerse con agua desionizada (DI) antes de que se pueda pasar una fracción de leche a través de los filtros. Para lograr humedecer los filtros, un recipiente que contenía agua DI se conectó a la tubería de entrada conectada a la bomba peristáltica Watson-Marlow en la configuración de filtración descrita en el Método F. En este punto, se bombean al menos 100 ml de agua DI a través de los filtros para humedecer el filtro en preparación para la filtración de las fracciones de leche.

Preparación de las fracciones para la filtración

- 40 Antes de que la fracción de leche pueda pasar a través del filtro, el auxiliar de filtración debe añadirse a la fracción de leche. Para los experimentos, se añaden entre aproximadamente 20 gramos y aproximadamente 60 gramos de auxiliar de filtración Celpure por cada 500 ml de fracción de leche.

Filtración

- 45 La entrada a la bomba peristáltica Watson-Marlow, el punto de partida de la configuración de filtración descrita en el Método F, está conectada a un recipiente que contiene la fracción de leche con Celpure añadido. La bomba está configurada para obtener un caudal entre aproximadamente 15 ml a aproximadamente 40ml por minuto. Cuando se inicia el bombeo, las aberturas de ventilación de cada filtro se abrieron para cebar los filtros al inicio del proceso de bombeo, y luego se cerraron cuando se preparó el sistema. La fracción de leche con Celpure se bombeó a través del filtro hasta que el filtro mini cápsula Filtrix Filtrodisc BioSD se llenó con Celpure (aproximadamente 20 gramos de Celpure). El filtrado final, el producto pasado tanto a través del prefiltro como del microfiltro, produjo entre aproximadamente 167 ml a aproximadamente 450 ml.

- 55 Mediciones de Macronutrientes y de Bacterias

Después de finalizar la filtración, se realizaron mediciones de macronutrientes y de bacterias. Las mediciones se realizaron como se describe en el Método D y en el Método E y se realizaron en la fracción de leche inicial, en el filtrado después del prefiltro y en el filtrado final después de la microfiltración.

- 60

Ejemplo I

- 65 A temperatura ambiente, se mezclaron aproximadamente 500 ml de fracción de leche cruda con aproximadamente 40 g de Celpure® 300. A la mezcla se añadieron aproximadamente 600 UFC/ml de *Bacillus cereus* como se describe en el Método C. La mezcla se bombeó a una velocidad de aproximadamente 30 ml/min. La configuración de la filtración siguió el Método F y la filtración siguió el Método G. Sin embargo, la presión de suministro comenzó a

5 aumentar poco después de iniciar el bombeo del producto, lo que indica la obstrucción del prefiltro. Los resultados de los análisis de macronutrientes y de bacterias se documentan en la Tabla 1. Nota: BC UFC/ml = número de unidades formadoras de colonias de *B. cereus* por mililitro.

Tabla 1

Producto	BC UFC/ml	Grasa	Proteína	Hidratos de carbono
Leche entera	577	3,29 %	1,02 %	7,51 %
Leche entera, prefiltro 1 µm	<1	0,13 %	0,84 %	7,19 %

10 Los resultados anteriores indican que el prefiltrado de la leche entera, aunque es eficaz para reducir la concentración de *B. cereus*, conduce a un caudal muy bajo y a la obstrucción del filtro con sólidos comprimibles. Por lo tanto, con la finalidad de una producción a gran escala, es ventajoso separar la nata de la leche desnatada y prefiltrar.

10 Ejemplo II

15 A temperatura ambiente, se mezclaron aproximadamente 500 ml de fracción de leche desnatada con aproximadamente 40 g de Celpure® 300. A la mezcla se añadieron aproximadamente 600 UFC/ml de *Bacillus cereus* como se describe en el Método C. La mezcla se bombeó a una velocidad de aproximadamente 30 ml/min. La configuración de la filtración siguió el Método F y la filtración siguió el Método G. El microfiltro tenía un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 µm. La presión de suministro permaneció constante durante todo el proceso, lo que indica que no hay obstrucción de los filtros. Los resultados de los análisis de macronutrientes y bacterias se documentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Producto	BC UFC/ml	Grasa	Proteína	Hidratos de carbono
Leche desnatada	577	0,31 %	1,01 %	7,37 %
Leche desnatada, prefiltro 1 µm	29	0,15 %	0,90 %	7,19 %
Leche desnatada, microfiltro 0,2 µm	<1	0,08 %	0,73 %	8,08 %

20 Los resultados anteriores indican que un prefiltro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 µm ya no se obstruye cuando antes de realizar la filtración a la leche desnatada se le añade un auxiliar de filtración, tal como tierra de diatomeas. Además, la concentración de *Bacillus cereus* en la leche desnatada se reduce de manera eficaz al filtrar la leche desnatada a través de un prefiltro y un microfiltro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 µm, mientras que las concentraciones de proteína y de hidratos de carbono en la leche desnatada no se ven significativamente afectadas por este proceso.

30 Ejemplo III

35 A temperatura ambiente, se mezclaron aproximadamente 500 ml de fracción de leche desnatada con aproximadamente 40 g de Celpure® 300. A la mezcla se añadieron aproximadamente 600 UFC/ml de *Bacillus cereus* como se describe en el Método C. La mezcla se bombeó a una velocidad de aproximadamente 30 ml/min. La configuración de la filtración siguió el Método F y la filtración siguió el Método G. El microfiltro tenía un tamaño de poro de aproximadamente 0,4 µm. La presión de suministro se mantuvo constante durante todo el proceso, lo que indica que no hay obstrucción de los filtros. Los resultados obtenidos en los Métodos D y E se documentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Producto	BC UFC/ml	Grasa	Proteína	Hidratos de carbono
Leche desnatada	577	0,31 %	1,01 %	7,37 %
Leche desnatada, prefiltro 1 µm	29	0,15 %	0,90 %	7,19 %
Leche desnatada, microfiltro 0,4 µm	<1	0,10 %	0,82 %	7,24 %

40 Los resultados anteriores indican que la concentración de *Bacillus cereus* en la leche desnatada se reduce de manera eficaz al filtrar la leche desnatada a través de un prefiltro y un microfiltro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,4 µm, mientras que las concentraciones de proteína y de hidratos de carbono en la leche desnatada no se ven significativamente afectadas por este proceso.

45 Ejemplo IV

50 A temperatura ambiente, se mezclaron aproximadamente 500 ml de fracción de leche desnatada con aproximadamente 40 g de Celpure® 300. A la mezcla se añadieron aproximadamente 10.000 UFC/ml de *Bacillus cereus* como se describe en el Método C. La mezcla se bombeó a una velocidad de aproximadamente 30 ml/min. La configuración de la filtración siguió el Método F y la filtración siguió el Método G. El microfiltro tenía un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 µm. La presión de suministro se mantuvo constante durante todo el proceso, lo que indica que no hay obstrucción de los filtros. Los resultados obtenidos en los Métodos D y E se documentan en la

Tabla 4.

Tabla 4

Producto	BC UFC/ml	Grasa	Proteína	Hidratos de carbono
Leche desnatada	DNPC*	0,30 %	0,84 %	6,68 %
Leche desnatada, prefiltro 1 µm	DNPC*	0,12 %	0,72 %	6,63 %
Leche desnatada, microfiltro 0,6 µm	<1	0,10 %	0,60 %	6,61 %
Demasiado numerosas para contar				

- 5 Los resultados anteriores indican que la concentración de *Bacillus cereus* en la leche desnatada se reduce de manera eficaz al filtrar la leche desnatada a través de un prefiltro y un microfiltro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 µm, mientras que las concentraciones de proteína y de hidratos de carbono en la leche desnatada no se ven significativamente afectadas por este proceso.

10 Ejemplo V

- 15 A temperatura ambiente, se agruparon 1.009,8 ml de la fracción de leche desnatada. A la fracción de leche desnatada se añadieron aproximadamente 5.000 UFC/ml de *Bacillus cereus* como se describe en el Método C. De los 1.009,8 ml de la fracción de leche desnatada, se tomaron 9,8 ml para realizar un análisis nutricional, dejando 1.000 ml de la fracción de leche desnatada. A los 1.000 ml de la fracción de leche desnatada, se añadieron aproximadamente 22 g de Celpure® 300. De los 1.000 ml de la fracción de leche desnatada, se filtraron aproximadamente 135 ml utilizando la configuración de filtración seguida del Método F y la filtración seguida en el Método G. El microfiltro tenía un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 µm. La presión de suministro se mantuvo constante durante todo el proceso, lo que indica que no hay obstrucción de los filtros. La nata que se analizó tenía 20 <1 UFC/ml de *Bacillus cereus* y se añadió un valor nutricional conocido a la nata filtrada en la cantidad de 15,4 ml para llevar el nivel de calorías, grasa, proteína e hidratos de carbono al nivel esperado en la leche humana estandarizada. Los resultados obtenidos en los Métodos D y E se documentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Producto	BC UFC/ml	Grasa	Proteína	Hidratos de carbono
Leche desnatada	DNPC*	0,42 %	1,10 %	7,35 %
Leche desnatada, microfiltro 0,6 µm	<1	0,11 %	0,94 %	7,35 %
Producto final (leche filtrada con nata añadida)	<1	3,80 %	1,04 %	7,62 %
Demasiado numerosas para contar				

25

Ejemplos de aplicación a gran escala

Ejemplo A

30

Resumen

- 35 Aproximadamente 30 l de leche de vaca se mezclaron con aproximadamente 90 l de agua desionizada para proporcionar aproximadamente 120 l de leche de vaca diluida, que se trató con *Bacillus cereus* y después se puso en un tanque forrado con bolsa de 500 l y a una temperatura de aproximadamente 23 °C. Se añadió Celpure® 300 para obtener una proporción final de auxiliar de filtración/leche de vaca de aproximadamente 50 g/l. Se preparó una bomba peristáltica y un tubo de suministro a través de la misma, conectando el tanque forrado con bolsa al primer y segundo filtro, el "filtro de profundidad" y "filtros finales", respectivamente. Las carcasas del filtro se desmontaron y limpiaron/desinfectaron antes del experimento de filtración. También se limpiaron y desinfectaron dos (2) carcasas de 76,20 cm (30") de "filtro final". Todos los tubos y componentes, por ejemplo, abrazaderas, juntas, conexiones, etc., se desinfectaron. Para el recorrido se emplearon 15,24 m (50') de tubería nueva. Se emplearon filtros Stylux® SMO.6-3F6RS (Meissner Filtration Products, Inc.) con un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 µm fabricados con poliétersulfona (PES). La leche de vaca se recogió en barriles desinfectados, bien corriente abajo del filtro de profundidad o de los filtros finales.

45

El Celpure® 300 (permeabilidad de aproximadamente 0,300) a una concentración de 50 g/l, junto con los filtros Sterilux SMO.6-3F6RS fabricados con poliétersulfona (PES), fue eficaz en el filtrado de *Bacillus cereus* de la leche de vaca a un nivel de <1 UFC/ml.

50 Procedimiento

La leche de vaca se mezcló y se dispensó en el tanque forrado con bolsa de 500 litros. Se conectaron aproximadamente 3,05 m (10 pies) de tubería a la salida del tanque y se cerró con una abrazadera. Se conectó un mezclador magnético al tanque y se ajustó a aproximadamente 50 RPM. Se obtuvieron dos muestras de leche. Se

añadió inóculo de *Bacillus cereus* al tanque mientras se mezclaba. Las RPM se ajustaron para mezclar con una formación de espuma mínima y se dejó que la leche de vaca se mezclara durante aproximadamente 15 minutos. Se obtuvieron dos muestras de leche de vaca. Se dispensó CelPure® 300 en el tanque, y el mezclador se ajustó a aproximadamente 200 RPM.

5 Se abrieron las carcasas del filtro y en cada una de ellas, se colocó un filtro Stylux® SMO.6-3F6R.S de 72,20 cm (30 pulgadas), con un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 µm, fabricado con poliétersulfona (PES). Las carcasas de todos los filtros se sujetaron y los filtros se humedecieron en las carcasas y se drenaron por gravedad. La salida del tanque estaba conectada a la entrada del filtro de profundidad. La tubería pasaba desde la salida superior de la carcasa del filtro hasta la abertura superior del tanque para la recirculación, caso de ser necesario. La tubería desde la parte inferior del tanque se pasó a través de la bomba peristáltica y se conectó a la entrada del filtro de profundidad. La tubería de la salida del filtro de profundidad se pasó a un barril de recogida.

15 Los filtros finales, filtros Stylux® SMO.6-3F6RS de 72,20 cm (30 pulgadas), con un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 µm, fabricados con poliétersulfona (PES), se suministraron desde el barril de recogida. La tubería se conectó a ambas entradas del filtro final, y se colocó un conector en forma de "T" en las líneas de entrada con abrazaderas para dirigir selectivamente el líquido a cualquiera de los filtros. La salida de los tubos de ambos filtros se suministró en los barriles de recogida.

20 La válvula/abrazadera de drenaje en la parte inferior del tanque se abrió y la bomba se puso en marcha. La velocidad de la bomba se incrementó gradualmente a aproximadamente 10 l/min. Se observó leche de vaca llenando la carcasa, y la válvula de ventilación de la carcasa se cerró tras ver que salía el producto. La tubería de recirculación no estaba cerrada por lo que el producto regresó al tanque. La presión de la carcasa se registró cada 5 minutos. Después de la recirculación, se abrió la abrazadera en la salida del filtro de profundidad. La abrazadera en la salida de la carcasa, se abrió permitiendo que el producto fluyese al barril de recogida, y la tubería de recirculación al tanque se cerró con abrazadera. El proceso continuó hasta que se filtró todo el producto del tanque. Se obtuvieron muestras del filtrado.

30 Los filtros finales se humedecieron y se drenaron, y después la tubería desde el barril de recogida a la bomba se cebó, y la bomba se conectó y se llevó lentamente a aproximadamente 4 l/min. El producto se observó en la mirilla n.º 1 de la carcasa del filtro y la válvula de ventilación se abrió hasta que se observó el producto, después se cerró la ventilación. La presión de la carcasa del filtro se registró. La abrazadera de salida del filtro final se abrió y el producto se recogió en el barril de recogida hasta que se filtró todo el producto del primer filtrado. Se obtuvieron muestras del segundo filtrado.

35 Ejemplo B

Resumen

40 Un tanque de 500 l forrado con bolsa, se llenó con aproximadamente 147 l de leche humana desnatada tratada con *Bacillus cereus* a una temperatura de aproximadamente 23 °C. Se añadió CelPure® 1000 para dar una proporción final de auxiliar de filtración/leche de aproximadamente 25 g/l. Se preparó una bomba peristáltica y un tubo de suministro a través de la misma, conectando el tanque forrado con bolsa al primer y segundo filtro, el "filtro de profundidad" y "filtros finales", respectivamente (y que correspondían al prefiltro y microfiltro de los Ejemplos I-V anteriores). Las carcasas del filtro se desmontaron y limpiaron/desinfectaron antes del experimento de filtración y todos los tubos y componentes, por ejemplo, abrazaderas, juntas, conexiones, etc., también se desinfectaron. Se emplearon 15,24 m (50') de tubería nueva. Se emplearon filtros Stylux® SMO.6-3F6RS con un tamaño de poro de aproximadamente 0,6 µm, fabricados con poliétersulfona (PES). La leche de vaca se recogió en barriles desinfectados, bien corriente abajo del filtro de profundidad o de los filtros finales.

50 Utilizando Celpure® 300 (permeabilidad de aproximadamente 1.000) a aproximadamente 25 g/l, la leche humana desnatada pasó a los filtros de profundidad, pero los filtros finales se obstruyeron inmediatamente y la producción se detuvo.

Procedimiento

60 En este ejemplo se utilizó el mismo procedimiento que el del Ejemplo A, excepto que en este caso se utilizó leche desnatada humana en lugar de leche de vaca. La leche se descongeló y se dispensó en el tanque de 500 l forrado con bolsa. Se conectaron aproximadamente 3,05 m (10 pies) de tubería a la salida del tanque y se cerró con una abrazadera. Se conectó un mezclador magnético al tanque y se ajustó a aproximadamente 50 RPM. Se obtuvieron muestras de leche por duplicado. Se añadió inóculo de *Bacillus cereus* al tanque mientras se mezclaba. Las RPM se ajustaron para mezclar con una formación de espuma mínima y se dejó que la leche se mezclara durante aproximadamente 15 minutos. Se obtuvieron muestras de leche por duplicado. Se dispensó CelPure® 1000 en el tanque, y el mezclador se ajustó a aproximadamente 200 RPM.

65 Se abrieron las carcasas del filtro y en cada una de ellas, se colocó un filtro Stylux® de 72,20 cm (30 pulgadas). Las

carcasas de todos los filtros se sujetaron y los filtros se humedecieron en las carcasas y se drenaron por gravedad. La salida del tanque estaba conectada a la entrada del filtro de profundidad. La tubería pasaba desde la salida superior de la carcasa del filtro hasta la abertura superior del tanque para la recirculación, caso de ser necesario. La tubería desde la parte inferior del tanque se pasó a través de la bomba peristáltica y se conectó a la
5 entrada del filtro de profundidad. La tubería de la salida del filtro de profundidad se pasó a un barril de recogida.

Los filtros finales se suministraron desde el barril de recogida. La tubería se conectó a ambas entradas del filtro final, y se colocó un conector en forma de "T" en las líneas de entrada con abrazaderas para dirigir selectivamente el líquido a cualquiera de los filtros. La salida de los tubos de ambos filtros se suministró en los barriles de recogida.
10

La válvula/abrazadera de drenaje en la parte inferior del tanque se abrió y la bomba se puso en marcha. La velocidad de la bomba se incrementó gradualmente a aproximadamente 10 l/min. Se observó leche llenando la carcasa, y la válvula de ventilación de la carcasa se cerró tras ver que salía el producto. La tubería de recirculación no estaba cerrada por lo que el producto regresó al tanque. La presión de la carcasa se registró cada 5
15 minutos. Después de la recirculación, se abrió la abrazadera en la salida del filtro de profundidad. La abrazadera en la salida de la carcasa, se abrió permitiendo que el producto fluyese al barril de recogida, y la tubería de recirculación al tanque se cerró con abrazadera. El proceso continuó hasta que se filtró todo el producto del tanque. Se obtuvieron muestras del filtrado.

Los filtros finales se humedecieron y se drenaron, y después la tubería desde el barril de recogida a la bomba se cebó, y la bomba se conectó. Sorprendentemente, a pesar del hecho de que se utilizó con éxito el mismo procedimiento que el del Ejemplo A, en este ejemplo, cada filtro final se obstruyó inmediatamente después de la introducción de la leche, y la producción se detuvo.
20

25 Ejemplo C

Resumen

Un tanque de 500 l forrado con bolsa, se llenó con aproximadamente 240 l de leche humana desnatada tratada con
30 *Bacillus cereus* a una temperatura de aproximadamente 23 °C. Se añadió CelPure® 1000 para dar una proporción final de auxiliar de filtración/leche de aproximadamente 25 g/l. Se preparó una bomba peristáltica y un tubo de suministro a través de la misma, conectando el tanque forrado con bolsa al primer y segundo filtro, el "filtro de profundidad" y "filtros finales", respectivamente (y que correspondían al prefiltro y microfiltro de los Ejemplos I-V anteriores). Las carcasas del filtro se desmontaron y limpiaron/desinfectaron antes del experimento de filtración y
35 todos los tubos y componentes, por ejemplo, abrazaderas, juntas, conexiones, etc., también se desinfectaron. Se emplearon 15,24 m (50') de tubería nueva. Se emplearon filtros Sterilux VMH0.6-3F6RS fabricados con fluoruro de polivinilideno (PVDF). La leche se recogió en barriles desinfectados, bien corriente abajo del filtro de profundidad o de los filtros finales.

40 Utilizando Celpure® 1000 (permeabilidad de aproximadamente 1.000) a aproximadamente 25 g/l, el filtro de profundidad se obstruyó y la producción se detuvo.

Procedimiento

45 La leche se descongeló y se dispensó en el tanque de 500 l forrado con bolsa. Se conectaron aproximadamente 3,05 m (10 pies) de tubería a la salida del tanque y se cerró con una abrazadera. Se conectó un mezclador magnético al tanque y se ajustó a aproximadamente 50 RPM. Se obtuvieron dos muestras de leche. Se añadió inóculo de *Bacillus cereus* al tanque mientras se mezclaba. Las RPM se ajustaron para mezclar con una formación de espuma mínima y se dejó que la leche se mezclara durante aproximadamente 15 minutos. Se obtuvieron dos
50 muestras de leche. Se dispensó CelPure® 1000 (6 kg) en el tanque, y el mezclador se ajustó a aproximadamente 200 RPM.

Se abrieron las carcasas del filtro y en cada una de ellas, se colocó un filtro Sterilux VMH0.6-3F6RS fabricado con PVDF, de 72,20 cm (30 pulgadas). Las carcasas de todos los filtros se sujetaron y los filtros se humedecieron en las
55 carcasas y se drenaron por gravedad. La salida del tanque estaba conectada a la entrada del filtro de profundidad. La tubería pasaba desde la salida superior de la carcasa del filtro hasta la abertura superior del tanque para la recirculación, caso de ser necesario. La tubería desde la parte inferior del tanque se pasó a través de la bomba peristáltica y se conectó a la entrada del filtro de profundidad. La tubería de la salida del filtro de profundidad se pasó a un barril de recogida.

60 Los filtros finales (Sterilux VMH0.6-3F6RS) se suministraron desde el barril de recogida. La tubería se conectó a ambas entradas del filtro final, y se colocó un conector en forma de "T" en las líneas de entrada con abrazaderas para dirigir selectivamente el líquido a cualquiera de los filtros. La salida de los tubos de ambos filtros se suministró en los barriles de recogida.

65 La válvula/abrazadera de drenaje en la parte inferior del tanque se abrió y la bomba se puso en marcha. La

velocidad de la bomba se incrementó gradualmente a aproximadamente 10 l/min. Se observó leche llenando la carcasa, y la válvula de ventilación de la carcasa se cerró tras ver que salía el producto. La tubería de recirculación no estaba cerrada por lo que el producto regresó al tanque. La presión de la carcasa se registró cada 5 minutos. Después de la recirculación, se abrió la abrazadera en la salida del filtro de profundidad. Se observó que la presión de la carcasa del filtro de profundidad aumentaba rápidamente, y que el filtro de profundidad se obstruía, lo que ponía fin al experimento

Ejemplo D

Resumen

Un tanque de 500 l forrado con bolsa, se llenó con aproximadamente 160 l de leche humana desnatada tratada con *Bacillus cereus* a una temperatura de aproximadamente 23 °C. A diferencia del procedimiento empleado en el Ejemplo B, donde se utilizaba CelPure® 1000 y daba una proporción final de filtración/leche de aproximadamente 25 g/l., lo que produjo la obstrucción del filtro, en este caso se añadió CelPure® 1000 para dar una proporción final de auxiliar de filtración/leche de aproximadamente 50 g/l. Se preparó una bomba peristáltica y un tubo de suministro a través de la misma, conectando el tanque forrado con bolsa al primer y segundo filtro, el "filtro de profundidad" y "filtros finales", respectivamente. Las carcasas del filtro se desmontaron y se limpiaron/desinfectaron antes del experimento de filtración. También se limpiaron y desinfectaron dos (2) carcasas de "filtro final" de 76,20 cm (30 pulgadas). Todos los tubos y componentes, por ejemplo, abrazaderas, juntas, conexiones, etc., se desinfectaron. Para el recorrido, se emplearon 15,24 m (50') de tubería nueva. En lugar de los filtros Stylux utilizados en el Ejemplo B, que dieron como resultado la obstrucción, se emplearon filtros Sterilux VMH0.6-3F6RS de PVDF. La leche se recogió en barriles desinfectados ya sea aguas abajo del filtro de profundidad o los filtros finales

El Celpure® 300 (permeabilidad de aproximadamente 2- 0,300 D) a una concentración de aproximadamente 50 g/l, junto con los filtros Sterilux VMH0.6-3F6RS fabricados con PVDF, fue eficaz en el filtrado de *Bacillus cereus* de la leche desnatada humana a un nivel de <1 UFC/ml.

Procedimiento

La leche se descongeló y se dispuso en el tanque de 500 l forrado con bolsa. Se conectaron aproximadamente 3,05 m (10 pies) de tubería a la salida del tanque y se cerró con una abrazadera. Se conectó un mezclador magnético al tanque y se ajustó a aproximadamente 50 RPM. Se obtuvieron dos muestras de leche. Se añadió inóculo de *Bacillus cereus* al tanque mientras se mezclaba. Las RPM se ajustaron para mezclar con una formación de espuma mínima y se dejó que la leche se mezclara durante aproximadamente 15 minutos. Se obtuvieron dos muestras de leche. Se dispuso CelPure® 300 en el tanque, y el mezclador se ajustó a aproximadamente 200 RPM. Las carcasas del filtro se abrieron y en cada una de ellas, se colocó un filtro Sterilux de 72,20 cm (30 pulgadas). Las carcasas de todos los filtros se sujetaron y los filtros se humedecieron en las carcasas y se drenaron por gravedad. La salida del tanque estaba conectada a la entrada del filtro de profundidad. La tubería pasaba desde la salida superior de la carcasa del filtro hasta la abertura superior del tanque para la recirculación, caso de ser necesario. La tubería desde la parte inferior del tanque se pasó a través de la bomba peristáltica y se conectó a la entrada del filtro de profundidad. La tubería de la salida del filtro de profundidad se pasó a un barril de recogida.

Desde el barril de recogida se suministraron filtros finales. La tubería se conectó a ambas entradas del filtro final, y se colocó un conector en forma de "T" en las líneas de entrada con abrazaderas para dirigir selectivamente el líquido a cualquiera de los filtros. La salida de los tubos de ambos filtros se suministró en los barriles de recogida.

La válvula/abrazadera de drenaje en la parte inferior del tanque se abrió y la bomba se puso en marcha. La velocidad de la bomba se incrementó gradualmente a aproximadamente 10 l/min. Se observó leche llenando la carcasa, y la válvula de ventilación de la carcasa se cerró tras ver que salía el producto. La tubería de recirculación no estaba cerrada por lo que el producto regresó al tanque. La presión de la carcasa se registró cada 5 minutos. Después de la recirculación, se abrió la abrazadera en la salida del filtro de profundidad. La abrazadera en la salida de la carcasa se abrió permitiendo que el producto fluyese al barril de recogida, y el tubo de recirculación al tanque se cerró con abrazadera. El proceso continuó hasta que se filtró todo el producto del tanque. Se obtuvieron muestras del filtrado.

Los filtros finales se humedecieron y se drenaron, y después la tubería desde el barril de recogida a la bomba se cebó, y la bomba se conectó y se llevó lentamente a aproximadamente 4 l/min. El producto se observó en la mirilla n.º 1 de la carcasa del filtro y la válvula de ventilación se abrió hasta que se observó el producto, después se cerró la ventilación. La presión de la carcasa del filtro se registró. La abrazadera de salida del filtro final se abrió y el producto se recogió en el barril de recogida hasta que se filtró todo el producto del primer filtrado. Se obtuvieron muestras del segundo filtrado.

Resultados

I. El rendimiento volumétrico total fue de 66,5 %.

- 5 Volumen inicial en el tanque: 160 l
- Volumen recogido después del filtro de profundidad: 97 l (sin lavado posterior, filtro obstruido)
- 10 Volumen recogido después del 1^{er} filtro final: 53 l
 Volumen recogido después del 2^o filtro final: 32 l
 Lavado posterior del 1^{er} filtro final: 5 l
 Lavado posterior del 2^o filtro final: 5 l
- 15 Total del filtro final: 95 l
- Volumen retenido que queda en el tanque: 15 l
 Volumen retenido en la entrada del filtro de profundidad: 30 l
 Volumen retenido en la salida del filtro de profundidad: 4 l
- 20 Volumen retenido total: 49 l

$$\text{Rendimiento volumétrico} = 100 * (95 \text{ l} / (160 \text{ l} - 15 \text{ l})) = 65,5 \%$$

25 II. El rendimiento de proteína fue de 78,4 %.

- 30 Proteína inicial: 0,97 %
 Proteína después del filtro de profundidad: 0,83 %
 Proteína después del 1^{er} filtro final: 0,78 %
 Proteína después del 2^o filtro final: 0,79 %
 Proteína después del lavado posterior: 0,76 %

$$\text{Rendimiento de proteína} = 100 * (0,76 \% / 0,97 \%) = 78,4 \%$$

35 III. Los niveles de *Bacillus cereus* en el producto final fueron < 1 UFC/ml.

- 40 A. Carga inicial de *Bacillus cereus* a las 24 horas 145 UFC/ml Carga inicial de *Bacillus cereus* a las 48 horas 500 UFC/ml
 B. *Bacillus cereus* después del filtro de profundidad a las 24 horas <1 UFC/ml *Bacillus cereus* después del filtro de profundidad a las 48 horas <1 UFC/ml)
 C. *Bacillus cereus* después del filtro final a las 24 horas <1 UFC/ml *Bacillus cereus* después del filtro final a las 48 horas <1 UFC/ml
 D. *Bacillus cereus* después del lavado posterior a las 24 horas <1 UFC/ml *Bacillus cereus* después del lavado posterior a las 48 horas <1 UFC/ml
 E. *Bacillus cereus* en el producto final a las 24 horas <1 UFC/ml *Bacillus cereus* en el producto final a las 48 horas <1 UFC/ml

50 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos de la presente memoria tienen el mismo significado que el que comúnmente entiende un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención puede utilizarse cualquier método y material, similar o equivalente a los descritos en este documento, se describen los métodos y materiales preferidos.

55 Las publicaciones tratadas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de leche humana cruda para obtener leche humana microfiltrada que tiene un contenido de bacterias inferior en comparación con el de la leche humana cruda, que comprende:
- 5 (a) suministrar leche humana cruda;
 (b) separar la leche cruda en una fracción de nata y una tracción de leche desnatada;
 (c) prefiltrar la fracción de leche desnatada utilizando un auxiliar de filtración a través de uno o más prefiltros para producir leche descremada prefiltrada y donde dicho auxiliar de filtración se añade a dicha fracción de leche desnatada a una concentración de 20 g/l a 50 g/l, y en donde dicho auxiliar de filtración tiene una permeabilidad de $9,87 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ a $29,61 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ (de 0,100 D a 0,300 D); y
 10 (d) microfiltrar la leche desnatada prefiltrada obtenida en la etapa (c) a través de uno o más microfiltros para obtener leche desnatada humana microfiltrada.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el auxiliar de filtración es tierra de diatomeas y en el que el auxiliar de filtración se añade a la fracción de leche desnatada obtenida en la etapa (b) para formar una suspensión, y en el que la suspensión se hace pasar a través de dicho prefiltro para formar dicha leche desnatada prefiltrada; o el auxiliar de filtración en la fracción de leche desnatada es del 2 % p/v al 20 % p/v.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que la leche desnatada humana microfiltrada obtenida en la etapa (d) se concentra adicionalmente por ultrafiltración.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la leche desnatada humana microfiltrada concentrada tiene un contenido de proteínas del 5 % al 15 %.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende además añadir nata de leche humana en la leche desnatada humana microfiltrada para producir un producto de leche humana entera.
- 30 6. El método de la reivindicación 3, en donde el método comprende además añadir nata de leche humana a la leche desnatada humana ultrafiltrada para producir un producto de leche humana entera.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la fracción de nata de leche humana obtenida en la etapa (b) se esteriliza antes de añadirla a la leche desnatada microfiltrada o ultrafiltrada, o en donde el método comprende además (e) pasteurizar la leche desnatada microfiltrada.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el que la especie bacteriana es *Bacillus cereus*; y en el que la fracción de leche desnatada microfiltrada no tiene más de 10^1 bacterias por milímetro.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la fracción de leche desnatada producida en la etapa (b) contiene del 1,0 % a aproximadamente el 0,1 % de contenido de grasas.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, en el que dicho auxiliar de filtración se añade a dicha fracción de leche desnatada a una concentración de aproximadamente 50 g/l y dicho auxiliar de filtración tiene una permeabilidad de aproximadamente $29,61 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ (0,300 D).
- 45

Figura 1

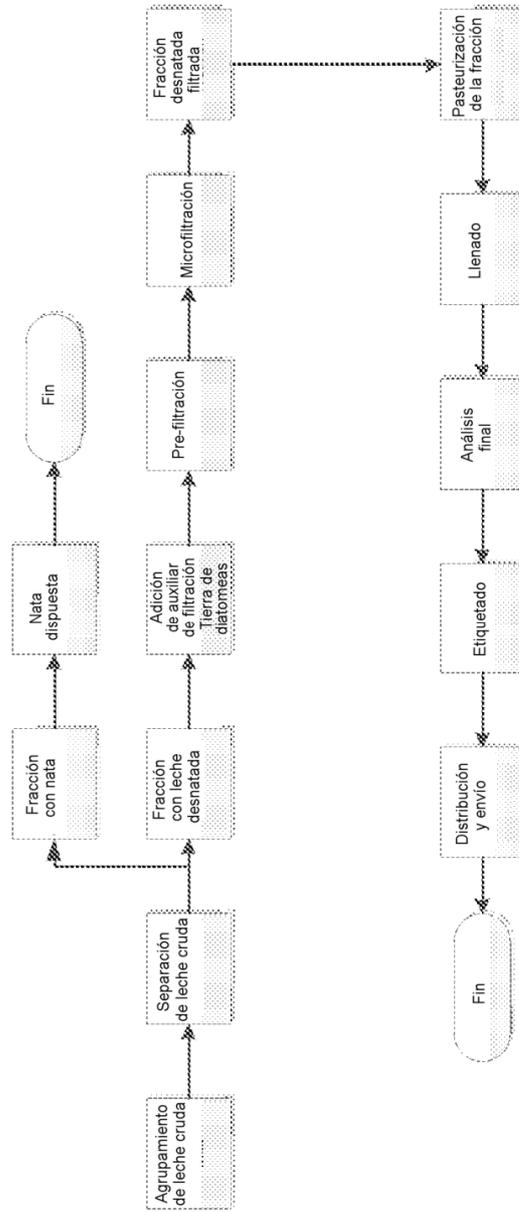


Figura 2

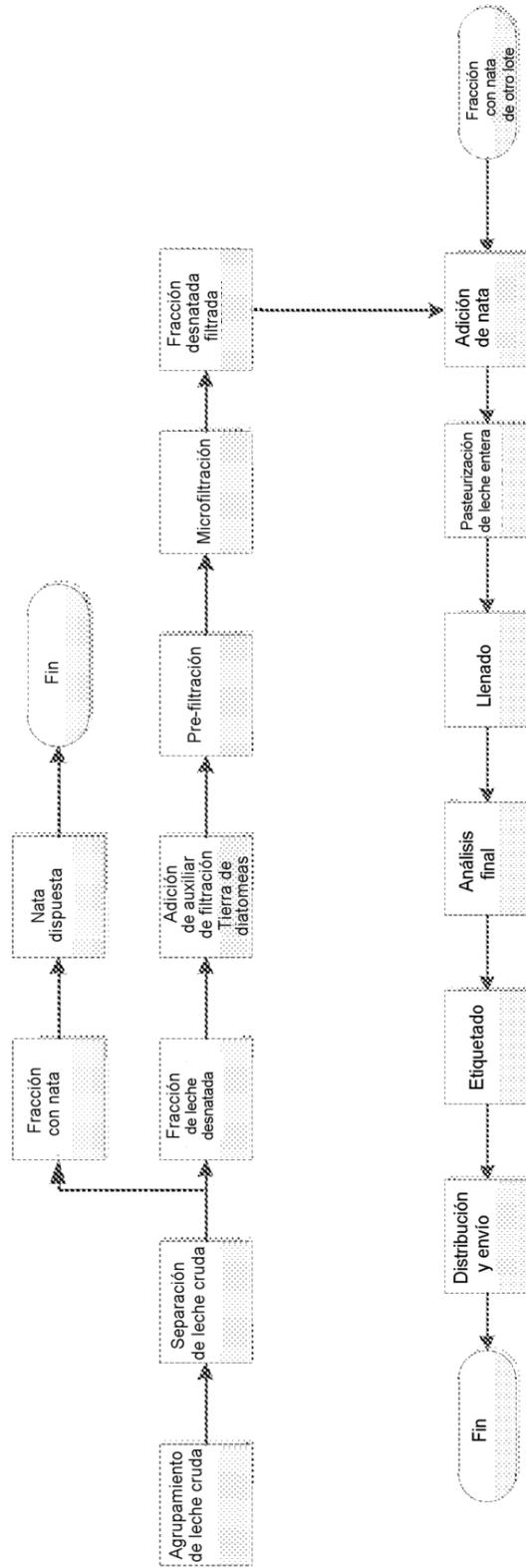


Figura 3

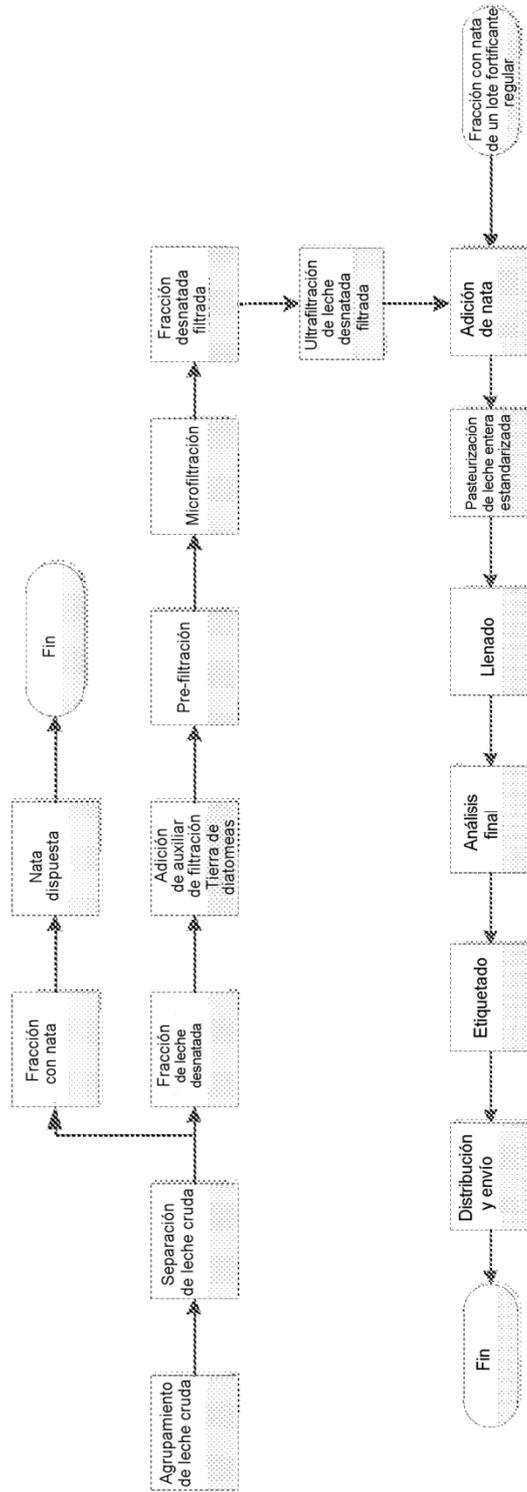
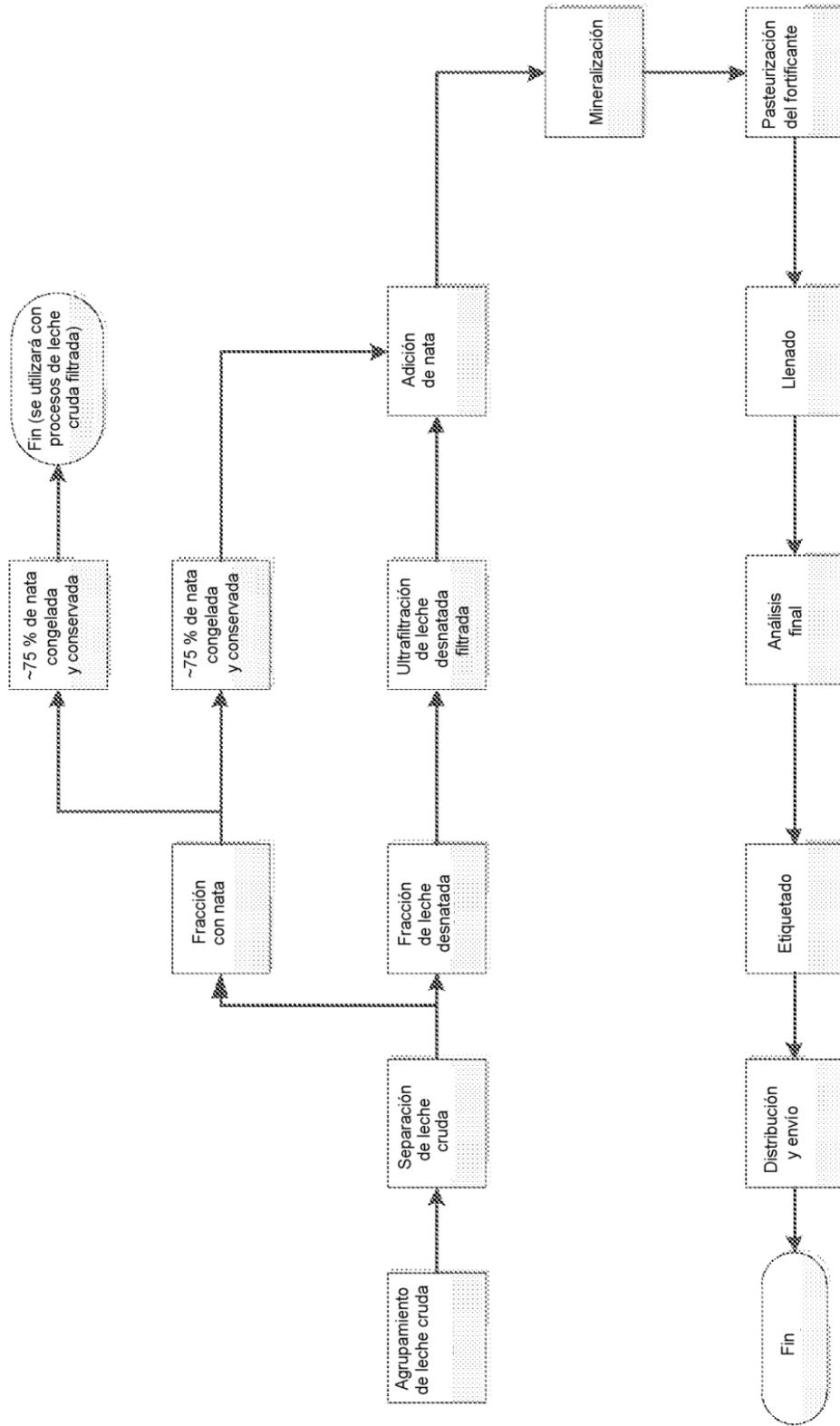
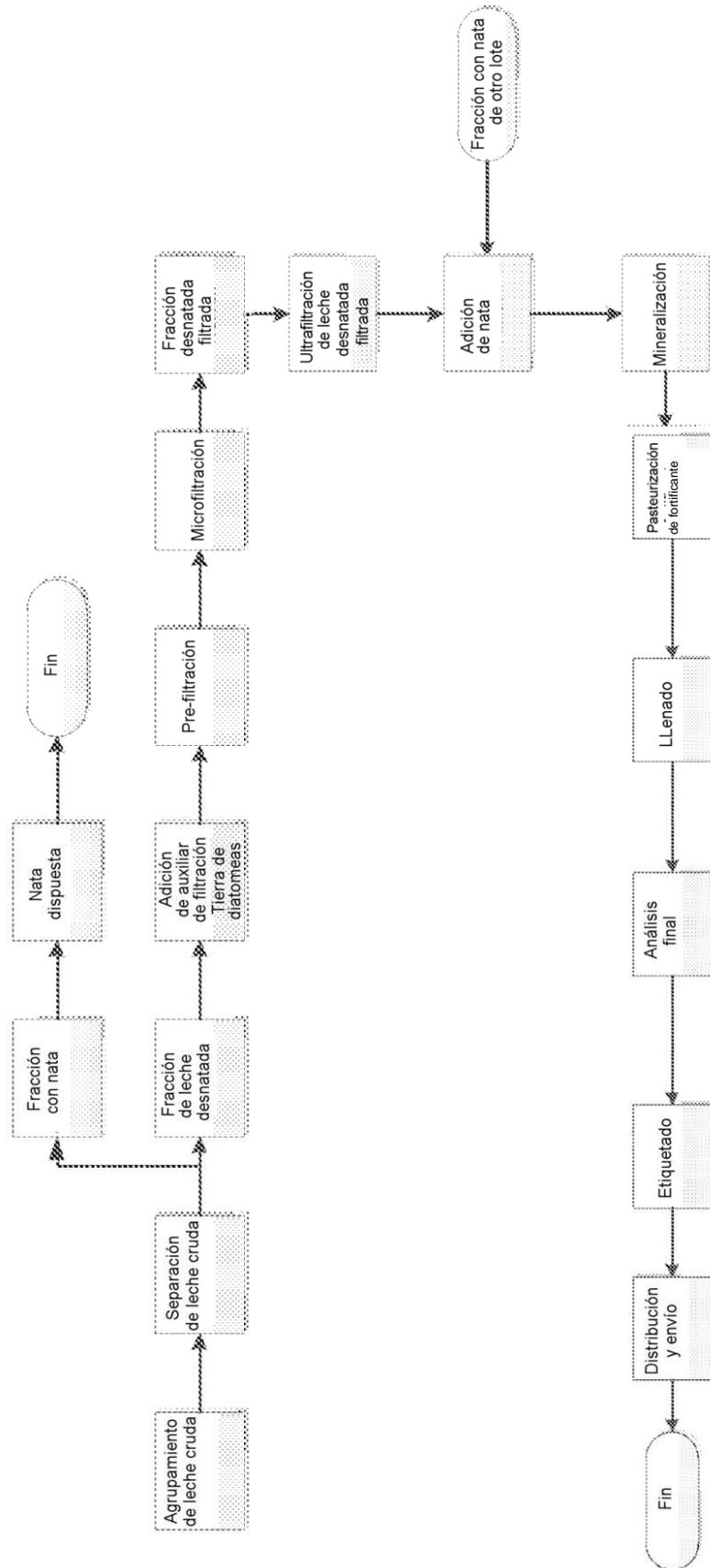


Figura 4



60

Figura 5



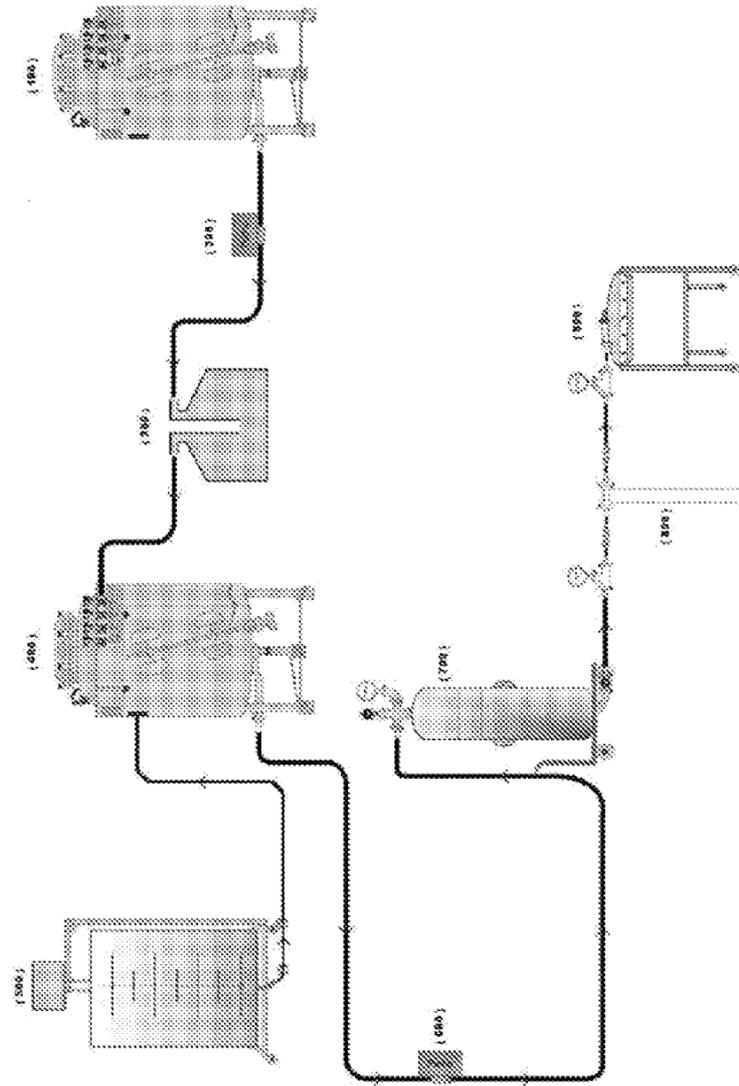


Figura 6